



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição



Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA COMO SUPLEMENTO DE VITAMINA E

Cibelem Iribarrem Benites

Bióloga

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Orientador

Campinas – SP

2008

Cibelem Iribarrem Benites

Bióloga

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA COMO SUPLEMENTO DE VITAMINA E

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição, Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador:

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Campinas – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B437d Benites, Cibelem Iribarrem
Destilado da desodorização do óleo de soja como
suplemento de vitamina E / Cibelem Iribarrem Benites. –
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Óleo de soja. 2. Subprodutos. 3. Suplementação.
4. Tocoferóis. 5. Toxidade. 6. Rato como animal de
laboratório. I. Oliveira, Admar Costa de. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

ckn/fea

Título em inglês: Soybean oil deodorizer distillate as a vitamin E supplement

Palavras-chave em inglês (Keywords): Soybean oil, Byproducts, Supplementation,
Tocopherols, Toxicity, Rat as laboratory animal

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Admar Costa de Oliveira

Leonor Almeida de Souza Soares

Flávia Queiroga Aranha de Almeida

Elisangela Farias Silva

Renato Grimaldi

Marcelo Alexandre Prado

Data de defesa: 27-02-2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador - FEA / UNICAMP

Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares
FURG / UFPel

Dr^a. Flávia Queiroga Aranha de Almeida
UNESP Botucatú

Dr^a. Elisangela Farias Silva
IB / UNICAMP

Dr. Renato Grimaldi
FEA / UNICAMP

Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA / UNICAMP

*A minha mãe Elizamar e
meu avô Bráulio (in memoriam),
dedico com todo amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação e suporte para a realização desta Tese.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho através das correções e sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº 142036/2003-0).

À Empresa *Cargill Agrícola S.A*, pela doação do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja.

À *M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda.*, na pessoa do Prof. Dr. Olavo Rusig, pela doação da mistura vitamínica utilizada no ensaio biológico.

À Dr^a. Soely Maria Pissini Machado Reis, pela grande amizade, apoio, paciência e ajuda constante e incessante para o êxito deste trabalho.

Aos técnicos do *Laboratório de Óleos e Gorduras* (FEA - UNICAMP), Dr. Renato Grimaldi, Rosana Nogueira, Marcela Stahl e Giovana de Toledo, pelo apoio e suporte nas análises de cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência.

À técnica Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pelos momentos de descontração e apoio técnico no *Laboratório de Ensaios Biológicos* (FEA - UNICAMP).

Ao técnico Adauto Venâncio dos Santos, da *Planta Piloto Geral* (FEA - UNICAMP), pelo auxílio na manufatura das dietas experimentais.

Ao técnico Francisco Carraro, do *Laboratório Central Analítico* (FEA - UNICAMP), pelo apoio incansável nas inúmeras análises realizadas.

À técnica Eliana Maria Pettrossi Motta, do *Laboratório Central de Bioquímica Nutricional* (FEA - UNICAMP), pela utilização da centrífuga e liofilizador.

À técnica Mônica Almeida Falconi e ao *Laboratório de Rotinas Hematológicas* (Hemocentro – UNICAMP), pelos hemogramas dos animais.

Ao *Laboratório de Genética Humana* (IB – UFPel), nas pessoas dos técnicos Álvaro Moreira, Rita Packeiser Vianna e Alessandra da Rocha, e da Prof^a. Dr^a. Vera Bobrowski, pelo apoio nas análises de micronúcleos.

À Dr^a. Elisângela Farias Silva, do *Laboratório de Produtos Naturais* (IB – UNICAMP) pelo auxílio na análise de isoprostanas.

Ao *Laboratório de Micronutrientes* (PUCCAMP), nas pessoas da Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene e da técnica Marlene Maria Torniziello Braz da Silva, pela utilização do liofilizador.

Aos Profs. Drs. Célio Kenji Miyasaka e Marcelo Prado (FEA – UNICAMP) pelos momentos de descontração, trocas de idéias e esclarecimentos de muitas dúvidas.

À Prof^a. Dr^a. e amiga Leonor Almeida de Souza Soares pelas sugestões, sabedoria, exemplo de vida e dedicação à pesquisa.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição e da Coordenaria de Pós-Graduação da FEA, em especial Célis Scavassani, Maria Aparecida Vasconcellos Osteti e Cosme Perota, pois todos contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos colegas do *Laboratório de Lípidos*, Adriana Botelho, Lilia Zago, Márcio Bammann e Telma Côrrea, por todos os momentos compartilhados.

Aos meus amigos Gilberto Goulart, Mariângela Goulart, Gilvan Fischer, Mariana Altenhofen, Reinaldo Bastos, Marcelo Pinto, Paulo Porto, Ângela Teixeira e Adélia de Faria pelo ânimo e descontração.

A Viktor Cárdenas por toda serenidade, compreensão, segurança e carinho neste momento tão atribulado.

À minha mãe Elizamar, meus avós Eloá e Bráulio (*in memorian*), meus irmãos José Renato e Rodrigo e sobrinhas, por toda a força, incentivo e compreensão da minha ausência.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram de alguma forma para meu crescimento e execução de mais esta etapa da minha vida.

Enfim, a Deus por todas as graças alcançadas na minha vida.

RESUMO GERAL

A utilização de resíduos e subprodutos da indústria vem crescendo devido à necessidade de adequação das empresas às normas ambientais. Por outro lado, a substituição de insumos artificiais por produtos naturais nas áreas alimentícias, farmacêuticas e outras, vem ganhando forte destaque mundial. Estes fatos fomentam o estudo da utilização do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) como suplemento de tocoferóis, que são compostos importantes na nutrição humana e animal, por apresentarem atividade vitamínica E e ação antioxidante natural. O DDOS é um subproduto oriundo do processo de refino do óleo de soja, que também é rico em ácidos graxos livres (AGL), esteróis e hidrocarbonetos, com potencialidade para extração de vitamina E; entretanto tem sido demonstrado que esta prática não é economicamente viável. Todavia, a utilização do DDOS na forma semi-refinada (neutra) torna-se uma alternativa para o enriquecimento de dietas animais e possivelmente humana. Com vistas a atingir tais objetivos, foi realizado um estudo do processo de neutralização variando o tipo de álcali, a concentração e o excesso adicionado do mesmo, além da temperatura do processo e do tempo de homogeneização. Após o estabelecimento das condições ótimas de processo, o DDOS foi neutralizado em maior quantidade para sua caracterização e como matéria-prima para a suplementação de ratos Wistar sadios recém-desmamados. Estes foram alimentados com dieta AIN-93G depletada em vitamina E e distribuídos conforme o período de suplementação oro-gástrica diária: 0 (n=7), 30 (n=42) e 60 dias (n=42), sendo estes últimos subdivididos pelo tipo de tratamento (7animais/grupo): Depletado (sem suplementação), Soja (óleo como placebo), Ephynal[®] (vitamina E sintética), DDOS, DDOS 25 e DDOS 50 (respectivamente 150, 187,5 e 225 mg α -tocoferol/kg dieta). Através dos planejamentos experimentais, estabeleceram-se as condições ideais de neutralização (com maior redução de AGL, menor arraste de tocoferóis e maior rendimento), tendo como resultado: Na₂CO₃ (4,34N), temperatura de 45,8°C e tempo de homogeneização de 3'20"; com a neutralização, o teor de AGL passou de 53,4% para 6,1%, por isto foi neutralizado novamente para a suplementação dos ratos, resultando em 1,8% AGL e 11,0% de

tocoferóis totais (TT). Na avaliação biológica, os resultados de crescimento e hemograma foram normais e, com 30 e 60 dias (30d e 60d) de suplementação, os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas na maioria dos aspectos (Tukey, $p > 0,05$): triacilgliceróis séricos (118,8 mg/dL - 30d; 85,6 mg/dL - 60d); colesterol sérico (69,8 mg/dL - 30d; 65,5 mg/dL - 60d); transaminase oxaloacética (73,1 U/L - 30d; 81,3 U/L - 60d) e pirúvica (23,6 U/L - 30d; 28,3 U/L - 60d); bilirrubinas (0,2 mg/dL - 30d; 0,3 mg/dL - 60d). Assim, não houve danos hepáticos nem genotóxicos, pois a frequência de micronúcleos estava dentro da taxa espontânea de mutação, i. e., frequência admissível de mutação, sem dano para o organismo. Diferindo estatisticamente, o teor de lipídios hepáticos variou entre 6,5-8,5% e musculares 3,5-6,0%. A dosagem de isoprostanas com vistas a verificar o estado de oxidação não se mostrou adequada neste trabalho. O teor de MDA no tecido muscular não apresentou variação entre os grupos, aos 30d (1,6 $\mu\text{g MDA/g}$) e aos 60d (0,5 $\mu\text{g MDA/g}$) havendo uma redução. Para o tecido adiposo, aos 30d não houve diferença entre os grupos (1,9 $\mu\text{g MDA/g}$) e aos 60d houve aumento, sendo que os valores foram diferentes apenas matematicamente, sendo que com exceção do grupo Depletado, os demais não se diferenciaram (média aparente 2,7 $\mu\text{g MDA/g}$). No tecido hepático, aos 30d houve uma diferença entre os grupos (média aparente 2,3 $\mu\text{g MDA/g}$), aos 60d houve um aumento no teor de MDA, sem diferença estatística entre os tratamentos (3,1 $\mu\text{g MDA/g}$). Quanto a distribuição de TT os grupos com DDOS tiveram desempenho intermediário dentre os tratamentos, sendo respectivamente para 30d e 60d: 7,3 $\mu\text{g/mL}$ e 6,7 $\mu\text{g/mL}$ no soro; 10,1 $\mu\text{g/g}$ e 12,4 $\mu\text{g/g}$ no fígado; 19,5 $\mu\text{g/g}$ e 29,4 $\mu\text{g/g}$ na gordura abdominal e 16,2 $\mu\text{g/g}$ e 21,3 $\mu\text{g/g}$ no músculo, com correlação positiva entre o teor de tocoferóis nos tecidos e o ingerido pelos animais. Os resultados mostraram que o DDOS não acarretou em alterações fisiológicas tóxicas nos animais, além de similaridade entre os efeitos dos tocoferóis naturais, presentes no DDOS, e os sintéticos, indicando o relevante potencial de utilização do produto como suplemento.

Palavras-chave: Óleo de soja; subprodutos industriais; suplementação; tocoferóis; toxicidade; rato como animal de experimentação.

Soybean Oil Deodorizer Distillate as a Vitamin E Supplement

ABSTRACT

Increased use of industrial waste and byproducts fits the need of industry to comply with environmental rules. The substitution of natural products for artificial ingredients has gained worldwide attention in the food, pharmaceutical and other industries. These facts justify the study on the utilization of Soybean Oil Deodorizer Distillate (SODD) as tocopherol supplements. Tocopherol, which is physiologically active as vitamin E and a major natural antioxidant, is an especially important player in human and animal nutrition. SODD is a byproduct of the soybean oil refining process that is also rich in free fatty acids (FFA), sterols and hydrocarbons. It has been demonstrated that the use of SODD for vitamin E extraction is not economically viable. However, SODD in the semi-refined form (neutral) can be an alternative for animal and possibly human diet enrichment. The objective of the present study was to evaluate the SODD neutralizing process varying the type, concentration, and excess of alkali, as well as the process temperature and time for homogenization. After establishment of the optimal process conditions, a greater amount of SODD was neutralized for raw-material characterization and for supplementation of recently weaned Wistar rats. The rats were fed with AIN-93G diet depleted of vitamin E and distributed following the daily orogastric supplementation period: 0 (n=7), 30 (n=42) and 60 (n=42) days. The 30 and 60 days were divided by the treatment type (7 animals/group): Depleted (without supplementation), Soy (oil as placebo), Ephynal[®] (synthetic vitamin E), SODD, SODD 25 and SODD 50 (150, 187.5, and 225 mg α -tocopherol/kg diet, respectively). The optimal conditions for the neutralizing process, i.e., in order to obtain the greatest reduction in free fatty acid content, the lowest leaching of tocopherols and the greatest yield, were defined experimentally. The results were: Na₂CO₃ (4.34N), temperature of 45.8°C and homogenization time 3'20". The FFA content was reduced from 53.4% to 6.1% after neutralization, requiring a second step of neutralization, thus obtaining a free fatty acid content of 1.8% and 11.0% of total tocopherol (TT). The biological evaluation showed normal results for growth

and hematology and with 30 and 60 days of supplementation (30d and 60d) the treatments did not show statistically significant differences ($p>0.05$) for serum triglycerides (118.8 mg/dL - 30d; 85.6 mg/dL - 60d); serum cholesterol (69.8 mg/dL - 30d; 65.5 mg/dL - 60d); glutamic-oxaloacetic transaminase (73.1 U/L - 30d; 81.3 U/L - 60d), glutamic-pyruvate (23.6 U/L - 30d; 28.3 U/L - 60d); and bilirubins (0.2 mg/dL - 30d; 0.3 mg/dL - 60d). No hepatic and genotoxic damage was observed, since the micronucleus frequency was in the spontaneous mutation rate, i.e., admissible mutation frequency without organism damage. Significant differences were observed for hepatic and muscle lipids levels varying from 6.5 to 8.5% and 3.5 to 6.0%, respectively. Isoprostanes dosage was found to be an inadequate criteria to verify oxidation state. The malonaldehyde content (MDA) in the muscular tissue was not different between groups at 30d (1.6 μg MDA/g) and 60d (0.5 μg MDA/g) despite a slight reduction. For adipose tissue, there was no difference between the groups for 30d (1.9 μg MDA/g) and for 60d these values were increased, and were statistically different; with the exception of Depleted group, the others were not different (apparent average of 2.7 μg MDA/g). In the liver, at 30d there was a difference between groups (apparent average of 2.3 μg MDA/g) but at 60d there was an increase in MDA content, without statistical difference between treatments (3.1 μg MDA/g). The TT distribution of groups showed intermediary performance among the treatments, being 7.3 $\mu\text{g/mL}$ and 6.7 $\mu\text{g/mL}$ in serum; 10.1 $\mu\text{g/g}$ and 12.4 $\mu\text{g/g}$ in the liver; 19.5 $\mu\text{g/g}$ and 29.4 $\mu\text{g/g}$ in abdominal fat; and 16.2 $\mu\text{g/g}$ and 21.3 $\mu\text{g/g}$ in the muscle, for 30 and 60 days, respectively. A positive correlation between tocopherol content in the tissues and tocopherol consumption by animals was observed. The results show that SODD did not cause physiological damage in animals. Different sources of vitamin E, natural (present in SODD) and synthetic tocopherols, yielded similar effects, suggesting the potential of using SODD as a supplement.

Keywords: Soybean oil; industrial byproducts; supplementation; tocopherols; toxicity; rat as experimental animal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Produção mensal de óleo de soja bruto (mil ton) de acordo com a safra.....	5
Figura 2.	Fluxograma do refino químico do óleo de soja.....	7
Figura 3.	Estrutura dos isômeros de tocoferol.....	12
Figura 4.	Metabolismo da vitamina E.....	14
Figura 5.	Ação antioxidante da Vitamina E e sua reciclagem pela Vitamina C.....	16
Figura 6.	Delineamento da análise experimental da neutralização do DDOS.....	29
Figura 7.	Fluxograma do processo de neutralização do DDOS.....	32
Figura 8.	Delineamento Experimental da Avaliação Biológica.....	41
Figura 9.	Teor de AGL (%) no DDOS bruto e nos DDOS neutros -1° experimento fatorial.....	50
Figura 10.	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a redução de AGL do DDOS neutro no 1° experimento (a) temperatura e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (b) tempo e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (c) temperatura e tempo.....	53
Figura 11.	Superfícies de resposta e curvas de contorno para o teor de α-TE do DDOS neutro no 1° experimento (a) temperatura e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (b) tempo e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (c) temperatura e tempo.....	56
Figura 12.	Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento de DDOS neutro no 1° experimento (a) temperatura e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (b) tempo e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (c) temperatura e tempo.....	59
Figura 13.	Teor de AGL (%) no DDOS bruto e nos DDOS neutros -2° experimento fatorial.....	61
Figura 14.	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a redução de AGL no 2° experimento (a) temperatura e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (b) tempo e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (c) temperatura e tempo.....	63
Figura 15.	Superfícies de resposta e curvas de contorno para o teor de α-TE do DDOS neutro no 2° experimento (a) temperatura e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (b) tempo e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (c) temperatura e tempo.....	66
Figura 16.	Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento de DDOS neutro no 2° experimento (a) temperatura e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (b) tempo e concentração de Na ₂ CO ₃ ; (c) temperatura e tempo.....	69
Figura 17.	Valores Preditos e <i>Desirability</i> para as variáveis do 2° experimento.....	70
Figura 18.	Evolução ponderal dos ratos submetidos as diferentes suplementações durante 60 dias de experimento (n=42, 7 ratos/grupo).....	77
Figura 19.	Curva de ganho de peso médio dos animais durante 30 dias (n=42)	78
Figura 20.	Curva de ganho de peso médio dos animais durante 60 dias (n=42)	78
Figura 21.	Consumo de dieta (g/rato/período) e peso corporal (g) dos ratos (n=42)	81
Figura 22.	Teor de lipídios totais (%) no fígado dos ratos (n=42, 7 ratos/grupo).....	86
Figura 23.	Teor de lipídios totais (%) no músculo dos ratos (n=42, 7 ratos/grupo).....	86
Figura 24.	Fotomicrografia de eritrócitos de rato Wistar, em detalhe NCEMN (Giemsa, 10x100).....	93
Figura 25.	Fotomicrografia de eritrócitos de rato Wistar, em detalhe PCEMN (Giemsa, 10x100).....	93
Figura 26.	Isoprostanas séricas de ratos com suplementação por 30 dias (n=30, 5 ratos/grupo).....	97

Figura 27.	Isoprostanas séricas de ratos com suplementação por 60 dias (n=30, 5 ratos/grupo).....	98
Figura 28.	Quantidade de α -TE fornecida por intubação orogástrica.....	102
Figura 29.	Teor de α -TE sérico ($\mu\text{g/mL}$) ao longo do período experimental.....	104
Figura 30.	Correlação entre o teor de α -TE sérico ($\mu\text{g/mL}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias.....	105
Figura 31.	Correlação entre o teor de α -TE sérico ($\mu\text{g/mL}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias.....	105
Figura 32.	Teor de α -TE hepático ($\mu\text{g/g}$) ao longo do período experimental.....	107
Figura 33.	Correlação entre o teor de α -TE hepático ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias.....	108
Figura 34.	Correlação entre o teor de α -TE hepático ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias.....	108
Figura 35.	Teor de α -TE no tecido adiposo ($\mu\text{g/g}$) ao longo do período experimental.....	110
Figura 36.	Correlação entre o teor de α -TE adiposo abdominal ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias.....	111
Figura 37.	Correlação entre o teor de α -TE adiposo abdominal ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias.....	111
Figura 38.	Teor de α -TE no tecido muscular ($\mu\text{g/g}$) ao longo do período experimental.....	113
Figura 39.	Correlação entre o teor de α -TE muscular ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias.....	115
Figura 40.	Correlação entre o teor de α -TE muscular ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias.....	115
Figura 41.	Correlação entre o teor de α -TE nos tecidos ($\mu\text{g/g}$) e a ingestão de α -TE sintético.....	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Resultados dos testes de neutralização do DDOS bruto: liberação de DDOS neutro e teores de AGL (%) e TT (%).....	48
Quadro 2.	Padrões de referência normais para ratos Wistar de acordo com o equipamento utilizado para o hemograma e o Instituto Galas.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características do DDOS de acordo com vários autores.....	10
Tabela 2.	Ingestão alimentar de referência (DRI) de vitamina E por dia e níveis de ingestão máxima tolerável de acordo com a faixa etária.....	20
Tabela 3.	Variáveis e níveis utilizados no 1º planejamento fatorial.....	33
Tabela 4.	Matriz de planejamento experimental para o 1º experimento (tipo fatorial 2 ³ com ensaios em triplicata + 4 pontos centrais)	33
Tabela 5.	Variáveis e níveis utilizados no 2º planejamento fatorial.....	34
Tabela 6.	Matriz de planejamento experimental para o 2º experimento (tipo fatorial 2 ³ com ensaios em triplicata + 6 pontos axiais + 4 pontos centrais)	34
Tabela 7.	Composição da dieta AIN-93G com modificações.....	39
Tabela 8.	Matriz de planejamento experimental completo de primeira ordem (valores reais e codificados) utilizada no 1º experimento com as respostas estudadas.....	49
Tabela 9.	Efeito das variáveis no 1º planejamento fatorial para a resposta redução de AGL no DDOS neutro.....	51
Tabela 10.	Teor de tocoferóis totais e seus isômeros (%) do DDOS bruto e DDOS neutros obtidos no 1º experimento.....	54
Tabela 11.	Efeito das variáveis no 1º planejamento fatorial para a resposta teor de α -TE no DDOS neutro	55
Tabela 12.	Efeito das variáveis no 1º planejamento fatorial para a resposta rendimento de DDOS neutro..	57
Tabela 13.	Matriz de planejamento experimental completo de primeira ordem (valores reais e codificados) utilizada no 2º experimento e as respostas avaliadas.....	60
Tabela 14.	Efeito das variáveis no 2º planejamento fatorial para a resposta redução de AGL no DDOS neutro.....	62
Tabela 15.	Teor de tocoferóis (%) dos DDOS bruto e neutros obtidos no 2º experimento.....	64
Tabela 16.	Efeito das variáveis no 2º planejamento fatorial para a resposta teor de α -TE no DDOS neutro	65
Tabela 17.	Efeito das variáveis no 2º planejamento fatorial para a resposta rendimento de DDOS neutro	68
Tabela 18.	Teor de tocoferóis totais (%) e seus isômeros nos DDOS bruto e neutro.....	72
Tabela 19.	Composição em ácidos graxos (%) no DDOS bruto e DDOS neutro.....	72
Tabela 20.	Caracterização físico-química do DDOS bruto e DDOS neutro.....	73
Tabela 21.	Composição proximal (%), valor energético (kcal/100g) e teor de α -TE (%) da dieta experimental AIN-93G.....	75
Tabela 22.	Teor de isômeros de tocoferóis (%), tocoferóis totais (%) e equivalentes de α -tocoferol (%) nos suplementos administrados a ratos Wistar.....	75
Tabela 23.	Composição em ácidos graxos (%) médios nos produtos utilizados na suplementação dos animais.....	76
Tabela 24.	Valores médios de ingestão e excretas (g/dia) e eficiência alimentar aos 30 e 60 dias de experimento (n=84, 7 ratos/grupo).....	80
Tabela 25.	Relação entre o peso dos órgãos (g) e o peso corporal (100g) dos ratos aos 30 e 60 dias de experimento (n=84, 7 ratos/grupo).....	83

Tabela 26.	Valores médios dos triacilgliceróis e colesterol total séricos dos animais suplementados durante 30 e 60 dias (n=84, 7 ratos/grupo).....	85
Tabela 27.	Determinação das enzimas transaminases e bilirrubinas no soro de ratos suplementados durante 30 e 60 dias (n=84, 7 ratos/grupo).....	88
Tabela 28.	Hemograma aos 15 e 30 dias (n=30, 5 ratos/grupo)	91
Tabela 29.	Hemograma aos 45 e 60 dias (n=30, 5 ratos/grupo).....	92
Tabela 30.	Frequência de eritrócitos jovens micronucleados (PCEMN) e maduros micronucleados (NCEMN) na medula óssea de ratos Wistar (n=84, 7 ratos/grupo).....	95
Tabela 31.	Determinação de malonaldeído nos tecidos hepático, adiposo e muscular dos ratos suplementados por 30 e 60 dias (n=84, 7 ratos/grupo).....	99
Tabela 32.	Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais nos diferentes tecidos dos animais de referência (n=7).....	102
Tabela 33.	Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais séricos (n=84, 7 ratos/grupo).....	103
Tabela 34.	Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais hepáticos (n=84, 7 ratos/grupo).....	106
Tabela 35.	Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais no tecido adiposo (n=60, 5 ratos/grupo).....	109
Tabela 36.	Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais no tecido muscular (n=60, 5 ratos/grupo).....	112

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO APÊNDICE E ANEXOS

Figura A1.	Gráfico de Pareto para a resposta redução de AGL do DDOS no 1° experimento.....	129
Figura A2.	Gráfico de Pareto para a resposta teor de α -TE do DDOS no 1° experimento.....	131
Figura A3.	Gráfico de Pareto para a resposta rendimento de DDOS neutro no 1° experimento.....	132
Figura A4.	Gráfico de Pareto para a resposta redução de AGL do DDOS no 2° experimento.....	133
Figura A5.	Gráfico de Pareto para a resposta teor de α -TE do DDOS no 2° experimento.....	134
Figura A6.	Gráfico de Pareto para a resposta rendimento de DDOS neutro no 2° experimento.....	135
Figura B1.	Cromatograma dos tocoferóis (1= α -Tocoferol; 2= β -Tocoferol; 3= γ -Tocoferol; 4= δ -Tocoferol).....	136
Tabela A1.	Análise de variância para a redução de AGL após a neutralização.....	130
Tabela A2.	Análise de variância para o teor de α -TE após a neutralização.....	131
Tabela A3.	Análise de variância para o rendimento de DDOS neutro.....	132
Tabela A4.	Análise de variância para a redução de AGL após a neutralização.....	133
Tabela A5.	Análise de variância para o teor de α -TE após a neutralização.....	134
Tabela A6.	Análise de variância para o rendimento de DDOS neutro após a neutralização.....	135
Tabela B1.	Composição da mistura mineral (AIN-93G).....	138
Tabela C1.	Composição da mistura vitamínica (AIN-93G) depletada em vitamina E.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS

α -T	Alfa-tocoferol
β -T	Beta-tocoferol
γ -T	Gama-tocoferol
δ -T	Delta-tocoferol
α -TE	Equivalentes de Alfa-tocoferol
α -TTP	Proteína Alfa-tocoferol Transferase
AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
DDOS	Destilado da Desodorização do Óleo de Soja
DDOV	Destilado da Desodorização de Óleos Vegetais
mEg	miliEquivalente-grama
GOT	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, Transaminase Glutâmico Oxaloacética,
(AST)	Aspartato Aminotransferase
GPT	Glutamic-Pyruvate Transaminase, Transaminase Glutâmico Pirúvica, Alanina
(ALT)	Aminotransferase
HDL	High Density Lipoprotein, Lipoproteína de Alta Densidade
II	Índice de Iodo
IP	Índice de Peróxido
IS	Índice de Saponificação
LDL	Low Density Lipoprotein, Lipoproteína de Baixa Densidade
MDA	Malonaldeído, Malondialdeído, Aldeído malônico
MI	Matéria Insaponificável
MN	Micronúcleos
N	Normalidade
NCE	Eritrócitos Normocromáticos
NCEMN	Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados
PCE	Eritrócitos Policromáticos
PCEMN	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
RL	Radicais Livres
TAG	Triacilgliceróis
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEP	Tetraetoxipropano
TT	Tocoferóis Totais
VLDL	Very Low Density Lipoprotein, Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Soja e seus derivados	5
3.2 Destilado da Desodorização do Óleo de Soja	7
3.3 Vitamina E.....	11
3.3.1 Aspectos Gerais	11
3.3.2 Metabolismo e Papel Biológico da Vitamina E	13
3.3.3 Estabilidade da Vitamina E	19
3.3.4 Deficiência e Toxicidade da Vitamina E.....	19
3.4 Interesse na Utilização de Tocoferóis Naturais.....	21
3.4.1 Utilização de Tocoferóis na Suplementação.....	22
3.4.2 Tocoferóis do DDOS como Suplemento	24
3.4.3 Possíveis Efeitos Adversos da Suplementação com DDOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Neutralização e Caracterização do DDOS	29
4.1.1 Ensaio Preliminar da Neutralização	30
4.1.2 Planejamento Experimental	31
4.1.3 Obtenção e Caracterização do DDOS Neutro	35
4.2 Ensaio Biológico com DDOS Neutro	38
4.2.1 Animais e Condições Experimentais.....	38
4.2.2 Delineamento Experimental e Procedimentos	40
4.2.3 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Caracterização e Neutralização do DDOS	47
5.1.1 Ensaio Preliminar	47
5.1.2 Planejamentos Experimentais.....	49
5.1.3 Caracterização do DDOS Neutro.....	71
5.2 Aplicação Biológica do DDOS	74
5.2.1 Caracterização da Dieta Experimental e dos Suplementos.....	74
5.2.2 Avaliação Biológica dos Animais	76
5.2.3 Perfil Lipídico dos Ratos.....	84
5.2.4 Dano Hepático.....	87
5.2.5 Hemograma.....	89
5.2.6 Genotoxicidade na Medula Óssea	93
5.2.7 Estado de Oxidação	96
5.2.8 Distribuição dos Tocoferóis.....	101
6 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1 INTRODUÇÃO

A indústria processadora de óleos comestíveis obtém uma grande quantidade de óleo bruto, que necessita de refino para que possa ser consumido. O Destilado da Desodorização de Óleos Vegetais (DDOV) é um subproduto gerado neste refino durante uma etapa do processo denominada desodorização. Esta tem a função de retirar os componentes voláteis e que conferem sabor e odor desagradáveis ao óleo. Entretanto, apesar das melhorias que têm sido realizadas, inevitavelmente, também retira-se do óleo os tocoferóis, produzindo uma corrente efluente considerada um valioso subproduto, e cujo valor comercial varia em função do seu teor de tocoferóis (VERLEYEN *et al.*, 2001). Sendo assim, o DDOV pode ser considerado como a matéria-prima mais apropriada para realizar a recuperação e/ou concentração de tocoferóis porque apresenta concentrações superiores desta molécula em relação aos óleos vegetais e demais produtos naturais (HIROTA *et al.*, 2003).

O Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) é o mais abundante no Brasil, e por isto pode ser considerado como fonte de tocoferóis naturais. Apesar disto, ALMEIDA *et al.* (2003) salienta que os métodos utilizados para a extração não apresentam boa eficiência na remoção dos tocoferóis, concentrando os mesmos em quantidade insuficiente, indicando que no país, ainda existe carência de tecnologia aplicável economicamente, para a elaboração de concentrados de tocoferóis a partir do subproduto.

Tocoferol é um termo genérico, derivado do grego, *tokos* = nascimento de uma criança; *phero* = suportar, tolerar (PIKE & BROWN, 1984), é conhecida como a vitamina ligada a fertilidade. Inclui vários compostos com atividade vitamínica E, também são importantes por sua ação antioxidante, protegendo os lipídios insaturados presentes nas membranas celulares contra a oxidação. Apesar de essencial para o crescimento e sobrevivência, o corpo humano não sintetiza esta vitamina, que deve ser provida pela dieta ou por um suplemento vitamínico (AZZI, 2004).

Existe uma crescente necessidade de utilização de fontes naturais de vitamina E, como alternativa à vitamina sintética, assim o DDOS destaca-se, pois é uma fonte disponível no mercado nacional e com baixo custo, contendo cerca de 10% de tocoferóis (HIROTA *et al.*, 2003) enquanto o óleo de soja apresenta cerca de 0,1% (LAMPI *et al.*, 2002). De acordo com pesquisas junto às indústrias locais, o preço do DL- α -tocoferol de grau alimentício é US\$ 60/kg, enquanto que o DDOS, contendo cerca de 10% de tocoferóis é de US\$ 1/kg (BORHER *et al.*, 2002).

Portanto, dada a importância dos tocoferóis, a utilização do DDOS sob a forma mais bruta possível, não tóxica, é uma solução para a elaboração de um suplemento vitamínico viável. O aproveitamento deste subproduto como nutriente na alimentação corrobora ainda, com o aumento na tendência mundial de utilização de compostos e ingredientes naturais. E devido à grande disponibilidade do mesmo, acarreta em importante redução no impacto ambiental causado por este efluente. Além do aspecto econômico, a UNICAMP vem se destacando nas pesquisas com este subproduto, existindo trabalhos científicos em busca de metodologias de emprego do DDOS (BORHER, 2002; MORAES *et al.*, 2004), como o Laboratório de Lípidos (DEPAN/FEA) com pesquisa, em especial, na verificação de efeitos tóxicos do DDOS no organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os bons resultados obtidos, demonstram ainda mais o potencial de utilização do DDOS e a necessidade de aprimoramento das metodologias de aplicação, tornando-as viáveis para a realidade do País.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar o potencial de utilização do destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) como suplemento de vitamina E.

2.2 Específicos

- Implantar uma etapa de neutralização do DDOS, visando a redução no teor de AGL e maior rendimento em α -tocoferol;
- Caracterizar quimicamente o DDOS neutro obtido, principalmente quanto: composição de ácidos graxos, ácidos graxos livres, teores de tocoferóis totais e seus isômeros;
- Avaliar biologicamente o desempenho do DDOS neutro em ratos Wistar;
- Verificar possíveis danos genéticos e oxidativos ocasionados aos animais por ação do DDOS;
- Quantificar a distribuição dos tocoferóis no soro e em diferentes tecidos animais: hepático, adiposo e muscular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soja e seus derivados

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sua produção expandiu-se nos anos 70, atingindo seu pico em 1989, declinando no início da década de 90, mas recuperou-se na safra 97/98 (SILVEIRA, 2007). Desde então, o desempenho da indústria esmagadora de grãos de soja na produção de óleo bruto vêm crescendo (figura 1). O levantamento estatístico da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2007) mostra que na safra 2006/2007 foram esmagados 28,76 milhões ton de grãos (média de 2,4 milhões ton/mês), produzindo 22,02 milhões ton de farelo bruto (média de 1,84 milhões ton/mês) e 5,51 milhões ton de óleo bruto (média de 459,5 mil ton/mês). Sendo que o processamento de grãos da safra 2007/2008 de fevereiro a junho já superou o mesmo período da safra anterior em 27 mil ton, com previsão para esmagar 30 milhões de ton até o final da safra. Previsão esta, que pode ser superada pela alavancada na produção de biodiesel, pois este é produzido com óleos vegetais e atualmente no Brasil o óleo de soja representa 90% deste mercado.

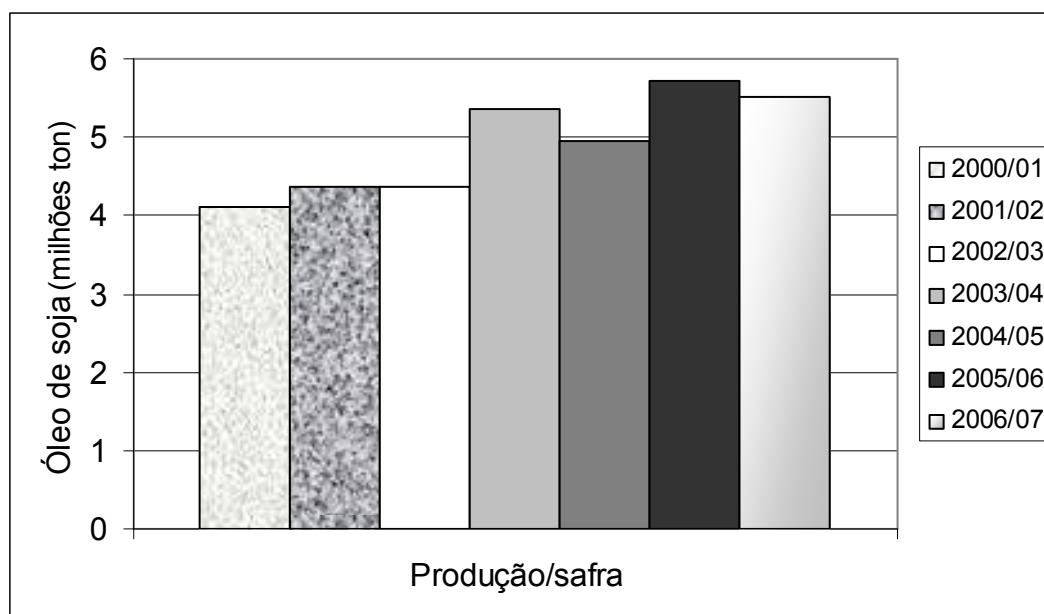


Figura 1. Produção mensal de óleo de soja bruto (mil ton) de acordo com a safra

Fonte: ABIOVE, 2007

A produção do óleo de soja consiste no esmagamento do grão após a colheita, extração do óleo e refino para adequação ao consumo. O óleo bruto extraído possui compostos indesejáveis como ácidos graxos, fosfatídeos, hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas. Estes compostos prejudicam a estabilidade oxidativa e a qualidade final do óleo. Por isso, para transformá-lo em um produto estável, nutritivo e com sabor agradável é necessário o refino. Entre as principais etapas de processo de refino encontram-se: a degomagem, a neutralização, o branqueamento ou clarificação e a desodorização (DE GREYT & KELLENS, 2000).

O refino dos óleos pode ser químico ou físico, sendo que a diferença entre eles está na presença ou ausência da etapa de neutralização, respectivamente. O mais utilizado é o refino químico (figura 2), iniciando-se na etapa de degomagem com água, para a remoção dos fosfatídeos hidratáveis e depois com ácido (fosfórico ou cítrico) para a remoção dos fosfatídeos não hidratáveis; em seguida vem a neutralização alcalina (com soda cáustica), onde se retiram os ácidos graxos livres e outros compostos como metais, formando uma borra, que precisa ser separada por centrifugação. A etapa seguinte é a retirada dos pigmentos, peróxidos, sabões e alguns fosfolípidios, através do branqueamento ou clarificação e por fim, a desodorização, que remove os compostos voláteis, causadores dos odores e sabores desagradáveis do óleo, sem acarretar em modificações significantes na composição dos ácidos graxos (DE GREYT & KELLENS, 2000; ALMEIDA *et al.* 2003; MARTINS *et al.*, 2006a; MARTINS *et al.*, 2006b). Os subprodutos gerados no refino: borra de neutralização, gomas e destilado da desodorização, possuem baixo valor econômico, mas, são matérias-primas muito interessantes (WOERFEL, 1981). Especialmente o destilado, devido ao seu conteúdo de tocoferóis e esteróis, podendo ser recuperados e concentrados, tornando-se produtos de alto valor comercial (AUGUSTO, 1988).

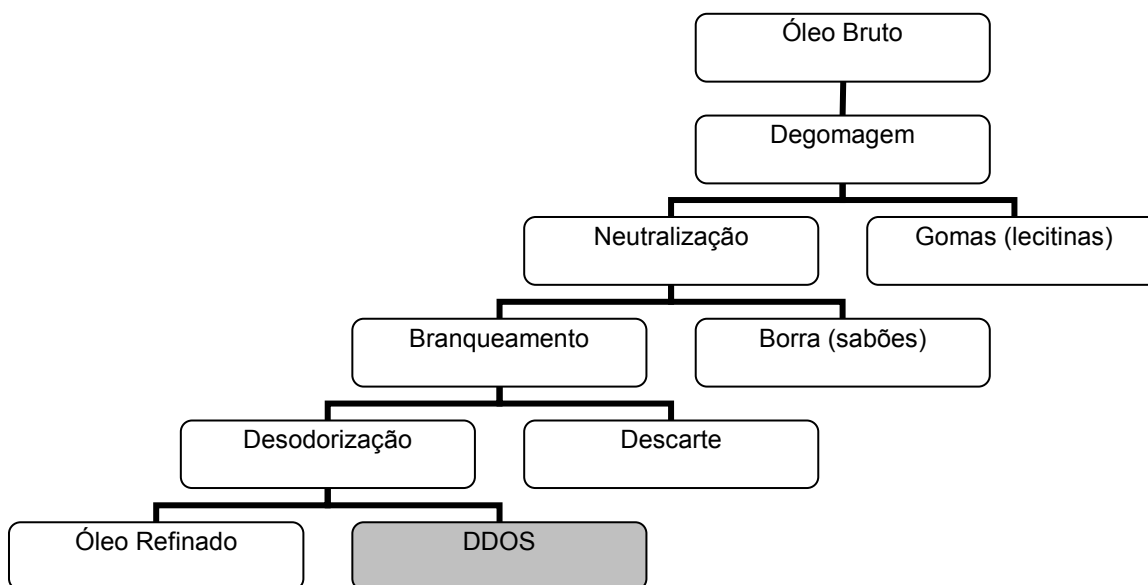


Figura 2. Fluxograma do refino químico do óleo de soja

Fonte: ERICKSON (1995) com adaptações.

3.2 Destilado da Desodorização do Óleo de Soja

A desodorização do óleo de soja ocorre por arraste de vapor a alta temperatura e sob vácuo, evitando assim a oxidação do material pelo contato com o oxigênio, bem como hidrólise do mesmo, devido à ação do vapor (DE GREYT & KELLENS, 2000). Em geral, a coluna de destilação tem temperatura entre 200 e 250°C (POKORNÝ & KORCZACK, 2001), com vácuo inferior a 10 mmHg, e origina duas correntes: uma corrente de fundo que origina o óleo refinado e uma corrente de topo, que gera o destilado da desodorização. Assim, no decorrer da desodorização, além dos produtos voláteis da oxidação os lipídios são vaporizados também, uma parte dos tocoferóis e fitoesteróis presentes no óleo. Assim, os tocoferóis são concentrados no destilado, tornando-o uma boa fonte de produção de vitamina E e de outros antioxidantes naturais (EITENMILLER, 1997). Por causa destas moléculas valiosas o DDOS é vendido e utilizado (VERLEYEN *et al.*, 2001; LAMPI *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2006b).

Dessa maneira, pode-se definir o DDOS como um material orgânico volátil recuperado como um produto lateral da desodorização do óleo de soja, valioso

pelo seu teor de tocoferóis (MARTINS et al., 2006b), sendo que sua utilização, bem como valor comercial, depende da composição química do destilado. Esta composição não só depende das características do cultivar, como também da técnica de refino aplicada e das condições de operação do destilador (DE GREYT & KELLENS, 2000). Quimicamente, o DDOS é uma mistura complexa de ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais, óleo neutro (triglicérides), peróxidos, aldeídos insaturados de alto peso molecular, cetonas, hidrocarbonetos parafínicos, oleínas, esqualeno, esteróis, tocoferóis, além de produtos oxidados não identificados. AUGUSTO (1988) ressalta que o DDOS é um produto heterogêneo, rico em ácidos graxos (principalmente palmítico e linoléico), esteróis totais (20%), β -sitosterol (9,13%) e tocoferóis totais (10%). Entre os anos 60 e 70 esta matéria-prima obteve seu ápice, mas em 1975 com o aumento dos substitutos sintéticos o valor do destilado caiu muito. Entretanto, o interesse nesta fonte natural de tocoferóis vem crescendo novamente, devido à presença destes compostos e diminuição na geração de resíduos industriais.

O DDOS gerado durante o refino do óleo de soja, em geral, representa de 0,15 a 0,45% de acordo com AUGUSTO (1988) e de 0,25 a 0,5% segundo WOERFEL (1981) em peso do óleo a ser desodorizado. Estima-se que se obtenha entre 0,1 a 0,3 kg de tocoferóis a cada tonelada de óleo de soja produzido (BARATA & CONTRERAS, 1984 apud AUGUSTO, 1988), mas o processamento exige técnicas altamente sofisticadas para a separação dos componentes (WOERFEL, 1981). Portanto, com uma média de 459,5 mil ton de óleo produzido (safra 2006/2007), podemos obter no mercado uma média de 91,9 ton de DDOS mensalmente. Sendo assim, devido ao grande volume de óleo produzido no Brasil, a quantidade deste subproduto é grande, prevalecendo para a recuperação de tocoferóis (MARTINS et al., 2006a).

A composição muito variável do destilado se deve à qualidade do óleo a ser refinado, ao tipo de refino, gás de arraste, às condições de pressão, temperatura e vácuo, além do aparelho utilizado (GHOSH & BHATTACHARYYA, 1996; DE GREYT & KELLENS, 2000). SONNTAG (1985) complementa que a composição de tocoferóis nos óleos e nos destilados depende de diversos fatores como

variedade da espécie vegetal, estágio de maturação das sementes, procedimento de extração e purificação do óleo, tempo e condições de armazenamento, salientando que o fator principal é o tipo de refino. No caso do refino físico, o destilado consiste principalmente de AGL (>80%) com pequenas quantidades de matéria insaponificável. O refino químico tem valores claramente mais elevados, por isto são mais atrativos pelo teor de vitamina E (DE GREYT & KELLENS, 2000). Conforme estas variações, o preço e a utilização do DDOS diferem em sua composição química e principalmente, em relação aos teores de tocoferóis e esteróis (MARTINS *et al.*, 2006b). A exportação para países que obtém concentrados destes nutrientes vem fazendo crescer o interesse no DDOS (FACIOLI, 2001), principalmente pelas indústrias de alimentos e farmacêutica, devido à busca por antioxidantes naturais (DE GREYT & KELLENS, 2000). Entretanto, a produção de compostos com propriedades tecnológicas, nutricionais e/ou terapêuticas na forma de concentrados, exige muitas técnicas de separação e purificação (FACIOLI, 2001), encarecendo os produtos.

A tabela 1 apresenta a composição do DDOS de acordo com alguns autores, onde se observa que a quantidade de AGL presentes variou entre 2,7 e 47,6%. Já o teor de tocoferóis variou entre 2,9 e 16,5%.

Tabela 1. Características do DDOS de acordo com vários autores

Características	A	B	C	D	E	F	G	H
Peso específico (g/mL)	-	-	0,912	-	-	-	-	-
Sólidos totais (%)	-	-	95,3	99,8	-	-	-	-
Acidez (em ácido oléico) (g/100g amostra)	-	-	37,1	-	-	-	-	-
Índice de saponificação (mg KOH/g amostra)	-	-	159,4	156,1	-	-	199,0	-
Ácidos graxos totais (%)	-	60-62	58,1-65,5	67,2	-	-	-	-
Ácidos graxos livres (%)	39,7	36,0	37,1	47,6	33,0	30,1	25,3	2,7
Matéria insaponificável (%)	-	-	26,1-36,4	26,2	-	-	6,4	-
Tocoferóis totais (%)	12,4	7,6-8,7	8,5	-	16,5	10,4	2,9	49,7*
α -tocoferol (%)	2,4	1,0-1,1	1,1	-	-	-	-	-
β -tocoferol (%)	-	0,2-0,4	-	-	-	-	-	-
γ -tocoferol (%)	2,5	2,0-2,4	2,8	-	-	-	-	-
δ -tocoferol (%)	7,7	4,2-5,0	4,6	-	-	-	-	-
Esteróis totais (%)	18,6	-	17,1	-	2,6	12,8	7,8	18,8
Campesterol (%)	-	-	4,2	-	-	-	-	-
Estigmasterol (%)	-	-	3,6	-	-	-	-	-
β -sitosterol (%)	-	-	9,3	-	-	-	-	-
Triacilgliceróis (%)	-	4,0	-	5,6	5,1	9,5	-	-
Diacilgliceróis (%)	-	-	-	6,4	2,7	3,5	-	-
Monoacilgliceróis (%)	-	-	-	14,2	1,2	41	-	-
Hidrocarbonetos (%)	-	3,5-4,1	3,5-4,4	-	-	-	0,6	-

* Tocoferóis + Tocotrienóis

Fonte: (A) WOERFEL, 1981; (B) BARATA & CONTRERAS, 1984 (*apud* AUGUSTO, 1988); (C) AUGUSTO, 1988; (D) FACIOLI, 2001; (E) VERLEYEN *et al.*, 2001; (F) HIROTA *et al.*, 2003; (G) NAGESHA *et al.*, 2003; (H) GAST *et al.*, 2005.

3.3 Vitamina E

3.3.1 Aspectos Gerais

Vitamina E é o termo genérico para designar um conjunto de moléculas: os tocoferóis e os tocotrienóis. É composta de 8 isômeros de tocoferóis e tocotrienóis, com variadas atividades biológicas, denominados α (alfa) β (beta) γ (gama) e δ (delta)-tocoferóis e tocotrienóis, mas estes últimos têm presença limitada a algumas plantas e em quantidades muito baixas em comparação aos tocoferóis (UEDA & IGARASHI, 1990; EITENMILLER & LANDEN Jr., 1999). Enquanto os tocoferóis estão distribuídos largamente nos alimentos, os tocotrienóis são encontrados somente em um número limitado, como no óleo de palma (ESKIN & SNAIT, 2006).

Tocoferóis derivam do tocol, e têm 1 ou mais grupos metil nas posições 5, 7 ou 8 na estrutura do anel cromanol (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003). Têm cadeia lateral com ramificação isoprenóide com 16C que é hidrofóbica chamada fitol, que é ligada ao anel cromanol na posição 2. Os 4 isômeros são reconhecidos, baseados no número e na posição do grupo metil na estrutura do anel (ESKIN & SNAIT, 2006), cujas fórmulas estruturais dos isômeros estão representadas na figura 3. Os homólogos α -, possuem três grupos metilos, enquanto os homólogos β - e γ - apresentam dois, e os δ - apenas um grupo metilo. Os homólogos β - e γ - constituem isômeros de posição por diferirem apenas na posição dos grupos metilo (MARTINS et al., 2006a). O número e posição dos grupos metil, influenciam significativamente a atividade biológica, sendo que o composto ativo com maior atividade é o α -tocopherol (1,49 UI/mg de isômero), e os demais isômeros β , γ e δ -tocopherol apresentam atividade respectivamente 0,6; 0,19 e 0,01 UI/mg de isômero (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

O α -tocopherol, existente comercialmente, pode ser tanto natural quanto sintético. A biossíntese dos tocoferóis na natureza produz somente o estereoisômero RRR. Em contraste, α -tocopherol produzido através da síntese química, é uma mistura equimolar racêmica de oito estereoisômeros. Em produtos

comerciais RRR- α -tocoferol é designado como d- α -tocoferol e o sintético como dl- α -tocoferol. Devido às diferenças existentes na atividade biológica entre os homólogos, é dada a preferência aos tocoferóis de origem natural para aplicações em geral (MARTINS *et al.*, 2006a).

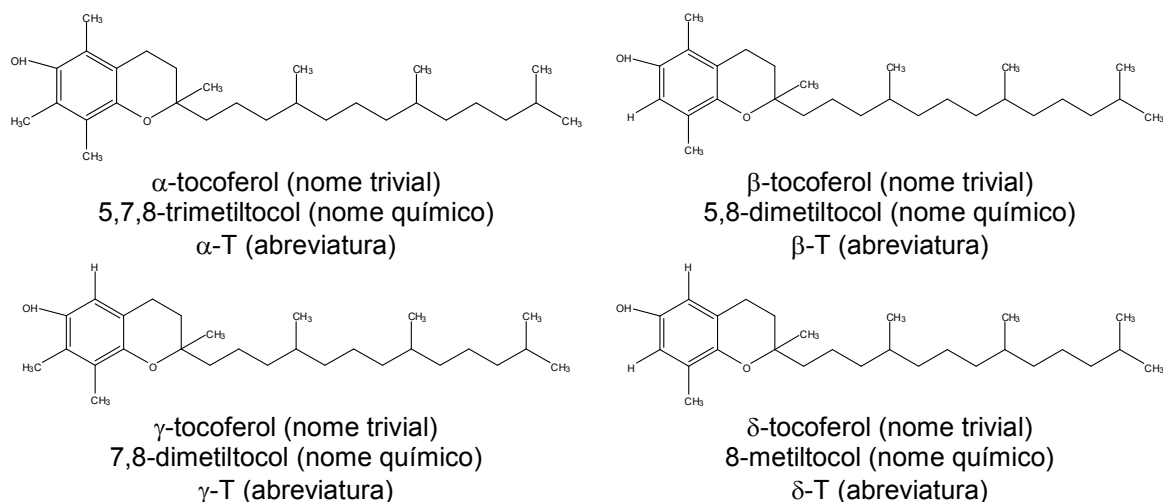


Figura 3. Estrutura dos isômeros de tocoferol

Na natureza, os tocoferóis ocorrem em óleos de cereais e sementes, frutos, vegetais e grãos em geral. Nos alimentos são encontrados nas margarinas e derivados, molhos, sobremesas e acompanhamentos. Já nos tecidos animais, as principais reservas de vitamina E são nos adipócitos e na derme (MACHLIN, 1984). Na dieta de humanos e animais, todas as formas de vitamina E estão presentes, destacando-se o α -tocoferol, que é o principal isômero na dieta e o γ -tocoferol, que atualmente tem apresentado potente efeito antioxidante (ESKIN & SNAIT, 2006). A contribuição de tocoferóis por óleos e gorduras na dieta humana é altamente significativa, pois além de serem consumidos diretamente na alimentação, são utilizados como matéria-prima para a produção de alimentos. Portanto, além de atuar como vitamina e antioxidante em seres vivos, os tocoferóis são importantes aditivos antioxidantes na indústria de alimentos, auxiliando a estabilidade durante o armazenamento e processamento destes (LAMPI *et al.*, 2002).

3.3.2 Metabolismo e Papel Biológico da Vitamina E

A vitamina E foi considerada, primeiramente, como um fator essencial para evitar a esterilidade, depois chamou a atenção por seu efeito antioxidante, atuando na proteção das membranas biológicas e inibindo a oxidação de ácidos graxos insaturados. É constituída de moléculas que apresentam duas propriedades importantes: vitamínica e antioxidante (MACHLIN, 1984; EITENMILLER & LANDEN Jr., 1999).

A atividade biológica dos isômeros de tocoferol anteriormente era dada pelo teste de reabsorção fetal em ratos, entretanto com o reconhecimento da seletividade dos isômeros através da ação da proteína de transferência do α -T (α -TTP), atualmente determina-se o requerimento para humanos usando o isômero α -T. Assim, a atividade biológica *in vivo* é diferenciada para cada isômero, sendo α -T > β -T > γ -T > δ -T, podendo variar sua atividade e proporção nas diferentes matrizes biológicas (EITENMILLER & LEE, 2004).

A absorção da vitamina E da dieta depende da digestão e absorção dos lipídios, ela é feita no intestino juntamente, sendo que o α -T é melhor absorvido que os outros isômeros. No enterócito, a vitamina E é incorporada aos quilomícrons, que são transportados pelo sistema linfático até a corrente sangüínea. Este transporte é feito para o fígado de forma rápida, sendo que pequena quantidade de vitamina E é liberada dos quilomícrons pela lipoproteína lipase, na superfície das células endoteliais e o restante é incorporado à VLDL. Assim, a vitamina E é liberada novamente na corrente sangüínea, mantendo o equilíbrio sérico de forma dinâmica, sendo transportada novamente para o fígado por outras lipoproteínas. Já nas células-alvo, a absorção pode ocorrer por 2 formas: por liberação pela lipoproteína lipase com base no endotélio ou por endocitose de LDL através de receptores (figura 4).

Uma vez absorvida, seu armazenamento é feito nos músculos e tecido adiposo (mais de 90%). A proporção entre os isômeros permanece com prevalência do α -T, principalmente devido à existência de um gene que codifica a α -TTP, fazendo com que ele seja incorporado preferencialmente pela VLDL, enquanto que os outros isômeros sejam excretados com a bile (BIESALSKI &

GRIMM, 2007). Portanto, é a afinidade relativa dos análogos de tocoferol pela α -TTP que gera um grau de competição para os isômeros: α -T 100%, β -T 38%, δ -T 9% e γ -T 2%. Como resultado desta afinidade, a meia-vida do α -T na circulação é de 48h e a dos outros isômeros varia entre 13 e 15h. Assim, o nível adequado de α -T no corpo depende da disponibilidade na dieta e da expressão da α -TTP no fígado (AZZI, 2004).

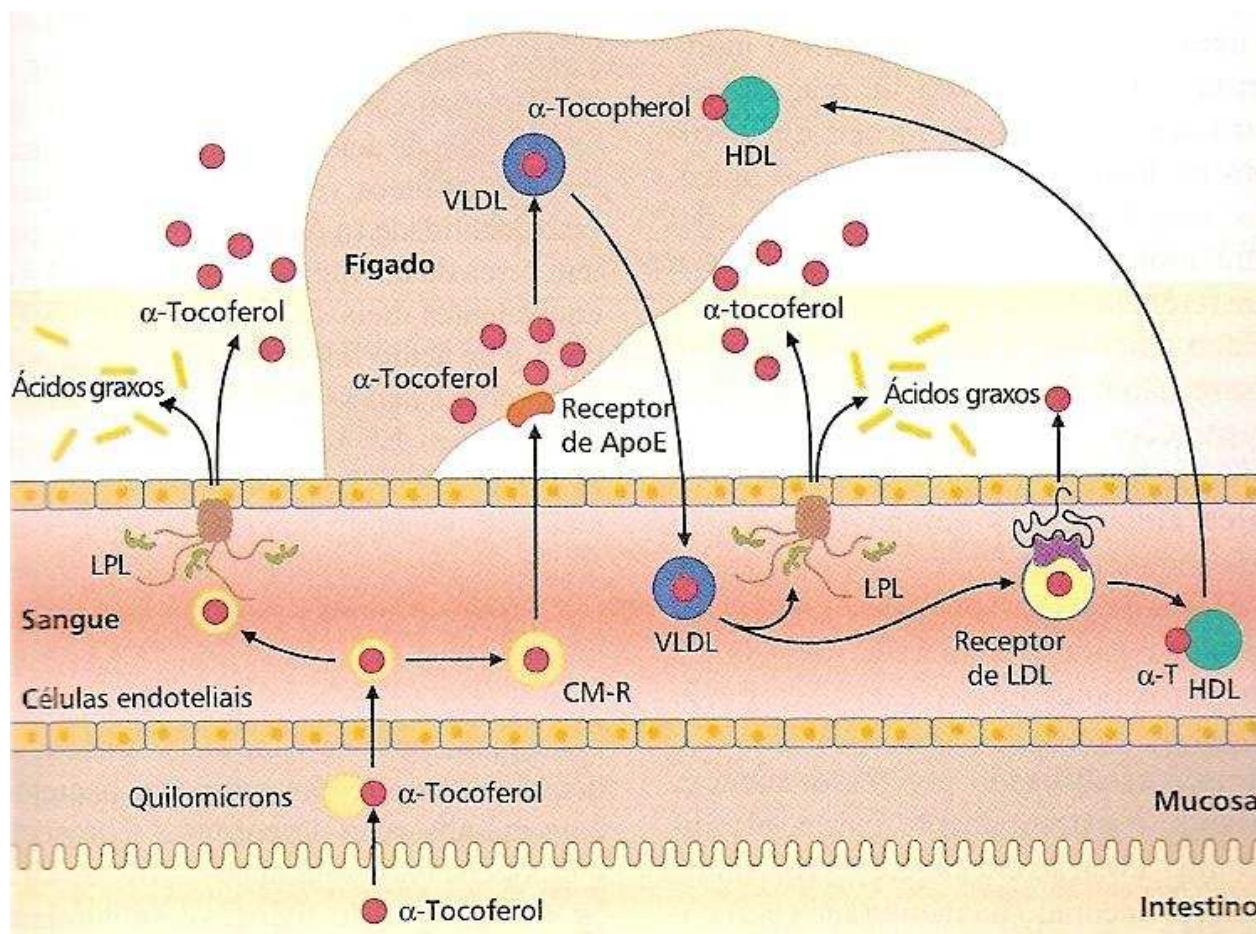


Figura 4. Metabolismo da vitamina E

FONTE: BIESALSKI & GRIMM, 2007

3.3.2.1 Vitamina E e o Estresse Oxidativo

Os radicais livres (RLs) são definidos como espécies químicas de existência independente e que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Sua geração ocorre quando moléculas orgânicas passam por clivagem das pontes

covalentes e cada fragmento retém 1 elétron do par original. Este processo produz 2 RLs com carga negativa e habilidade de reagir com 1 elétron de outra molécula. Também pode ser gerado quando uma molécula não radical captura 1 elétron de outra molécula doadora de elétrons. No metabolismo normal, uma ampla variedade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas, ambos podendo gerar RLs (EITENMILLER & LEE, 2004).

Desde a geração dos RLs vários antioxidantes hidro e lipossolúveis são requeridos para limitar o dano celular. O antioxidante tem a propriedade de neutralizar a ação oxidante de uma molécula instável (RL), sem perder a própria estabilidade eletroquímica. Para tanto, precisam ser capazes de doar radicais de hidrogênio para reduzir os RL à espécies químicas não radicais, tornando-se radicais antioxidantes oxidados (JENSEN *et al.*, 1998; EITENMILLER & LANDEN Jr., 1999; FACCO, 2002).

Em relação aos tocoferóis, sua atividade antioxidante é principalmente devido a sua habilidade de doar H do anel fenólico para o RL lipídico, tornando-se um radical inativo (EITENMILLER & LEE, 2004). A figura 5 apresenta esquematicamente as reações que envolvem esta ação antioxidante, onde inicialmente por processos metabólicos ou exposição à luz, calor e/ou químicos, formam-se os RLs no organismo. Quando um ácido graxo poliinsaturado (LH) é atacado por um radical (RO^*), um dos seus átomos de H é removido, resultando em um radical lipídico faltando um elétron, altamente reativo (L^*). Quando este liga-se ao O_2 , forma-se um radical peróxido lipídico (LOO^*), que é muito reativo e causa danos à membrana celular. Por sua vez, o mesmo reage com outro LH e forma um hidroperóxido lipídico estável ($LOOH$). Assim, com esta transferência do átomo H, vão se formando mais L^* , correspondendo a fase de propagação da oxidação, que rapidamente pode destruir a membrana biológica.

A vitamina E pode parar a fase de iniciação, onde o LH perde H^+ para um RL, e a fase de propagação, onde o radical peróxido segue retirando H^+ do LH, resultando em um hidroperóxido lipídico estável ($LOOH$) e um radical de vitamina E (Vitamina E^*) ancorado na membrana celular. Portanto, ela freia a reação em

cadeia do processo oxidativo e sua forma de radical pode ser regenerada pela vitamina C. Ocorre a migração do radical α -tocoferoxil da bicamada lipídica à superfície da membrana, onde é regenerado à α -T, através da interação com redutores hidrossolúveis (como o ascorbato) que doam H para o radical (EITENMILLER & LEE, 2004).

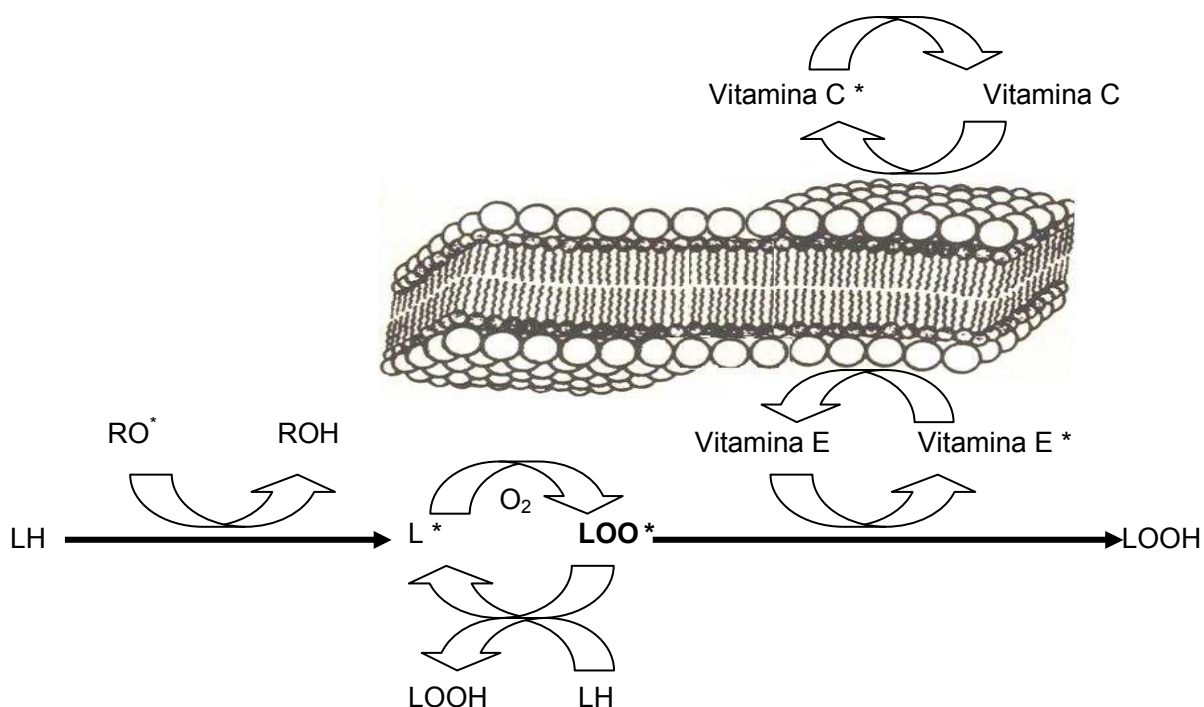


Figura 5. Ação antioxidante da Vitamina E e sua reciclagem pela Vitamina C

Fonte: EITENMILLER & LEE (2004) com adaptações

Devido sua propriedade molecular e orientação dentro da membrana da célula, o α -T é o principal antioxidante celular. Ele é reconhecido tanto como um antioxidante, como também um componente significativo de estabilidade da membrana, pois ocorrem interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre o anel cromanol, a cadeia fitol e os AG. Estas interações estabilizam a membrana e posicionam o anel cromanol para facilitar a doação do átomo de H para o RL. Ressalta-se que o γ -T também tem um grande poder antioxidante, e embora tenha

menor capacidade de doar hidrogênio, atua em maior número de sistemas lipídicos (EITENMILLER & LEE, 2004).

Além deste seqüestro de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro, os tocoferóis podem apresentar efeitos benéficos no trato gastrointestinal, pois se ligam com ferro pró-oxidante e inibem as ciclooxigenases e lipoxigenases. Portanto, seu retorno do trato gastrointestinal pelo fígado, através da bile pode ser fisiologicamente vantajoso (HALLIWELL *et al.*, 2005).

Os tocoferóis e outros antioxidantes têm despertado o interesse dos consumidores em todo o mundo por prevenirem uma série de reações de oxidação no organismo humano. A oxidação é prejudicial ao homem, pois favorece o desenvolvimento de doenças (EITENMILLER & LANDEN Jr., 1999). Evitando as lesões oxidativas de lipídios, diminuem a formação de hidroperóxidos. Com isto, as membranas celulares, especialmente aquelas ricas em lipídeos insaturados (mitocôndria, retículo endoplasmático e membranas plasmáticas), são protegidas da lipoperoxidação (JENSEN *et al.*, 1998; LAGE *et al.*, 2003), que podem causar inflamações e influenciar doenças como artrite, aterosclerose e câncer, além de rupturas na membrana celular, polimerização de proteínas, mutação no DNA e alterações das plaquetas e dos macrófagos (BIANCHINIPONTUSCHKA & PENTEADO, 2003). A oxidação dos lipídios também tem relação com doenças cardiovasculares, através da oxidação de lipoproteínas sangüíneas e desenvolvimento de aterosclerose, e catarata, devido aos danos oxidativos nas membranas oculares. Um dos aspectos estudados para sanar estas doenças é a suplementação alimentar com vitamina E, visando a existência de uma diferença razoável entre as doses ingeridas e os níveis necessários para a proteção de doenças crônicas (BLOCK & LANGSETH, 1994; EITENMILLER & LANDEN Jr., 1999).

Em alimentos, um dos fatores que provocam alterações durante processamento, distribuição e armazenamento é a oxidação lipídica, as quais influem em sua qualidade. A qualidade nutricional, por exemplo, pode ser diminuída pela perda de vitaminas (A, D, E, K e C), ácidos graxos e aminoácidos essenciais, enquanto vários compostos de degradação, associados à oxidação de

lipídios, podem ser capazes de reagir com biomoléculas como proteínas, diminuindo sua absorção (FERRARI, 1998). A presença de peróxidos pode afetar a cor, descolorindo carotenóides, mioglobinas, antocianinas e clorofilas (FERNÁNDEZ *et al.*, 1997). Os antioxidantes artificiais, utilizados pela indústria de alimentos para retardar e prevenir a deterioração oxidativa dos seus produtos são: BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol), e TBHQ (terc-butilhidroquinona), entre outros os tocoferóis além de serem naturais, apresentam vantagens como: menor volatilidade, elevada solubilização em óleos e maior estabilidade térmica (POKORNÝ & KORCZAK, 2001).

3.3.2.2 Funções Não Antioxidantes dos tocoferóis

Outras funções não ligadas a este papel antioxidante também já são demonstradas, como prevenção da aterosclerose, a inibição ou aumento da atividade de certas enzimas e o controle da expressão de genes como o da α -tropomiosina, embora os mecanismos para tais funções ainda não estejam esclarecidos (BIANCHINIPONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

Existem funções não antioxidantes do α -T que não podem ser cumpridas por outros isômeros. Estas funções têm sido intensamente estudadas e sugerem que a habilidade dos humanos em selecionar α -T de uma mistura de tocoferóis da dieta, indicam uma seleção evolutiva do α -T para papéis não antioxidantes. Este aspecto do envolvimento do α -T é altamente significativo para entender o início de uma doença crônica. Estudos indicam que a base do conhecimento nos mecanismos de controle molecular é atribuída à vitamina E na infância (EITENMILLER & LEE, 2004). A atuação do α -T se dá através da sinalização celular ao nível pós-transcricional ou de expressão gênica. Como um modulador da sinalização celular, o α -T inibe os principais eventos que levam a inflamação e aterosclerose, como a inibição da proteína kinase C (PKC). Este isômero não se liga a esta proteína como faz a maioria dos inibidores de enzimas, ele atua após a transcrição gênica, pela ativação da fosfatase (PP_{2A}), que desfosforila a PKC. Existem respostas fisiológicas específicas reguladas, pelo menos em parte, pela

atuação do α -T na PKC, incluindo proliferação celular, adesão e agregação plaquetária, aumentando a resposta imune, produção de RLs e expressão gênica, que é atualmente aceita como uma função regulatória primária do α -T (AZZI, 2004).

3.3.3 Estabilidade da Vitamina E

Os tocoferóis são facilmente oxidados na presença de calor, luz, metais e álcalis. Entretanto, oxidam-se muito vagarosamente em atmosfera de oxigênio na ausência de luz. Na ausência de oxigênio, eles também são resistentes a álcalis e ao tratamento térmico superior a 200°C. Na presença de oxigênio, a estabilidade do α -T diminui pela metade a cada 10°C acima de 40°C (LAMPI *et al.*, 2002). O processo de fritura destrói a maioria do tocoferol presente, mas não há perda por extração na cocção, pois são insolúveis em água (EITENMILLER & LEE, 2004).

Nas etapas do processo de refino de óleos vegetais, os tocoferóis são, parcialmente, perdidos. JUNG *et al.* (1989) relatam que estas perdas são de 5% na degomagem, 7% na neutralização, 12% no branqueamento e 32% na desodorização. A decomposição durante o armazenamento do óleo acontece devido à influência da exposição à luz.

Ésteres de tocoferóis (derivados de acetato ou succinato) são mais estáveis à oxidação do que os tocoferóis livres, por isso os tocoferóis são, frequentemente, adicionados em alimentos na forma esterificada para prevenir a oxidação pelo ar durante o processamento e o armazenamento, mas não tem atividade antioxidante, a não ser que sejam hidrolisados (LAMPI *et al.*, 2002). Depois do consumo, ele é hidrolisado no corpo humano, e o produto da hidrólise é absorvido, atravessa pelas paredes do intestino e pode, então, atuar como um antioxidante na corrente sanguínea (POKORNÝ *et al.*, 2001).

3.3.4 Deficiência e Toxicidade da Vitamina E

Os valores de recomendações nutricionais para vitamina E, de acordo com as *Dietary Reference Intakes* (DRIs) da FOOD AND NUTRITION BOARD (2002),

encontram-se na tabela 2, sendo que a ingestão diária varia conforme a idade, o sexo e o estado fisiológico do indivíduo.

Tabela 2. Ingestão alimentar de referência (DRI) de vitamina E por dia e níveis de ingestão máxima tolerável de acordo com a faixa etária

Fase de vida		Vitamina E	
		RDA ^a (mg/dia)	UL (mg/dia)
Infantes	0 – 6 meses	4*	nd
	7 – 12 meses	5*	nd
Crianças	1 – 3 anos	6	200
	4 – 8 anos	7	300
Adolescentes	09 – 13 anos	11	600
	14 – 18 anos	15	800
Adultos	≥19 anos	15	1000
Estado Fisiológico			
Gravidez	14 – 18 anos	15	800
	≥19 anos	15	1000
Lactação	14 – 18 anos	15	800
	≥19 anos	19	1000

RDA – Quota diária recomendada (*Recommended Dietary Allowances*)

UL – Níveis de Ingestão máximo tolerável (*Tolerable Upper Intake Levels*) nd – não determinado

*AI – Ingestão Adequada (*Adequate Intakes*)^a – Como α -tocoferol (RRR e os 2R estereoisômeros) Fonte: FOOD AND NUTRITION BOARD (2002)

São raras as deficiências de vitamina E, mas quando ocorrem, são associadas com a má absorção ou anormalidades no transporte de lipídios. Em animais pode causar distrofia muscular, anormalidades no sistema vascular e esterilidade. Em humanos, a deficiência está associada à anemia hemolítica; aumento da susceptibilidade dos eritrócitos à hemólise peroxidativa e neuropatia

(BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003). A deficiência também pode ser por anormalidade genética na produção da proteína α -TTP, síndrome de mal-absorção de lipídios e mal-nutrição de proteína e energia. As anormalidades genéticas no metabolismo de lipoproteínas podem produzir baixos níveis de quilomícrons, VLDL e LDL, e com isto, afetam a absorção e transporte de vitamina E (EITENMILLER & LEE, 2004).

Em relação a toxicidade, observou-se que animais que receberam altas doses orais de vitamina E não apresentaram efeito teratogênico, mutagênico ou carcinogênico. Humanos com doses acima do recomendado pelas DRIs não apresentaram efeitos colaterais (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

3.4 Interesse na Utilização de Tocoferóis Naturais

Muitos alimentos têm sido enriquecidos com tocoferóis, dentre eles pode-se mencionar os óleos comestíveis (POKORNÝ *et al.*, 2001), as margarinas *light*, que com a diminuição do teor de gordura também têm menor teor de vitaminas lipossolúveis, e as maioneses *light* que são fortificadas com acetato de α -tocoferol (EITENMILLER & LANDEN Jr., 1999). MARTINS *et al.* (2006a), apesar de não especificarem os tipos de alimentos enriquecidos com tocoferóis, comentam que misturas de tocoferóis com teor superior a 60% são largamente utilizadas pelas indústrias.

Os tocoferóis, utilizados como suplementos de alimentos ou na produção de nutracêuticos, podem ser obtidos tanto por extração de fontes naturais quanto por síntese química. A preparação de substâncias naturais é mais complexa do que a preparação de substâncias sintéticas, pois os antioxidantes sintéticos são produzidos como substâncias puras de composição constante e os antioxidantes naturais estão disponíveis em diversas fontes, com composição variável que depende da planta, técnica de cultivo, condições climáticas e maturidade (POKORNÝ & KORCZAK, 2001). Atualmente, existe uma preferência dos consumidores por produtos naturais, além de restrições encontradas pelos

produtos sintéticos. Por estes motivos, o interesse na concentração de moléculas naturais de tocoferóis tem crescido acentuadamente nos últimos anos, sendo muito importante promover o desenvolvimento de técnicas de concentração de tocoferóis.

3.4.1 Utilização de Tocoferóis na Suplementação

A vitamina E não pode ser sintetizada nos animais, portanto a presença desta em tecidos reflete a disponibilidade na dieta. Devido às características de lipossolubilidade da vitamina E, sua absorção é dependente da habilidade dos animais digerirem e absorverem gordura. Devido suas propriedades químicas, ela tende a se acumular nas lipoproteínas, no tecido adiposo e nas membranas celulares, onde ocorre a maioria das reações de oxidação envolvendo o oxigênio molecular e a formação de radicais livres (JENSEN *et al.*, 1998). A absorção dos tocoferóis é ineficiente e controlada por difusão passiva. Somente cerca de 20 a 40% do α -T ingerido é absorvido. A máxima absorção ocorre no intestino delgado e depende de emulsificação dos lipídios, solubilização, difusão através da camada de água, permeação pelos eritrócitos, incorporação às partículas de lipoproteínas e transporte da mucosa para a circulação (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

Usualmente, a vitamina E é incorporada na dieta como acetato de α -T e não tem função como antioxidante antes que seja desesterificada no trato gastrointestinal (BUCKLEY *et al.*, 1995). Por isto, a adição *post-mortem* de α -T à carne bovina não é efetiva como na suplementação da dieta, porque não é incorporado diretamente dentro da membrana onde a oxidação dos lipídeos é iniciada (MITSUMOTO *et al.*, 1993).

Os níveis sanguíneos são muito utilizados como critério de avaliação da absorção de vitamina E, porque apenas os estudos de balanço intestinal e medidas de distribuição no tecido e curvas de tolerância, não são suficientes para isto. Entretanto, pode-se obter baixas estimativas, devido a rápida remoção do tocoferol do plasma para os tecidos. Por sua vez, esta concentração nos tecidos varia grandemente, dependendo do tempo decorrido após a administração

(GALLO-TORRES, 1980), o tecido adiposo, o fígado e o músculo são as principais áreas para o depósito da vitamina E. O consumo de quantidades elevadas desta vitamina aumenta seu nível em todos os tecidos, já que a vitamina E sofre uma degradação muito pequena no corpo (AZZI, 2004).

Em primatas, a suplementação de vitamina E associou-se à redução da progressão das lesões ateroscleróticas da carótida, num período de três anos. Entretanto, não alterou a histologia das lesões (GRAZIANO *et al.*, 1992). Já para experimentos com perus, a suplementação com 200 mg/kg de α -tocoferil acetato, durante 2 a 3 semanas foi adequada para promover o aumento de vitamina E na carne de sobrecoxas, mas os efeitos de estabilidade na cor dos produtos não foram aprovados sensorialmente por julgadores treinados (NEVES, 2001).

A suplementação com vitamina E no gado de corte aumenta a concentração muscular de tocoferol para que ele exerça sua função biológica como antioxidante e proteja os lipídios de membrana, principalmente os fosfolipídios (JENSEN *et al.*, 1998). A ação antioxidante do tocoferol é observada após algum tempo de suplementação, quando se eleva o nível de tocoferol no plasma e nos vários tecidos, ocorrendo então, a incorporação nas membranas celulares (FACCO, 2002). A estratégia de suplementar gado de corte é para adquirir concentração muscular de α -T suficiente para chegar ao máximo da eficácia antioxidante. Uma suplementação em maiores níveis para saturar o músculo bovino renderia um pequeno benefício relativo a um grande custo. O ideal seria uma concentração mínima que aproximasse da supressão máxima de oxidação lipídica (LIU *et al.*, 1995). Portanto, o direcionamento das pesquisas envolvendo dieta suplementar de vitamina E concentra-se na habilidade de retardar a oxidação lipídica em espécies animais. Ressalta-se que há diferenças em relação a biodisponibilidade para as diferentes formas de vitamina E. Comparando-se os isômeros α e γ -tocoferóis, percebe-se que apesar do α -T apresentar a maior biopotência, o γ -T é predominante em muitas fontes, podendo sua ingestão ser superior de duas a quatro vezes à do α -T (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

3.4.2 Tocoferóis do DDOS como Suplemento

Os produtos de origem animal são pobres em vitamina E e, há 50 anos é fato sabido que esta vitamina é imprescindível ao funcionamento normal de células vegetais e animais (UEDA & IGARASHI, 1990). Como suplemento de ratos, a vitamina E, exerce um efeito protetor contra a peroxidação lipídica (nível de TBARS e do índice de peróxido) no sangue e no fígado, não interferindo no perfil lipídico dos animais durante o período de suplementação (ALMEIDA, 2003).

Muitos trabalhos têm buscado a suplementação de rações com vitamina E sintética, porém, no caso de frangos de corte, isto acarreta em aumento no custo da ração, e como esta representa 70% do custo total de produção (NEVES, 2001), nota-se que existe a necessidade de busca de fontes alternativas de tocoferóis, como a proveniente do DDOS, de modo que exista a suplementação, sem o encarecimento do produto final. A vitamina E, presente no DDOS é eficiente na proteção à oxidação dos lipídios hepáticos de ratos Wistar, entretanto os resultados são inferiores aos obtidos com a suplementação de vitamina E sob a forma de fármaco, salientando-se que o DDOS não apresenta toxicidade aos animais (MORAES *et al.*, 2004).

A aplicação de DDOS intra-ruminal em bovinos Nelore, e avaliação da absorção e incorporação de vitamina E em diferentes tecidos encontrou como resultado um incremento da concentração de vitamina E no fígado, no músculo e na sua gordura de cobertura, além de uma melhor estabilidade da cor da carne e maior estabilidade oxidativa da gordura. A aplicação de uma dose única de DDOS em bovinos acarretou em um aumento de até 4 vezes na concentração plasmática de vitamina E, em comparação com os animais controle. Em consequência desta elevação dos níveis de tocoferol plasmático, ocorre um aumento dos níveis de tocoferol nos diferentes tecidos. Assim, a utilização do DDOS *in natura* é uma alternativa que tem se mostrado de baixo custo e eficiente na incorporação de tocoferóis aos tecidos, trazendo benefícios aos animais e aos consumidores da carne proveniente destes animais (BORHER *et al*, 2002). Além disto, o emprego do DDOS elimina os custos acarretados pela extração e concentração da vitamina E, que limitam a utilização de suplementos para a alimentação animal.

3.4.3 Possíveis Efeitos Adversos da Suplementação com DDOS

O DDOS é um produto heterogêneo muito complexo, contendo em sua composição vários compostos químicos. Entretanto, o único componente que é sabidamente prejudicial à saúde são os AGL, pois seu acúmulo nas células promove alterações na permeabilidade da membrana celular, além de dano mitocondrial. Estas disfunções celulares iniciam o processo de apoptose, ou seja, levam à morte celular (SANTOS *et al.*, 2006; OKOSHI, *et al.*, 2007). Portanto, para avaliar os efeitos adversos do DDOS, isto é, sua toxicidade são necessários métodos que verifiquem danos hepáticos, hematológicos, oxidativos e genotóxicos, além de análises mais simples, como verificação do comportamento dos animais suplementados com o produto.

A análise das transaminases séricas GPT (transaminase glutâmico pirúvica) e GOT (transaminase glutâmico oxaloacética), assim como as bilirrubinas séricas levam a indicação de dano hepático. A enzima sérica GOT é encontrada no coração, fígado, músculo esquelético, rim, cérebro, pâncreas, baço e pulmões. Portanto, na ocorrência de danos em quaisquer destas células, os teores da enzima irão se apresentar elevados. Por isto, não é um bom parâmetro individual para teste de função hepática, neste caso a GPT é o melhor parâmetro, sua principal aplicação está no diagnóstico da destruição hepatocelular, caso ocorra dano nas células hepáticas a enzima estará acentuada. Nos hepatócitos, a enzima GOT está dentro da mitocôndria, enquanto que a GPT está localizada em outra parte do citoplasma, por esta razão o dano hepatocelular grave apresenta níveis mais elevados de GOT. Mesmo assim, ela se apresenta em quantidade moderada nos rins e em pequenas quantidades no coração e músculo esquelético (OLIVEIRA LIMA *et al.*, 1985).

A bilirrubina por sua vez, é o principal produto do catabolismo da hemoglobina, quando está elevada indica dano hepatocelular inflamatório, tóxico ou neoplásico, ou obstrução biliar. As bilirrubinas totais se dividem em indiretas e diretas. As bilirrubinas indiretas (não conjugadas) são formadas no organismo derivadas da hemoglobina das hemáceas, por serem lipossolúveis, ligam-se a albumina para irem até o hepatócito, então são captadas e transportadas por um

complexo protéico-pigmentar até o retículo endoplasmático liso, onde são conjugadas ao ácido glicurônico, formando as bilirrubinas diretas ou conjugadas (hidrossolúveis). Quando as bilirrubinas indiretas estão elevadas indicam dano hepático ou anemia hemolítica, já as diretas indicam obstrução biliar (OLIVEIRA LIMA *et al.*, 1985).

Dentro da rotina hematológica, o exame mais utilizado é o hemograma, que se caracteriza por ser uma avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos do sangue, podendo ser dividido em 3 partes conforme o enfoque: *Eritrograma*, que estuda as alterações na série vermelha (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, índices globulares e morfologia eritrocitária); *Leucograma*, que estuda a série branca, ou seja, a contagem total dos leucócitos (leucometria), e sua morfologia (diferencial); *Plaquetograma*, que faz uma estimativa do número de plaquetas e estuda sua morfologia. Seus resultados indicam alterações nas células sangüíneas causadas pela exposição a algum agente prejudicial (RAPAPORT, 1990).

Em relação ao estado oxidativo, percebe-se que a produção de radicais livres faz parte do metabolismo humano, entretanto, quando esta produção é exagerada e os mecanismos antioxidantes do organismo não conseguem controlar e restabelecer o equilíbrio metabólico, ocorre o estresse oxidativo e o dano celular. Para isto, existem os marcadores de dano oxidativo, neste caso, os marcadores de peroxidação lipídica, dentre os quais ressaltam-se o malonaldeído (MDA) e as isoprostanas (8-iso-PGF₂ α).

O MDA é um produto formado na oxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de AG poliinsaturados como o linoléico e araquidônico. É uma substância tóxica, que pode levar a processos deteriorativos no homem, incluindo o envelhecimento. Atualmente é considerado um promissor biomarcador geral de dano oxidativo, e é facilmente medido pela reação com o ácido 2-tiobarbitúrico - TBA (FACCO, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Por sua vez as isoprostanas são eicosanóides de origem não enzimática, sua formação ocorre *in vivo* pela oxidação do ácido araquidônico. São produtos estáveis e por isto sua quantificação desperta interesse como biomarcador de dano oxidativo. Sua

formação ocorre no fígado e depois vão para a circulação sangüínea, assim existe correlação clara entre patologias no fígado e o nível de isoprostanas no plasma (SCHRIJVERS *et al.*, 2004). Ressalta-se, sobretudo, que sua formação é modulada pelo estado antioxidante do organismo estudado e não é afetada pelo teor de lipídios da dieta (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A análise de micronúcleos caracteriza-se como um teste citogenético cujos resultados evidenciam quebras no material genético, ocasionadas pela ação genotóxica de algumas substâncias. Sua finalidade está ligada a possíveis efeitos colaterais gerados pelos componentes formadores do DDOS, bem como, a ação protetora promovida pelos tocoferóis a danos genotóxicos. O teste *in vivo* em roedores tem sido largamente utilizado para detectar e mensurar estes danos. A avaliação dos MNs, também chamados de corpúsculos de Howell-Jolly, é o teste primário de genotoxicidade e é recomendado pelas agências reguladoras mundiais para ser parte de uma avaliação de segurança dos produtos (OECD, 2005).

Para a identificação e contagem dos micronúcleos foram seguidos os critérios de aceitação de Picker & Fox (*apud* RABELO-GAY *et al.*, 1991), que são:

- O micronúcleo deve ter contorno regular, redondo ou oval, e estar dentro do citoplasma de uma célula;
- O micronúcleo deve ser Feulgen-positivo, de intensidade igual ou menor e ter a mesma textura e refração do núcleo principal;
- O micronúcleo deve estar no mesmo plano de foco.

O tecido alvo, no caso a medula óssea, é um órgão hematopoiético, onde as células-tronco são a base da eritropoiese com diferentes estágios de diferenciação e maturação. Na proliferação, as células continuam a divisão e é onde o agente xenobiótico a ser testado, pode atuar e causar dano nos cromossomos. Estas anomalias (cromossomo inteiro ou fragmentos) podem ficar para trás durante a divisão da célula, não se tornando integrante do núcleo da célula filha, formando um MN visualizado no citoplasma (RIBEIRO *et al.*, 2004). Durante a maturação, quando o eritroblasto se desenvolve em PCE (eritrócito policromático - que ainda tem RNA ribossomal, é basófilo e imaturo), o núcleo

principal é expelido e qualquer MN que tenha sido formado pode remanesecer dentro do citoplasma anucleado. O aumento na frequência de PCEMN é uma indicação de indução no dano cromossomal. Com a maturação, os PCE perdem RNA e tornam-se NCE (sem RNA ribossomal, é acidófilo, maduro e menor que PCE) (KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 2005).

O período entre a absorção da substância pelo animal, sua metabolização, complementação dos estágios do ciclo de divisão celular e o aparecimento de MN nos PCE da medula óssea é de no mínimo 6 horas, sendo que cerca de 12 – 24 horas depois da absorção, os PCE da medula correspondem aos descendentes das células expostas ao agente testado e os PCE pré-existentes se movem para a circulação periférica tornando-se NCE. Assim os PCEMN vão lentamente se transformando em NCEMN. A variação da frequência de MN é uma função complexa de muitos fatores e o tempo preciso para a observação da frequência máxima induzida não pode ser previsto. Na maioria dos casos, o pico se dá em torno de 24 – 60 horas após o tratamento (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Assim, utilizando estas análises como ferramenta, pode-se avaliar um possível efeito prejudicial, causado pelos componentes do DDOS, aos animais que se submeterem à suplementação com este produto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Neutralização e Caracterização do DDOS

De acordo com a literatura, na etapa de neutralização, os parâmetros importantes ao processo são: temperatura, concentração e tempo de contato entre o produto e o álcali, além do tipo de álcali empregado (MORAIS *et al.*, 2001). O estudo da neutralização foi baseado no processo *short mix*, que é feito industrialmente no óleo de arroz (alta concentração de álcali, alta temperatura e baixo tempo de homogeneização), pois é um processo utilizado para óleos com alta concentração de AGL, onde não se utiliza o refino físico. Baseado nestes preceitos, o procedimento de neutralização do DDOS, cedido pela indústria Cargill Agrícola S.A., foi testado e adaptado de acordo com as necessidades de cada lote do produto, primeiramente com um ensaio preliminar, seguido de 2 planejamentos experimentais, conforme o esquema na figura 6.

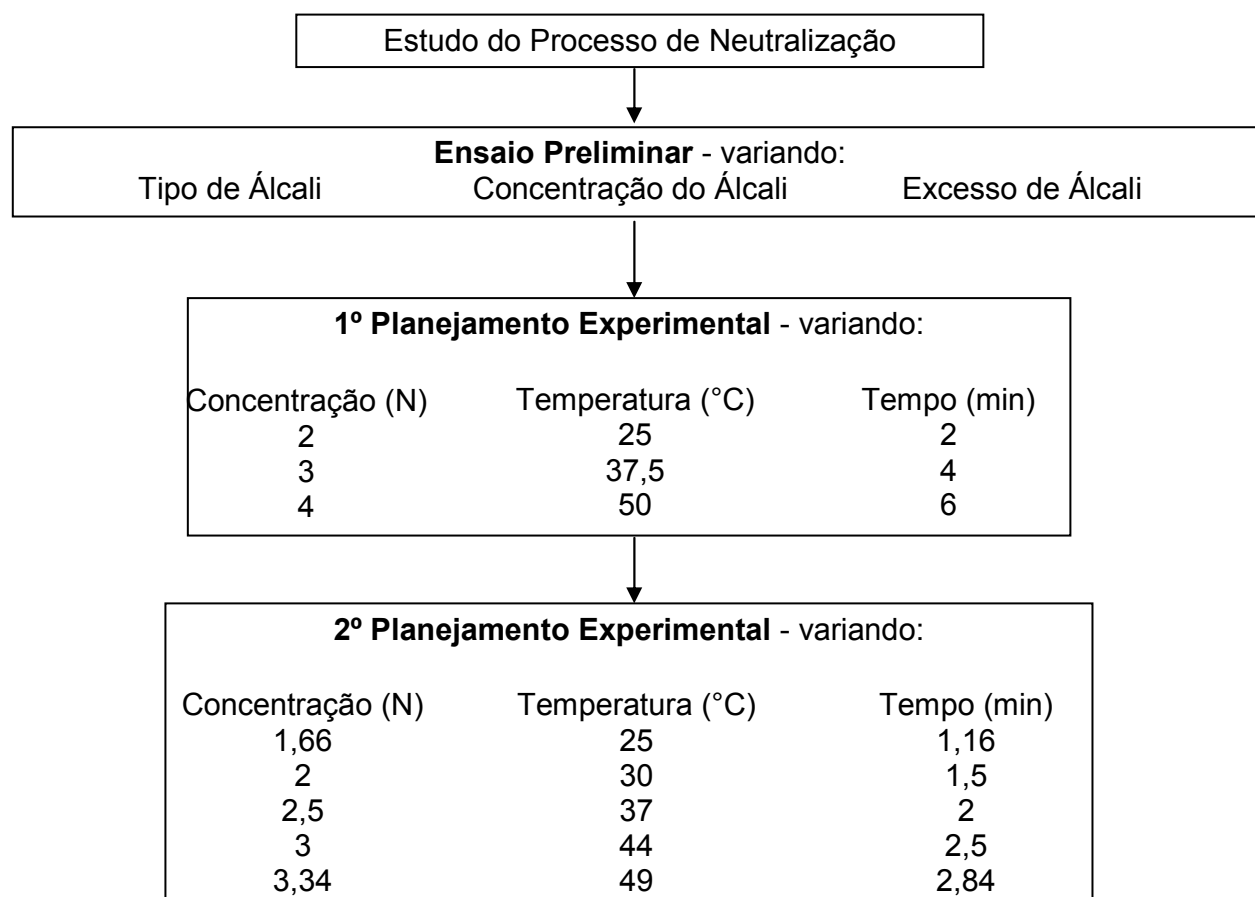


Figura 6. Delineamento da análise experimental da neutralização do DDOS

Ressalta-se que o DDOS bruto foi recebido em 4 lotes e cada um deles foi analisado e utilizado em um ensaio, sendo:

- **DDOS BRUTO I:** utilizado no ensaio preliminar da neutralização;
- **DDOS BRUTO II:** utilizado no 1º planejamento experimental da neutralização;
- **DDOS BRUTO III:** utilizado no 2º planejamento experimental da neutralização;
- **DDOS BRUTO IV:** utilizado para as análises de caracterização do DDOS neutro e como suplemento no ensaio biológico.

4.1.1 Ensaio Preliminar da Neutralização

Neste ensaio foram realizados testes sob diferentes condições variando:

- a) tipo de álcali: NaOH (ERICKSON, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2005), $Mg(OH)_2$, $Ca(OH)_2$, KOH, $NaHCO_3$, e Na_2CO_3 , estes últimos baseados em testes anteriores realizados no Laboratório de Lípidos (DEPAN-FEA-UNICAMP).
- b) concentrações do álcali: 2N e 4N;
- c) quantidade de álcali em excesso: 0,12% (ERICKSON, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2005), 10% e 20% (BHATTACHARYYA & BHATTACHARYYA, 1987), baseado na neutralização do óleo de arroz, que possui alto teor de AGL.

A neutralização consistiu na coleta de uma amostra do DDOS bruto a ser neutralizado, onde fez-se a determinação de AGL, em seguida, calculou-se a quantidade estequiométrica de álcali que devia ser adicionada ao produto, considerando-se os excessos em questão. O DDOS bruto foi pesado em becker de plástico, o álcali foi adicionado lentamente e homogeneizado vigorosamente com bastão de vidro por 2 minutos. Após esta etapa, o material foi centrifugado por 15 minutos, a 6000rpm (equivalente a 5858 x g), em temperatura ambiente (Centrífuga RC 5C SORVALL). No DDOS neutro obtido, procedeu-se a determinação dos AGL (Método 940.28: AOAC, 1995) e do teor de tocoferóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com o método Ce 8-89 (AOCS, 1998).

4.1.2 Planejamento Experimental

O planejamento experimental (fatorial 2^k) visou modificar as variáveis estudadas a fim de avaliar as alterações sofridas na resposta, objetivando o fornecimento de dados para o conhecimento dos principais fatores que exercem efeito significativo na resposta (BOX *et al.*, 1978).

Utilizou-se o *software* STATISTICA® 7.0 (STATSOFT, 2004), para se fazer os planejamentos experimentais e assim, obter as condições ótimas do processo, ou seja, melhor neutralização dos ácidos graxos livres com menor arraste dos tocoferóis.

Com o 1º planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com ponto central em quadruplicata supõe-se uma linearidade nos efeitos dos fatores e obteve-se um modelo linear. Através do 2º planejamento fatorial com pontos centrais e pontos axiais foi possível obter um modelo quadrático a fim de melhor representar a região do ponto ótimo de neutralização.

O processo de neutralização (Figura 7) baseou-se nos melhores resultados obtidos no Ensaio Preliminar e consistiu na coleta de uma amostra do DDOS bruto a ser neutralizado, onde se fez a determinação de AGL, em seguida, calculou-se a quantidade estequiométrica de álcali a ser adicionado ao produto (Na_2CO_3 – álcali com melhor desempenho no ensaio preliminar), considerando-se um excesso de 20% de álcali.

O DDOS bruto, armazenado sob refrigeração (-10°C), foi liquefeito em banho-maria (25°C) e homogeneizado com bastão de vidro, em seguida uma alíquota foi pesada em becker de plástico, sendo imerso em banho termostatzado (com temperatura de acordo com o planejamento experimental). Lentamente, adicionou-se o álcali e homogeneizou-se vigorosamente com bastão de vidro (por tempo de acordo com o planejamento). Após esta etapa, transferiu-se o becker para outro banho com temperatura de 40°C durante 3h a fim de proceder a separação de fases. Para aumentar a eficiência, o material foi centrifugado por 15 minutos, a 6000rpm (equivalente a $5858 \times g$), em temperatura ambiente (Centrífuga RC 5C SORVALL). Lavou-se o DDOS neutralizado com água quente (na proporção de 1:1) e centrifugou-se novamente sob as mesmas condições.

Após a separação da borra, obteve-se o DDOS neutro, onde se procedeu a determinação dos AGL (Método 940.28: AOAC, 1995) e o teor de tocoferóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com o método Ce 8-89 (AOCS, 1998).

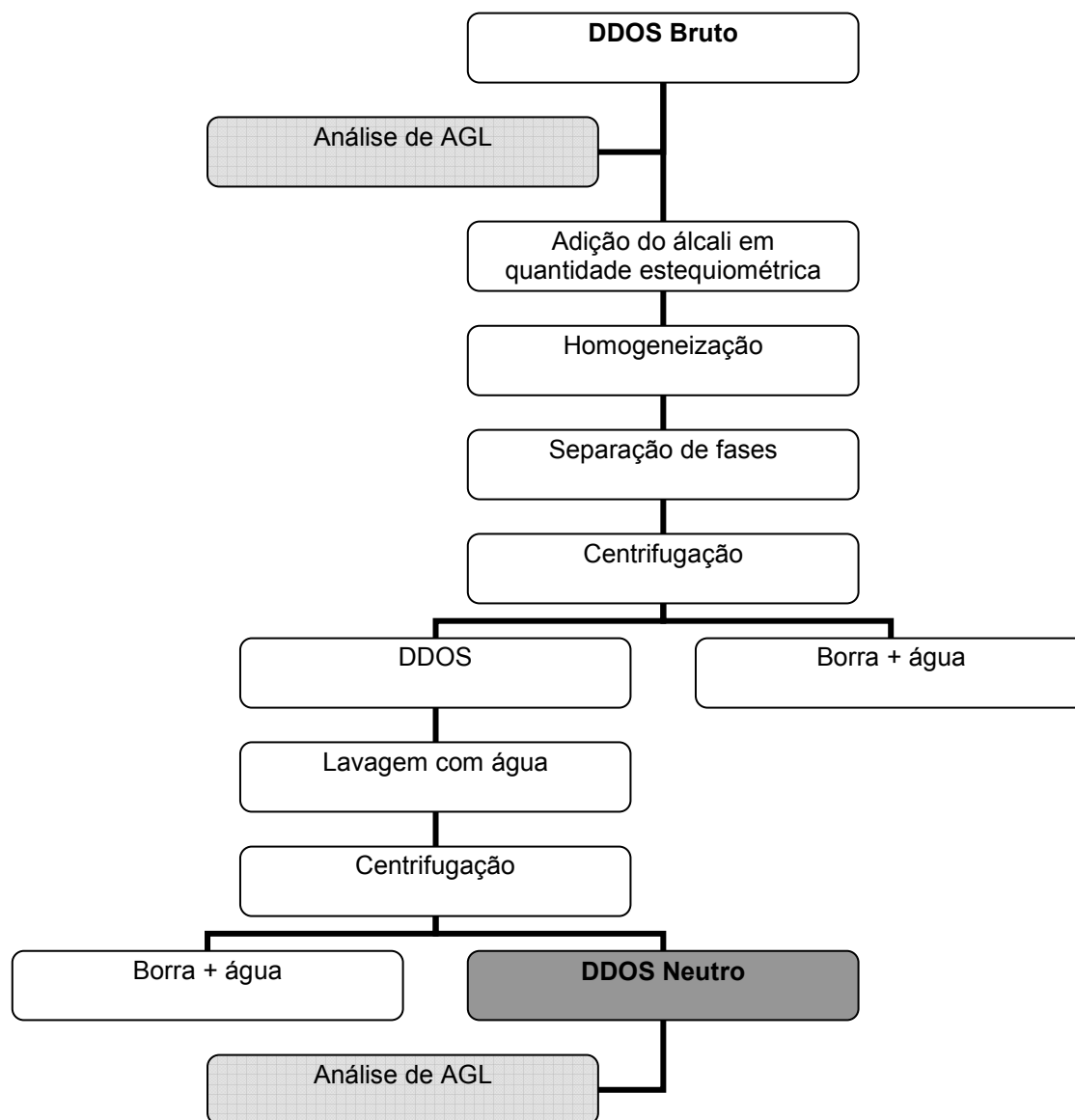


Figura 7. Fluxograma do processo de neutralização do DDOS

Baseado neste fluxograma estudou-se o processo de neutralização, variando a concentração do álcali empregado, o tempo de homogeneização e a temperatura do banho.

Conforme a metodologia de aplicação do planejamento experimental, os níveis do 1° e 2° planejamentos variaram de acordo com as tabelas 3 e 5, seguindo as matrizes apresentadas nas tabelas 4 e 6, respectivamente. Ambas foram construídas conforme BARROS NETO *et al.* (2001), sendo efetuados todos os experimentos em triplicata. As variáveis estudadas foram: concentração do Na_2CO_3 , temperatura e tempo de homogeneização. As respostas avaliadas foram: a redução de AGL, o teor de tocoferóis e rendimento em peso de DDOS neutro.

Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no 1° planejamento fatorial

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração (N) = (X1)	2	3	4
Temperatura (°C) = (X2)	25	37,5	50
Tempo (min) = (X3)	2	4	6

Tabela 4. Matriz de planejamento experimental para o 1° experimento (tipo fatorial 2^3 com ensaios em triplicata + 4 pontos centrais)

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

X1 = Concentração (N); X2 = Temperatura (°C); X3 = Tempo (min)
 Ensaios 9, 10, 11 e 12 = Pontos centrais (PC)

Tabela 5. Variáveis e níveis utilizados no 2º planejamento fatorial

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração (N) = (X1)	1,66	2	2,5	3	3,34
Temperatura (°C) = (X2)	25	30	37	44	49
Tempo (min) = (X3)	1,16	1,5	2	2,5	2,84

 $\alpha = 1,68$ Tabela 6. Matriz de planejamento experimental para o 2º experimento (tipo fatorial 2^3 com ensaios em triplicata + 6 pontos axiais e 4 pontos centrais)

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	$-\alpha$	0	0
10	$+\alpha$	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	$+\alpha$	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	$+\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

X1 = Concentração (N); X2 = Temperatura (°C); X3 = Tempo (min); $\alpha = 1,68$
 Ensaios 15, 16, 17 e 18 = Pontos centrais (PC)

A metodologia de avaliação do planejamento experimental consiste na verificação do efeito de cada variável nas respostas estudadas, dada por um coeficiente de regressão, bem como os desvios padrão obtidos através do erro puro (dado pelos resultados no ponto central). Os coeficientes de regressão foram utilizados para a construção de modelos matemáticos empíricos (Apêndice A). Para avaliar o ajuste de um modelo é utilizada a análise de variância, onde se avaliaram as previsões feitas no modelo em relação aos valores observados, obtendo-se o R^2 (coeficiente de determinação do modelo), que indica quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo às respostas observadas. Para avaliar se o modelo é significativo ou não, utilizou-se o valor de F (com seus respectivos graus de liberdade e nível de confiança), assim comparou-se o valor de F calculado com o tabelado na literatura (BARROS NETO *et al.*, 2001), sendo que quanto maior o calculado, em relação ao tabelado, mais significativo o modelo obtido.

A metodologia da superfície de resposta é baseada em planejamentos fatoriais, utiliza-se quando as variáveis de resposta são influenciadas por muitas variáveis independentes e se quer otimizar estas respostas. Ela possui 2 etapas distintas (modelagem e deslocamento), que são repetidas para atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem é feita ajustando-se modelos a respostas obtidas com o planejamento e com o modelo pode-se traçar a superfície, sendo que o deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação (BARROS NETO *et al.*, 2001). Assim, buscando-se um melhor desempenho da neutralização elaborou-se o 1º planejamento experimental e de posse de seus resultados, fez-se o 2º planejamento experimental, onde se alteraram os níveis estudados.

4.1.3 Obtenção e Caracterização do DDOS Neutro

A partir das condições ótimas de processo, estabelecidas no planejamento experimental, empregando-se cálculos estequiométricos, o DDOS bruto foi neutralizado em grande quantidade, conforme o método na figura 7, a fim de se obter DDOS neutro em quantidade suficiente para sua caracterização físico-

química e para dar prosseguimento à avaliação biológica com ratos Wistar. Entretanto, como o teor de AGL ainda foi um pouco elevado para o fornecimento aos animais, o DDOS neutro sofreu uma segunda neutralização, sob as mesmas condições, de forma a diminuir ainda mais os AGL e não causar problemas aos animais devido ao excesso do mesmo (SANTOS *et al.*, 2006; OKOSHI, *et al.*, 2007).

No DDOS bruto e neutro foram realizadas análises físicas e químicas de caracterização:

- **Teor de Tocoferóis:** Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Ce 8-89 (AOCS, 1998);

A identificação dos isômeros foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e espectro de absorção da amostra com os padrões (isômeros α , β , γ e δ -tocoferol - Calbiochem com 95% de pureza). Cada isômero de tocoferol foi diluída em hexano e injetada separadamente no cromatógrafo para determinação dos tempos de retenção, por comparação destes tempos dos picos das amostras com os tempos obtidos com os padrões, os tocoferóis presentes nas amostras foram identificados. A quantificação foi feita por padronização externa. As condições cromatográficas utilizadas foram: bomba isocrática Perkin Elmer 250; fluxo 1,1 mL/minuto, detector fluorescência Shimadzu RF-10 AXL: excitação - 290nm; emissão - 330nm, coluna analítica: MERCK 250X4mm Li Chrosorb Si 60 (acoplada com coluna de guarda). Fase móvel: 99:1 Hexano/Isopropanol (grau HPLC filtrados e degaseificado 10min em ultrassom).

As amostras de DDOS foram pesadas e dissolvidas com hexano (completando 50mL). Alíquotas de 1mL destas soluções foram novamente diluídas em hexano (completando 10mL) e depois injetadas no cromatógrafo. Os cromatogramas obtidos foram integrados para fornecer a área de cada pico presente. Os valores das áreas foram interpolados na curva de calibração, fornecendo cada valor de concentração.

- Composição de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa;

A metodologia para extração utilizada foi da extração de ésteres metílicos (Hartman & Lago, 1973, com pequenas modificações de MAIA & RODRIGUES-AMAYA, 1993). O método de injeção utilizado foi o Ce 1-62 (AOCS, 1998). O cromatógrafo foi o Gasoso Capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, com coluna capilar: DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane, dimensões 60m, diâmetro interno de 0,25 mm, 0,25 µm filme). As condições de operação foram: fluxo coluna = 1,0 /min.; Velocidade linear = 24 cm/seg; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; temperatura do forno: 110°C – 5 minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 minutos; Gás de arraste: Hélio; Volume injetado: 1µL. A identificação dos isômeros foi feita por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com uma mistura de padrões de ácidos graxos e a quantificação por padronização externa.

- Índice de Peróxido: 965.33 (AOAC, 1995);

- Valor de TBA: Método descrito por SINNHUBER & YU (1958);

- Ácidos Graxos Livres – AGL: 940.28 (AOAC, 1995);

- Índice de Iodo: Método de Hanus - 920.158 (AOAC, 1995);

- Índice de Saponificação – IS: Número de Koettstorfer 920.160 (AOAC, 1995);

- Teor de água no DDOS: Karl Fischer Tb 2-64 (AOCS, 1998);

- Teor de Matéria Insaponificável: Ca 6a-40 (AOCS, 1998);

- Análise de Valor Calórico: Medida feita em calorímetro isoperibol automático (PARR 1261) com bomba de oxigênio (PARR 1108).

- **Cor:** A análise instrumental da cor foi avaliada objetivamente por transmitância total, através do colorímetro Hunter Lab (modelo Color Quest), programa universal no método CIELAB $L^*a^*b^*$, utilizando os seguintes parâmetros: ângulo de observação de 10°, iluminante D65, luminosidade (L^* , 100-branco a 0-preto), índice de vermelho (a^* - eixo vermelho/verde) e índice de amarelo (b^* - eixo amarelo/azul).

- **Determinação da Densidade:** Cc 10c-95 (AOCS, 1998);

4.2 Ensaio Biológico com DDOS Neutro

4.2.1 Animais e Condições Experimentais

Para a realização do ensaio biológico foram utilizados 91 ratos albinos machos da linhagem Wistar/Uni (*Rattus norvegicus*), recém-desmamados (21-23 dias), com peso inicial de 68,74g ($\pm$ 4,73g), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. O projeto foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA, do Instituto de Biologia da UNICAMP e aprovado – Protocolo nº 562-1 (Anexo 1).

Os animais foram alojados em gaiolas de crescimento individuais de aço inoxidável e submetidos a um período de adaptação e aclimação (7 dias) às condições do Laboratório de Ensaio Biológicos (temperatura de 22°C $\pm$ 1 e umidade do ar entre 60-70%, com ciclo de claro/escuro de 12 horas), sendo alimentados *ad libitum* com a dieta experimental AIN-93G, elaborada conforme o *American Institute of Nutrition* (REEVES *et al.*, 1993) com concentração de proteína bruta de 12% (GOENA *et al.*, 1989) e depletada em vitamina E, de acordo com a tabela 7.

A caseína utilizada como fonte protéica foi proveniente de M. Cassab Comércio e Indústria Ltda, e continha 82,6% de proteína bruta. O amido de milho e o amido dextrinizado foram provenientes da Corn Products Brasil, respectivamente nºs 3408 e 1910; a celulose microcristalina foi da marca Arbocel

1-290; a L-cistina Synth C1.027.01AE; o bitartarato de colina e o tertibutilidroquinona Sigma C162 e B9161, respectivamente; a sacarose União® e o óleo de soja Liza®. A composição proximal da dieta experimental foi realizada de acordo com o descrito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995): umidade (estufa 105°C – método 930.15), minerais totais (cinza bruta – método 954.01), e proteína bruta (microkjeldahl com fator de conversão 6,38 – método 942.05). Os lípidios totais foram determinados por BLIGH & DYER (1959) e a fibra bruta foi determinada segundo o método de Scharrer e Kürschner, descrito por ANGELUCCI *et al.* (1987), usando ácido nítrico, ácido tricloroacético e ácido acético para hidrólise.

Tabela 7. Composição da dieta AIN-93G com modificações

Ingredientes	Peso (g/kg dieta)
Proteína (12%)	
Caseína	145,28
Lipídios (7%)	
Óleo de soja	70,00
Fibras (5%)	
Celulose microcristalina	50,00
Mistura Mineral (3,5%)*	35,00
Mistura Vitamínica depletada em vit. E (1%)**	10,00
L-cistina (0,3%)	3,00
Bitartarato de colina (0,25%)	2,50
Tert-butil hidroquinona (0,0014%)	0,014
Glicídios	
Amido de milho dextrinizado (13,2%)	132,00
Sacarose (10%)	100,00
Amido de milho (q.s.p.)	452,21
TOTAL	1000,00

* de acordo com AIN-93G (Anexo 2); ** MIX CASSAB UNI 5234 (Anexo 3)

4.2.2 Delineamento Experimental e Procedimentos

Após o período de adaptação, os ratos foram divididos em 6 grupos de 14 ratos e um grupo de referência com 7 ratos, conforme a figura 8. Os animais restantes (84) foram distribuídos nos diferentes tratamentos, receberam a mesma alimentação (dieta AIN-93G, contendo mistura vitamínica depletada em vitamina E) e suplementação diária diferenciada, de acordo com o que segue:

- **EPHYNAL**: suplementados com vitamina E sob a forma de fármaco (EPHYNAL[®] - acetato DL- α -tocoferol – Bayer Health Care) em quantidade equivalente a dose utilizada no Grupo Neutro;
- **DDOS**: suplementados com tocoferóis sob a forma de DDOS neutro, em quantidade equivalente à dose recomendada pela AIN-93G (150 mg/kg de dieta);
- **DDOS 25**: suplementados com tocoferóis sob a forma de DDOS neutro, em quantidade equivalente a 25% acima da dose recomendada pela AIN-93G (187,5 mg/kg de dieta);
- **DDOS 50**: suplementados com tocoferóis sob a forma de DDOS neutro, em quantidade equivalente a 50% acima da dose recomendada pela AIN-93G (225 mg/kg de dieta);
- **SOJA**: não foram suplementados, mas receberam óleo de soja diariamente, por via oro-gástrica, no mesmo volume utilizado nos tratamento Neutro 50, a fim de verificar a possibilidade de saciedade dos ratos;
- **DEPLETADO**: os animais não foram suplementados.

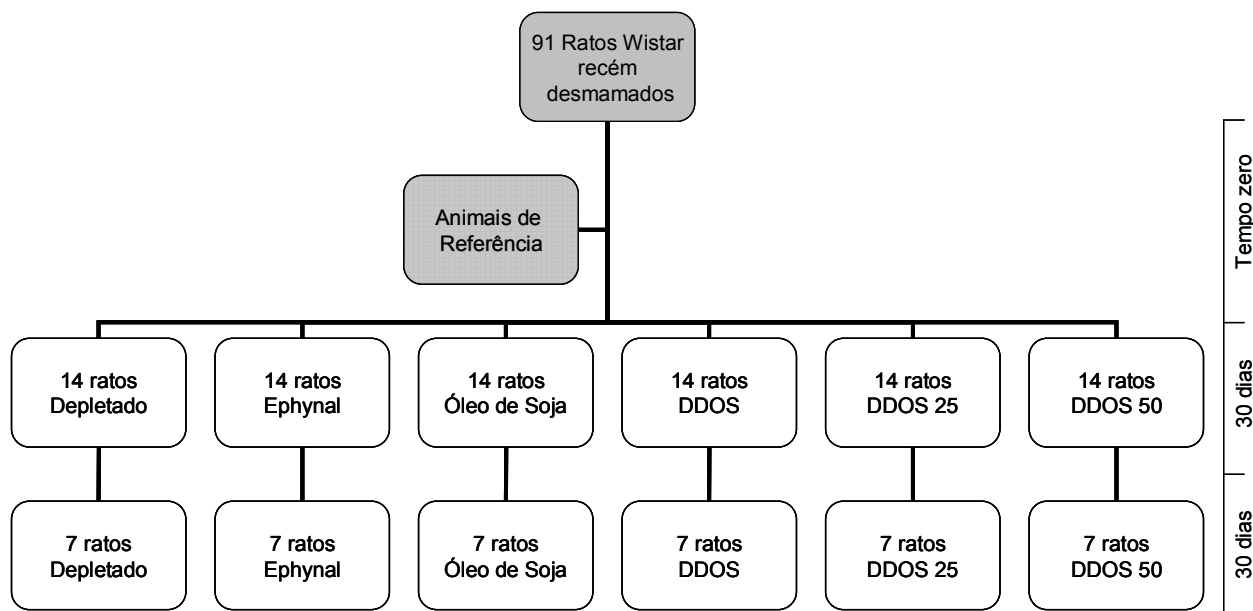


Figura 8. Delineamento Experimental da Avaliação Biológica

4.2.2.1 Parâmetros Fisiológicos e Nutricionais

Algumas das análises a seguir foram realizadas nos animais durante o período experimental de forma contínua e outras ao término do experimento (30 e 60 dias), além de serem realizadas nos animais de referência (no tempo zero do experimento) de forma a servirem como um parâmetro de referência para os animais experimentais. Ressalta-se que então, no primeiro dia de experimento, os animais de tempo zero (T0) foram mortos, após 30 dias de experimento, 7 animais de cada tratamento foram mortos e os demais permaneceram em experimentação perfazendo um total de 60 dias, quando também eram mortos por deslocamento cervical.

A) Crescimento dos animais: a determinação do peso corporal foi realizada a cada 2 ou 3 dias, em balança para pesagem de animais, com precisão de 0,1g, sempre no mesmo horário (10:00h). Tal procedimento permitiu que fossem avaliados os ganhos de peso periódicos e acumulativos, bem como o comportamento dos animais ao longo do experimento.

B) Ingestão de dieta: foi fornecida *ad libitum* em quantidade conhecida. Após 48h, as sobras foram pesadas e o rejeito separado das excretas, assim foi calculado o consumo de dieta de cada animal. De posse do ganho de peso dos animais e do consumo alimentar, pode-se calcular a relação entre eles, ou seja, a Eficiência Alimentar (PELLET & YOUNG, 1980).

C) Peso fecal: as fezes eliminadas pelos animais foram recolhidas, secas à temperatura ambiente e pesadas.

D) Suplementação: metade dos ratos foi suplementada diariamente durante 30 dias e a outra metade durante 60 dias. A administração do suplemento foi realizada por via de intubação orogástrica com seringas descartáveis de polietileno de 1 mL e agulhas de gavagem. A quantidade de suplemento administrada foi calculada a cada dois dias com base no ganho de peso dos animais, levando-se em consideração que eles consomem em média o equivalente a 10% do seu peso, sendo assim a suplementação acompanhou a ingestão de dieta normal dos ratos. Também foi levado em conta o teor de equivalentes de α -tocoferol de cada suplemento, bem como a densidade, a fim de ser fornecida a suplementação (volume máximo 0,3mL). Os mesmos eram aspirados pela seringa e mantidos ao abrigo da luz até o momento da administração. Diariamente, os ratos foram retirados da sala de experimentação, acondicionados por grupo em caixas plásticas coletivas, sendo levados à sala cirúrgica, onde ocorria a suplementação.

O jejum no momento da suplementação aumenta a velocidade da passagem do DDOS para o intestino delgado e associado à ausência da bile e do suco pancreático, prejudica a absorção do α -T, tornando a suplementação ineficiente. Assim, o horário escolhido para a intubação foi às 13:00 horas, prevendo o período com maior esvaziamento gástrico, devido ao hábito alimentar noturno dos roedores, mas sem a retirada da dieta, para que pudessem seguir se alimentando mesmo após a suplementação. Desta forma, a bile e o suco pancreático durante a digestão, formam um complexo com a vitamina E que favorece a absorção da mesma.

E) Coleta de sangue para o hemograma: uma alíquota de sangue foi coletada periodicamente (0, 15, 30, 45 e 60 dias) por via retro-ocular para o hemograma (equipamento ADVIA – 120), realizado pelo Laboratório de Rotina Hematológica do Hemocentro (Hospital das Clínicas – UNICAMP) para verificar possíveis alterações hematológicas nos animais.

F) Coleta de sangue para as análises bioquímicas: no tempo zero, aos 30 e aos 60 dias, os animais em jejum de 12 horas, foram anestesiados (HYPNOL[®] – pentobarbital sódico – 4,6 mg/100g de peso corporal) via intra-peritoneal para a coleta de sangue por punção cardíaca. O mesmo foi mantido em banho-maria a 37°C por 30 minutos e centrifugado (Centrífuga ExcelsaII modelo 206 MP, FANEM) a 3000rpm por 10 minutos (adaptado de CARVALHO, 1999), com a finalidade de separar o soro sobrenadante. O material foi armazenado em tubos de polipropileno com capacidade para 1,5 mL (eppendorf) em Freezer Ultra Low (REVCO) a -80°C até o momento das análises.

G) Peso de tecidos e órgãos: após a coleta do sangue, os animais eram mortos por deslocamento cervical para a retirada de órgãos: baço, rins, testículos, coração, pulmões e fígado, que foram pesados, obtendo-se o peso absoluto dos mesmos (g) e o relativo ao peso corporal do animal (g/100g de peso corporal), além de averiguação de alterações macroscópicas. Coletou-se também os fêmures, tecido muscular ao redor dos fêmures e gordura abdominal. Estes foram acondicionados de diferentes formas, de acordo com as análises a que seriam submetidos: o fígado, o tecido muscular e o adiposo foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em Freezer Ultra Low a -80°C. O fígado e o tecido muscular foram liofilizados (liofilizador EDWARDS modelo Super Modulo), moídos manualmente com gral e pistilo e acondicionados novamente em freezer para posterior análise.

4.2.2.2 Parâmetros Bioquímicos

As análises realizadas no **soro** foram:

- A) Triacilgliceróis:** para a determinação do perfil lipídico, por kit enzimático comercial Labtest Diagnóstica S.A., Triglicérides GPO-ANA Cat. 59.
- B) Colesterol total:** para a determinação do perfil lipídico, por kit enzimático comercial Labtest Diagnóstica S.A., Colesterol Liquiform Cat. 76.
- C) Enzimas Transaminases:** para quantificar as enzimas: glutâmico oxaloacética (GOT) e glutâmico pirúvica (GPT), por kit enzimático comercial da Laborlab CAT N° 02600.
- D) Bilirrubinas:** para verificar danos hepáticos, por kit enzimático comercial da Laborlab CAT N° 00700.
- E) 8-iso-PGF_{2α} Isoprostana:** para verificar o nível de oxidação lipídica das células, foi feita por imunoensaio enzimático utilizando o 8-Isoprostane EIA Kit, Cayman Chemical (catálogo n° 516351), com absorbância medida a 405nm, em Leitor de Elisa (Uniscience Labsystems modelo Original Multiskan EX).
- F) Teor de tocoferóis séricos:** para verificar os níveis séricos de cada isômero de tocoferol circulante no organismo do animal (UEDA & IGARASHI, 1990) com pequenas modificações. As condições da CLAE foram: cromatógrafo VARIAN; coluna analítica MERCK 250X4mm Li Chrosorb Si 60; sistema de bombeamento VARIAN 9012; fase móvel hexano/isopropanol 99:1 (solventes grau HPLC filtrados e degaseificados por 10 minutos em banho ultrasom); fluxo 1,1 mL/minuto; detector Fluorescência Varian 9075: excitação 290nm; emissão 330nm; temperatura ambiente. A identificação dos isômeros foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões e a quantificação por padronização externa.

No tecido **hepático** e no tecido **muscular** foi realizado **Lipídios Totais** (BLIGH & DYER, 1959).

As análises realizadas nos tecidos **hepático, muscular e adiposo** foram:

A) Malonaldeído: para verificar os níveis de oxidação lipídica dos tecidos, foi feito de acordo com RAHARJO *et al.* (1992), modificado por FACCO (2002), com auxílio de curva padrão com TEP.

B) Teor de tocoferóis séricos: para verificar os níveis séricos de cada isômero de tocoferol circulante no organismo do animal (UEDA & IGARASHI, 1990) com pequenas modificações. As condições da CLAE foram: cromatógrafo VARIAN; coluna analítica MERCK 250X4mm Li Chrosorb Si 60; sistema de bombeamento VARIAN 9012; fase móvel hexano/isopropanol 99:1 (solventes grau HPLC filtrados e degaseificados por 10 minutos em banho ultrasom); fluxo 1,1 mL/minuto; detector Fluorescência Varian 9075: excitação 290nm; emissão 330nm; temperatura ambiente. A identificação dos isômeros foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões e a quantificação por padronização externa.

Nos fêmures coletados foi realizado o **Teste de Micronúcleos em Medula Óssea**, a fim de verificar-se a genotoxicidade do DDOS nestes animais. Para tanto, os fêmures foram coletados e limpos, em seguida suas epífises foram retiradas e a medula óssea foi coletada em um tubo com auxílio de uma seringa com soro fetal bovino (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Após o preparo das lâminas, estas foram coradas com Giemsa 6% (tampão fosfato pH 5,8) e foram contados 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) e 1000 eritrócitos normocromáticos (NCE) para cada animal, contando-se a frequência de células micronucleadas (PCEMN e NCEMN).

4.2.3 Análise Estatística

Os dados coletados foram avaliados com o auxílio do *software* STATISTICA 7.0[®] (STATSOFT, 2004), no módulo de Análise de Variância (ANOVA), que em caso de médias estatisticamente diferentes, foi realizada a comparação de médias (Teste de Tukey), com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e Neutralização do DDOS

5.1.1 Ensaio Preliminar

Para definir o melhor álcali na neutralização do DDOS, realizaram-se vários testes cujos resultados constam no Quadro 1. Verificou-se que os álcalis: NaOH, Ca(OH)_2 , KOH e CaCO_3 nas concentrações testadas, saponificaram praticamente todos os ácidos graxos da amostra de DDOS bruto, sem ocorrer liberação de DDOS neutro, ou seja, não obteve-se o produto neutralizado, apenas uma massa saponificada; Já a reação com o álcali NaHCO_3 liberou uma pequena quantidade de DDOS neutro; os álcalis que obtiveram maior quantidade de DDOS neutro foram Mg(OH)_2 e Na_2CO_3 , entretanto o Mg(OH)_2 não foi eficiente na neutralização, havendo elevado teor de AGL, e o Na_2CO_3 , mostrou-se mais promissor.

Em relação aos demais parâmetros: nas concentrações de álcali testadas (2N e 4N), a quantidade de DDOS neutro liberada foi semelhante para ambas concentrações; a quantidade de cada álcali necessária para a neutralização de cada amostra foi calculada estequiometricamente. A quantidade de 20% em excesso neutralizou melhor o DDOS, diminuindo mais o teor de AGL. Portanto, o álcali que melhor neutralizou o DDOS, com maior liberação de DDOS neutro foi o Na_2CO_3 , com excesso de 20%, sendo que em relação à concentração, não houve diferença entre 2N e 4N. E estas condições foram levadas em consideração nos planejamentos experimentais que seguem.

Quadro 1. Resultados dos testes de neutralização do DDOS bruto: liberação de DDOS neutro e teores de AGL (%) e Tocoferóis Totais (%)

Testes ¹			Liberação de DDOS neutro	Teor de AGL (%)	Teor de TT (%)
Álcali	Concentração	Excesso			
NaOH	2N	0,12%	Nula	-	-
		10%			
		20%			
	4N	20%			
Ca(OH) ₂	2N	0,12%	Nula	-	-
		10%			
		20%			
KOH	2N	0,12%	Nula	-	-
		10%			
		20%			
Mg(OH) ₂	2N	0,12%	Liberou ***	25,21	12,41
		10%	Liberou ***	25,39	12,43
		20%	Liberou ***	25,57	12,44
NaHCO ₃	2N	20%	Liberou *	13,27	12,24
CaCO ₃	2N	20%	Nula	-	-
Na ₂ CO ₃	2N	0,12%	Liberou ***	10,53	12,40
		10%	Liberou **	7,74	12,06
		20%	Liberou **	4,94	13,62
	4N	0,12%	Liberou ***	9,46	12,68
		10%	Liberou **	6,35	11,95
		20%	Liberou **	4,67	13,21

¹ Testes em triplicata

* Intensidade de liberação, ou seja, obtenção de DDOS neutro

Levando-se em consideração os resultados do quadro 1, utilizou-se o álcali Na₂CO₃ com 20% de excesso na neutralização dos planejamentos a seguir, variando as concentrações entre 2N e 4N, além de outras variáveis importantes de acordo com a literatura (tempo e temperatura de homogeneização do DDOS bruto e do álcali).

5.1.2 Planejamentos Experimentais

5.1.2.1 Primeiro Experimento

Realizou-se um planejamento experimental fatorial 2^3 com o intuito de avaliar o efeito das variáveis: concentração de Na_2CO_3 , temperatura da reação e tempo de homogeneização, para que fossem definidas as condições que levassem à melhor neutralização do DDOS bruto (II). Os ensaios foram realizados em triplicata e o ponto central corresponde a 4 ensaios (9, 10, 11 e 12) para verificar a estimativa do erro. A matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados, bem como as respostas em redução de AGL, equivalentes de α -tocoferol (α -TE) e rendimento de DDOS neutro obtido, estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Matriz de planejamento experimental completo de primeira ordem (valores reais e codificados) utilizada no 1º experimento com as respostas estudadas

Ensaio	Concen- tração (N)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Redução de AGL (%)	Teor de α -TE (%)	Rendimento em DDOS neutro (%)
1	2 (-1)	25 (-1)	2 (-1)	32,6 ^a	1,724 ^a	33,0 ^c
2	4 (1)	25 (-1)	2 (-1)	34,3 ^c	1,797 ^a	42,5 ^d
3	2 (-1)	50 (1)	2 (-1)	40,1 ^{de}	2,346 ^{bc}	7,5 ^a
4	4 (1)	50 (1)	2 (-1)	41,6 ^f	2,750 ^d	14,7 ^b
5	2 (-1)	25 (-1)	6 (1)	32,5 ^a	1,685 ^a	36,9 ^{cd}
6	4 (1)	25 (-1)	6 (1)	33,4 ^b	1,691 ^a	42,2 ^d
7	2 (-1)	50 (1)	6 (1)	39,8 ^{de}	2,416 ^c	12,9 ^{ab}
8	4 (1)	50 (1)	6 (1)	42,6 ^g	2,585 ^{cd}	12,8 ^{ab}
PC	3 (0)	37,5 (0)	4 (0)	40,6 ^e	2,710 ^d	16,9 ^b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey

PC (ponto central) correspondente aos ensaios 9, 10, 11 e 12

Os resultados das respostas estudadas (redução de AGL, teor de α -TE e rendimento de DDOS neutro) foram tratados estatisticamente, de acordo com o que segue:

a) Resposta: Redução de AGL

Os teores de AGL no DDOS bruto e nos neutralizados, obtidos nos diferentes ensaios do 1º experimento, estão representados na figura 9, onde os melhores resultados para a redução de AGL foram dos ensaios 8, 2, 4 e 6, ou seja, onde o fator concentração do álcali estava no nível máximo estudado (4N) nestes ensaios a redução de AGL foi em média cerca de 38%. A redução dos AGL é uma das respostas mais importantes, pois quanto menor o teor de AGL no DDOS neutro, melhor será para o organismo que o irá ingerir, uma vez que o excesso de AGL é danoso às células, podendo acarretar apoptose (SANTOS *et al.*, 2006; OKOSHI *et al.*, 2007).

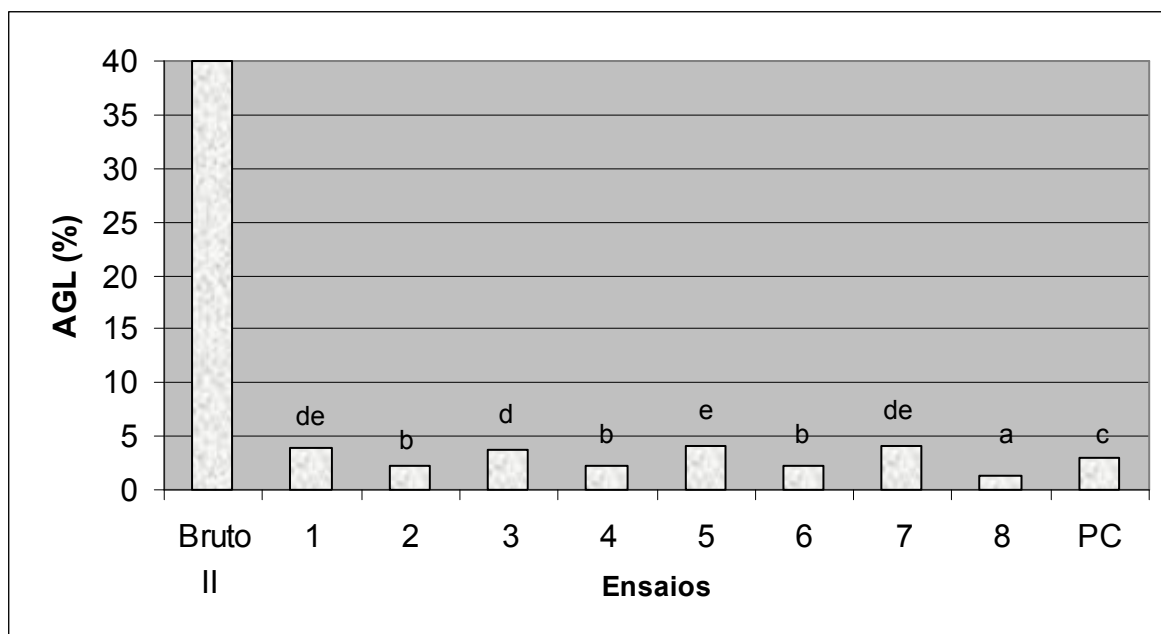


Figura 9. Teor de AGL (%) no DDOS bruto e nos DDOS neutros -1º experimento fatorial

Letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

PC (ponto central) correspondente aos ensaios 9, 10, 11 e 12

A tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão, bem como o erro puro, os valores de t (*student*) e a probabilidade, sendo que todos foram estatisticamente significativos (5%). Dessa forma, tanto os fatores como as interações existentes entre eles apresentaram influência significativa no modelo. Os valores de t (*Student*) são proporcionais à influência de cada variável no processo e conseqüentemente, na resposta. Observando os valores absolutos deste efeito estimado, percebe-se a influência principal da temperatura de homogeneização e da concentração do álcali. O valor negativo para a variável tempo indica que estatisticamente, quanto menor o tempo de homogeneização, maior será a redução de AGL do DDOS, o que operacionalmente não é coerente. Porque quanto maior o tempo de homogeneização, maior o contato entre álcali e produto e mais intensa a reação de neutralização, conseqüentemente mais AGL se transformarão em sabões. Ressalta-se que esta indicação é apenas matemática e que não pode ser descartada a influência das demais variáveis no processo.

Tabela 9. Efeito das variáveis no 1º planejamento fatorial para a resposta redução de AGL no DDOS neutro

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Puro	t(19)	p
Média *	37,5797	0,0407	922,44	0,0000
Concentração *	0,9132	0,0440	20,75	0,0000
Temperatura *	3,9393	0,0440	89,53	0,0000
Tempo *	-0,0939	0,0440	-2,13	0,0461
Concentração x Temperatura *	0,1691	0,0440	3,84	0,0011
Concentração x Tempo *	0,1060	0,0440	2,41	0,0263
Temperatura x Tempo *	0,2490	0,0440	5,66	0,0000
Concentração x Temperatura x Tempo *	0,2244	0,0440	5,10	0,0001

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Para esta resposta, o modelo obtido (Apêndice A) apresenta R^2 de 0,899, ou seja, a variação explicada (R^2 expresso em %) é de 89,9%, o que representa a variação total em torno da média que é explicada pela regressão. Como nos ensaios sempre existem os erros experimentais, calcula-se a máxima variação explicável, que neste caso corresponde a 99,8%.

Para validar o modelo verifica-se a relação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} , de acordo com BARROS NETO *et al.* (2001) uma regra prática para considerar uma regressão como útil para fins de previsão é: se o valor do $F_{\text{calculado}}$ for acima 3 vezes o valor de F_{tabelado} , o modelo é considerado aceitável, acima de 5 o modelo é considerado bom. Ou seja, neste caso $F_{\text{calculado}} = 24,45$ e $F_{\text{tabelado } 0,95;7;20} = 2,51$ o modelo é considerado bom, o que representa um ajuste adequado ao modelo linear utilizado.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno apresentadas na figura 10, mostram que a redução de AGL do DDOS bruto ocorre nas condições: a) concentração e temperatura mais elevada; b) concentração mais elevada indiferente do tempo; c) temperatura mais elevada indiferente do tempo. Resumindo as regiões com maior redução de AGL foram com temperatura mais elevada e maior concentração de álcali. Entretanto, como as regiões não estão otimizadas, foi necessário rever os níveis das variáveis no segundo planejamento fatorial.

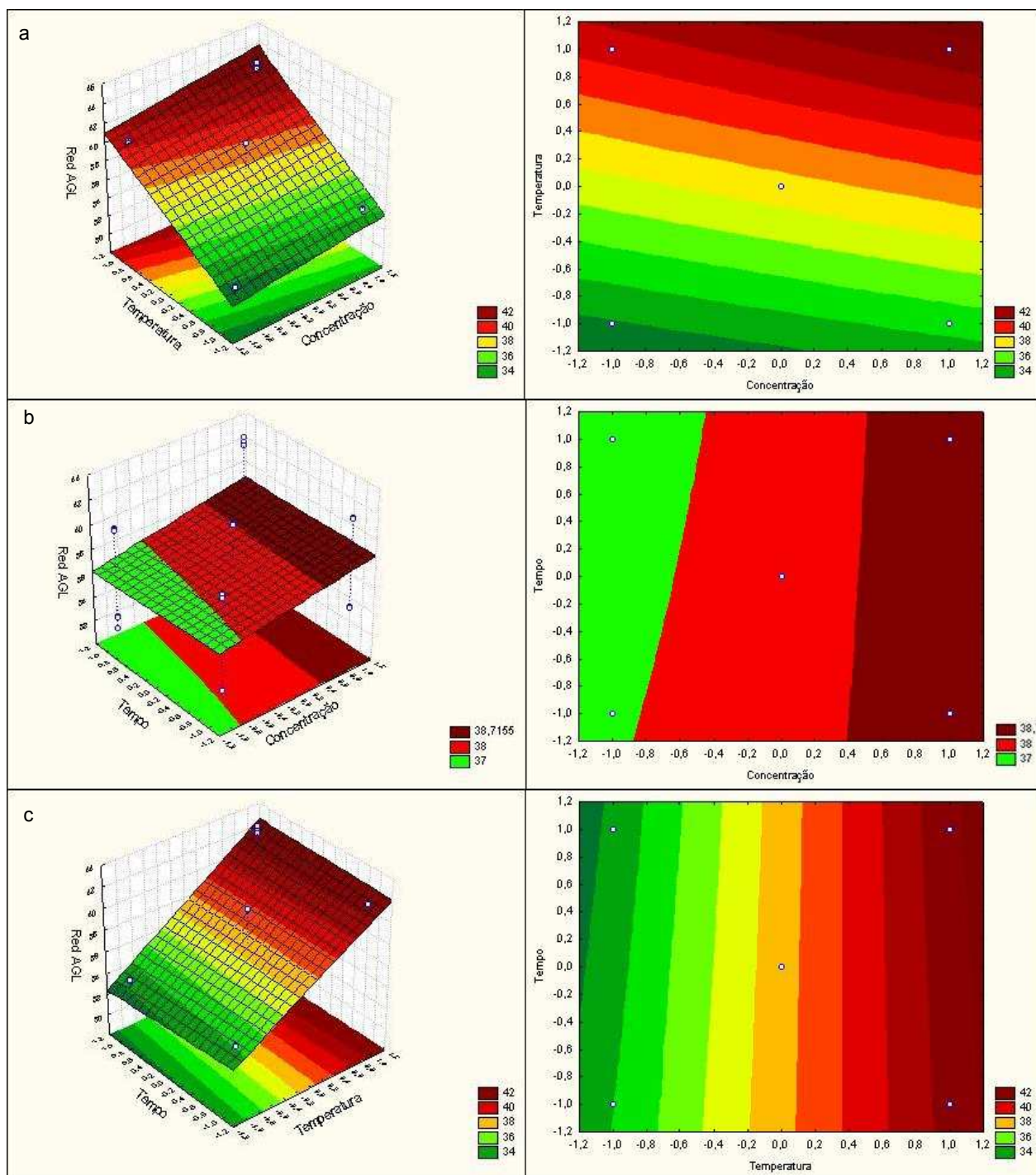


Figura 10. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a redução de AGL do DDOS neutro no 1º experimento (a) temperatura e concentração de Na_2CO_3 ; (b) tempo e concentração de Na_2CO_3 ; (c) temperatura e tempo

b) Resposta: Teor de α -TE

A tabela 10 apresenta os teores de cada isômero de tocoferol (α , β , γ e δ), bem como os tocoferóis totais (TT) no DDOS bruto e nos DDOS neutralizados obtidos no 1º experimento do planejamento experimental.

Tabela 10. Teor de tocoferóis totais e seus isômeros (%) do DDOS bruto e DDOS neutros obtidos no 1º experimento

Amostra	α -tocoferol (%)	β -tocoferol (%)	γ -tocoferol (%)	δ -tocoferol (%)	Tocoferóis Totais (%)
Bruto II	1,39	0,19	5,31	2,14	8,90
Neutro					
1	1,15	0,14	3,95	1,52	6,76
2	1,06	0,14	3,71	1,43	6,34
3	1,68	0,19	4,76	1,56	8,18
4	1,89	0,21	5,75	1,91	9,76
5	1,12	0,15	3,88	1,50	6,65
6	1,11	0,14	4,04	1,55	6,84
7	1,71	0,19	5,18	1,69	8,78
8	1,81	0,19	5,41	1,74	9,15
PC	1,94	0,20	5,75	1,83	9,71

PC (ponto central) correspondente aos ensaios 9, 10, 11 e 12

Deve-se considerar que cada isômero possui um poder vitamínico (α = 1,49; β = 0,60; γ = 0,19; δ = 0,01). Como, o mais importante para o cálculo da suplementação é o teor de α -tocoferol (α -T), é necessário converter os isômeros em *equivalentes de α -tocoferol* (α -TE), para isto utilizam-se como fatores: β = 0,4027; γ = 0,1275 e δ = 0,0067 (BIESALSKI & GRIMM, 2007). Os teores de α -TE nos DDOS neutralizados com melhores resultados foram nos ensaios 3, 4, 7, 8 e PC, ou seja, o fator preponderante foi a temperatura no nível máximo estudado (50°C), além dos pontos centrais.

Dentre as 3 respostas avaliadas neste planejamento experimental, o maior teor de α -TE no DDOS é a mais importante, pois as respostas de redução de AGL e rendimento de produto neutro são secundárias, ou seja, a neutralização com menor arraste de tocoferóis para a borra, é o que mais interessa. Porque, na prática, quanto mais tocoferóis o DDOS apresentar, menor será a quantidade de produto a ser suplementado aos animais. A tabela 11 apresenta os efeitos das variáveis estudadas no teor de α -TE, onde todos os fatores individualmente tiveram efeito significativo sobre a resposta, bem como suas interações, com exceção da interação entre temperatura e tempo, mesmo assim, para o prosseguimento da análise, esta interação não foi desconsiderada.

Tabela 11. Efeito das variáveis no 1º planejamento fatorial para a resposta teor de α -TE no DDOS neutro

	Coefficiente de regressão	Erro Puro	t(19)	p
Média *	12,5069	0,0602	207,75	0,0000
Concentração *	0,8465	0,0650	13,48	0,0000
Temperatura *	2,1193	0,0650	32,59	0,0000
Tempo *	1,9215	0,0650	29,55	0,0000
Concentração x Temperatura *	0,2317	0,0650	3,56	0,0021
Concentração x Tempo *	-0,1886	0,0650	-2,90	0,0092
Temperatura x Tempo	0,0261	0,0650	0,40	0,6928
Concentração x Temperatura x Tempo *	-0,1503	0,0650	-2,31	0,0322

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

A variação explicada foi de 88,7% (R^2 em %) e a máxima variação explicável corresponde a 99,2%. A regressão foi considerada como útil para fins de previsão, pois, o modelo foi bom ($F_{\text{calculado}} = 22,45$ corresponde a 8,9 vezes de $F_{\text{tabelado } 0,95;7;20} = 2,51$) o que representa um ajuste adequado a um modelo linear (apêndice A).

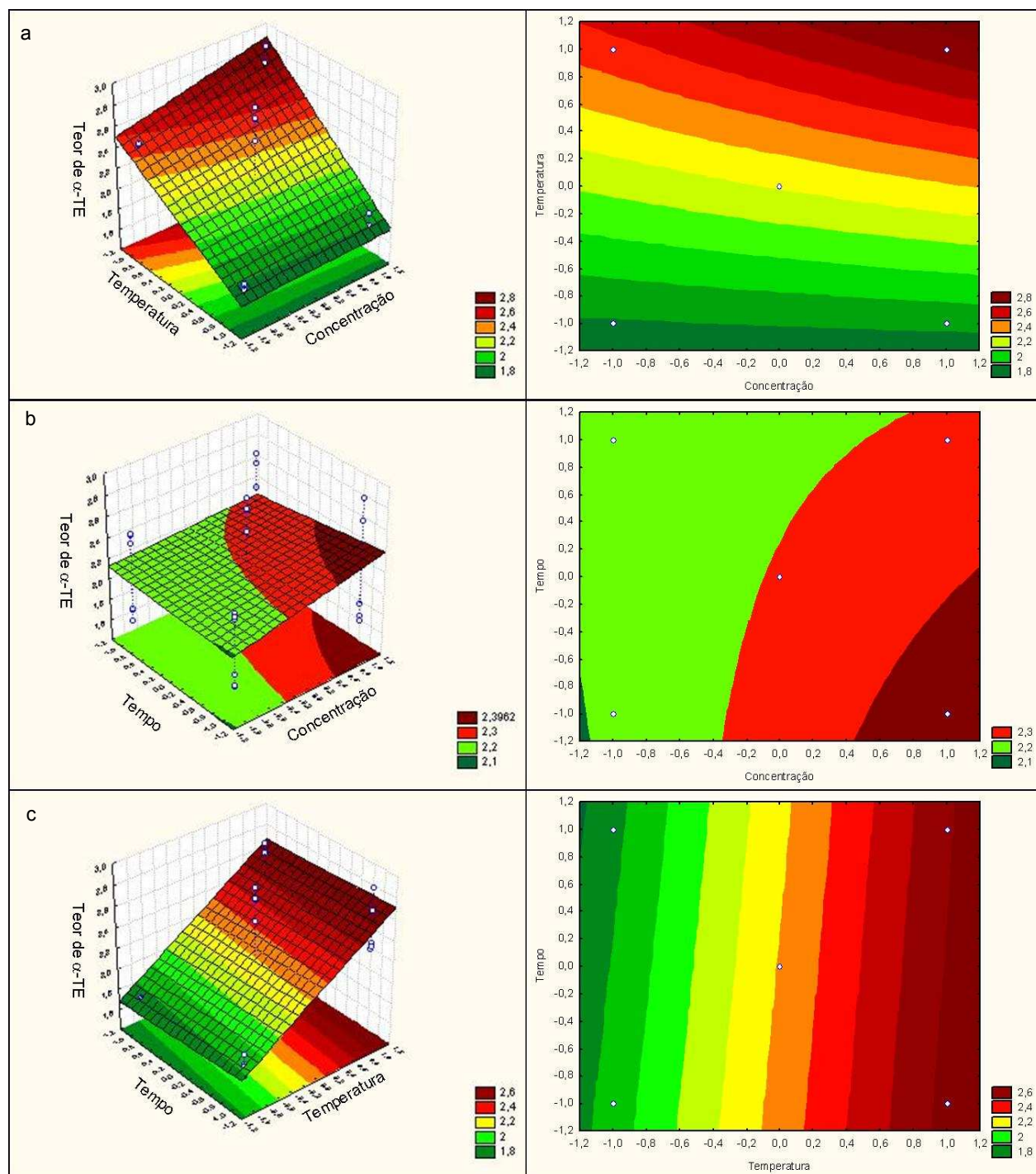


Figura 11. Superfícies de resposta e curvas de contorno para o teor de α -TE do DDOS neutro no 1º experimento (a) temperatura e concentração de Na_2CO_3 ; (b) tempo e concentração de Na_2CO_3 ; (c) temperatura e tempo

As superfícies de resposta e as curvas de contorno apresentadas na figura 11, mostram que o teor de α -TE do DDOS neutro foi maior com: a) concentração e temperatura mais elevada; b) concentração mais elevada e menor tempo; c) temperatura mais elevada indiferente do tempo. Resumindo as regiões com maior teor de α -TE foram as regiões com temperatura mais elevada e maior concentração de álcali, assim como a resposta da Redução dos AGL.

c) Resposta: Rendimento de DDOS neutro

Os rendimentos obtidos nos diferentes ensaios do 1º experimento, com melhores resultados (maior quantidade de DDOS neutro), foram nos ensaios 1, 2, 5 e 6, sendo o fator preponderante a temperatura no nível mínimo estudado (25°C). A tabela 12 apresenta os coeficientes de regressão, o desvio padrão e valores de t e p para as variáveis, sendo que todos os fatores foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$), exceto a interação entre tempo e temperatura e a interação entre todos os fatores juntos. Sendo assim, para simplificar a análise, a interação de 3ª ordem foi desconsiderada.

Tabela 12. Efeito das variáveis no 1º planejamento fatorial para a resposta rendimento de DDOS neutro

	Coeficiente de regressão	Erro Puro	t(19)	p
Média *	24,1018	0,3866	62,34	0,0000
Concentração *	2,7329	0,4176	6,54	0,0000
Temperatura *	-13,3254	0,4176	-31,91	0,0000
Tempo *	0,8779	0,4176	2,10	0,0491
Concentração x Temperatura *	-0,9538	0,4176	-2,28	0,0341
Concentração x Tempo *	-1,4254	0,4176	-3,41	0,0029
Temperatura x Tempo	-0,0171	0,4176	-0,04	0,9678
Concentração x Temperatura x Tempo	-0,3754	0,4176	-0,90	0,3799

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

A análise de variância para o rendimento de DDOS neutro submetido a diferentes tipos de neutralização, apresenta o $F_{\text{calculado}} = 48,54$ e $F_{\text{tabelado}, 95; 6; 21} = 2,57$, ou seja, uma relação de alto valor (18,87), o que representa um ajuste adequado dos dados experimentais ao modelo. A variação explicada foi de 93,3% (R^2 em %) e a máxima variação explicável corresponde a 98,4% (apêndice A).

As superfícies de resposta e as curvas de contorno apresentadas na figura 12, mostram que o rendimento de DDOS neutro é maior nas regiões com: a) menor temperatura independente da concentração; b) maior concentração independente do tempo; c) menor temperatura e tempo independente. Ou seja, com temperatura mais baixa e maior concentração de álcali. Assim, a melhor temperatura de homogeneização foi oposta às respostas da redução dos AGL e do teor de α -TE. Como as regiões não estão otimizadas, os níveis das variáveis foram alterados no segundo planejamento.

Com base nas observações anteriores, verifica-se que para a resposta redução de AGL, os ensaios com melhor desempenho foram 2, 4, 6 e 8, com a concentração no maior nível estudado (4N). Para a resposta teor de α -TE, os melhores ensaios foram 3, 4, 7, 8 e os PC, onde o fator preponderante foi a variável temperatura no maior nível estudado (50°C). Em relação ao rendimento de DDOS neutro, os ensaios com melhores resultados foram 1, 2, 5 e 6, ou seja, o fator que melhor influenciou na resposta foi a temperatura no nível estudado inferior (25°C). Portanto observa-se que nos pontos com maior redução de AGL e maior teor de α -TE o rendimento não é o ideal. Sendo assim, o 2º planejamento experimental foi realizado (item 5.1.2.2), onde a proposta de um modelo quadrático visou descrever melhor a neutralização e se aproximar mais do ponto ótimo do processo.

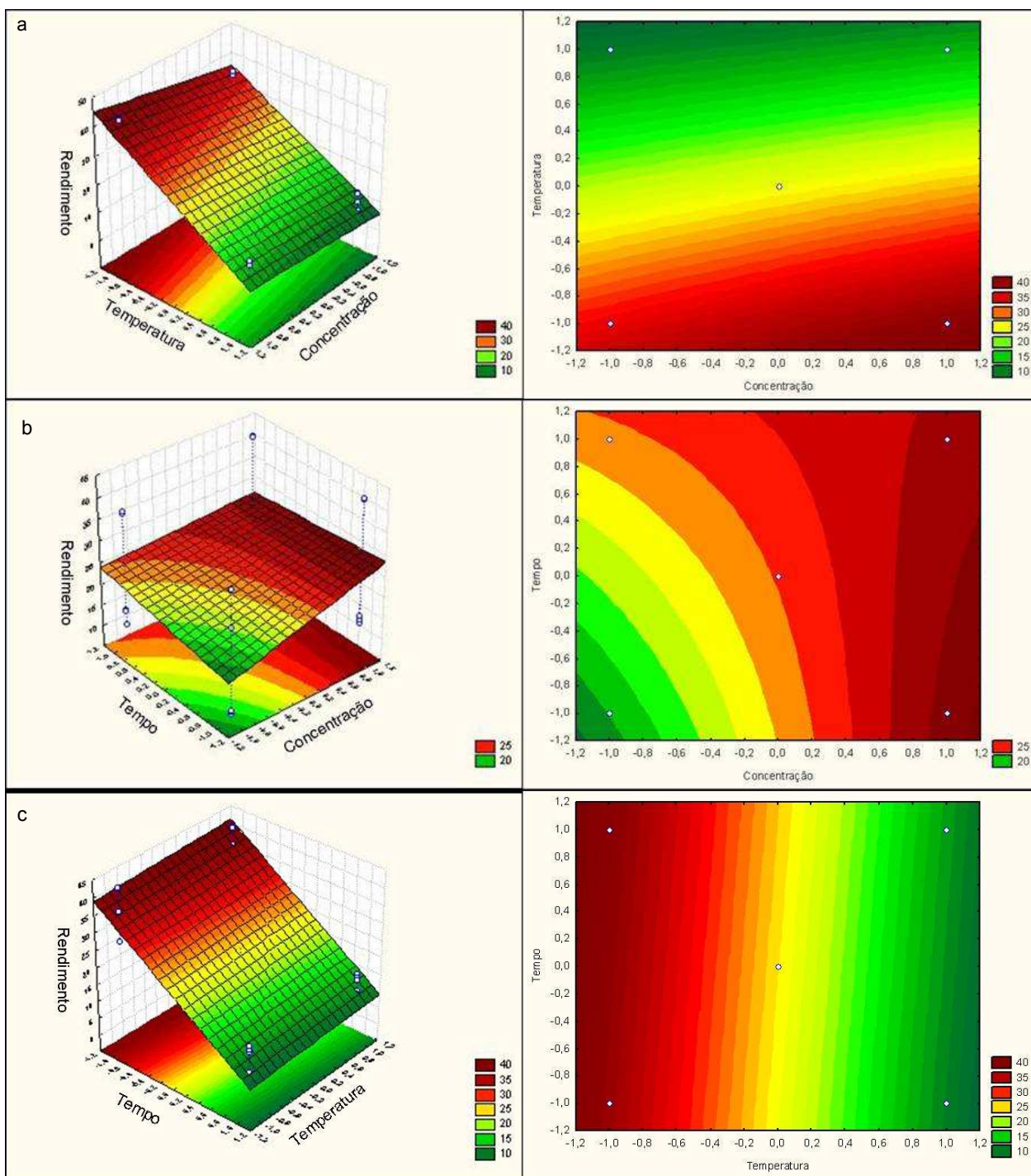


Figura 12. Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento de DDOS neutro no 1º experimento (a) temperatura e concentração de Na_2CO_3 ; (b) tempo e concentração de Na_2CO_3 ; (c) temperatura e tempo

5.1.2.2 Segundo Experimento

Baseado nos dados do 1º planejamento experimental elaborou-se o 2º planejamento, cuja matriz com valores reais, codificados e respostas estudadas estão representados na tabela 13. Realizou-se um planejamento fatorial 2^3 do tipo estrela, com 4 pontos centrais e ensaios em triplicata, onde através dos pontos axiais, foi possível definir melhor a região de ótimo para as respostas, sendo esta região, a de valores máximos para todas as respostas estudadas. Os resultados de redução de AGL, teor de α -TE e rendimento de DDOS neutro, foram tratados estatisticamente.

Tabela 13. Matriz de planejamento experimental completo de primeira ordem (valores reais e codificados) utilizada no 2º experimento e as respostas

Ensaio	Concen- tração (N)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Redução de AGL (%)	Teor de α -TE (%)	Rendimento em DDOS neutro (%)
1	3 (-1)	30 (-1)	2 (-1)	49,3 ^a	2,489 ^a	5,2 ^a
2	4 (1)	30 (-1)	2 (-1)	50,5 ^{bcd}	2,738 ^a	13,4 ^{cde}
3	3 (-1)	44 (1)	2 (-1)	49,3 ^a	2,151 ^a	7,7 ^{ab}
4	4 (1)	44 (1)	2 (-1)	50,2 ^{bc}	2,365 ^a	13,0 ^{cde}
5	3 (-1)	30 (-1)	3 (1)	49,5 ^a	2,214 ^a	5,5 ^a
6	4 (1)	30 (-1)	3 (1)	50,1 ^b	2,515 ^a	14,9 ^e
7	3 (-1)	44 (1)	3 (1)	49,7 ^{ab}	2,304 ^a	10,6 ^{bcde}
8	4 (1)	44 (1)	3 (1)	50,8 ^d	2,737 ^a	14,3 ^{de}
9	2,66 (-1,68)	37 (0)	2'30" (0)	49,6 ^a	2,285 ^a	7,0 ^a
10	4,34 (1,68)	37 (0)	2'30" (0)	50,8 ^d	2,681 ^a	24,5 ^f
11	3,5 (0)	25 (-1,68)	2'30" (0)	49,6 ^a	2,576 ^a	11,6 ^{bcde}
12	3,5 (0)	49 (1,68)	2'30" (0)	49,6 ^a	2,342 ^a	10,4 ^{bcd}
13	3,5 (0)	37 (0)	1'40" (-1,68)	49,6 ^a	2,304 ^a	9,2 ^{abc}
14	3,5 (0)	37 (0)	3'20" (1,68)	50,2 ^{bc}	2,367 ^a	13,3 ^{cde}
PC	3,5 (0)	37 (0)	2'30" (0)	50,2 ^{bc}	2,304 ^a	12,9 ^{cde}

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

PC (ponto central) correspondente aos ensaios 15, 16, 17 e 18

a) Resposta: Redução de AGL

Os teores de AGL no DDOS bruto e nos DDOS neutralizados, obtidos nos diferentes ensaios do 2º experimento, estão representados na figura 13, onde os melhores resultados para a redução de AGL foram nos ensaios 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12 e 13, ou seja, com concentração do álcali no nível mínimo estudado (3N), indo até o nível central (3,5N). Esta variação estatística não é considerada diferente em termos químicos, uma vez que as reduções de AGL variaram de 49,3 a 50,8%.

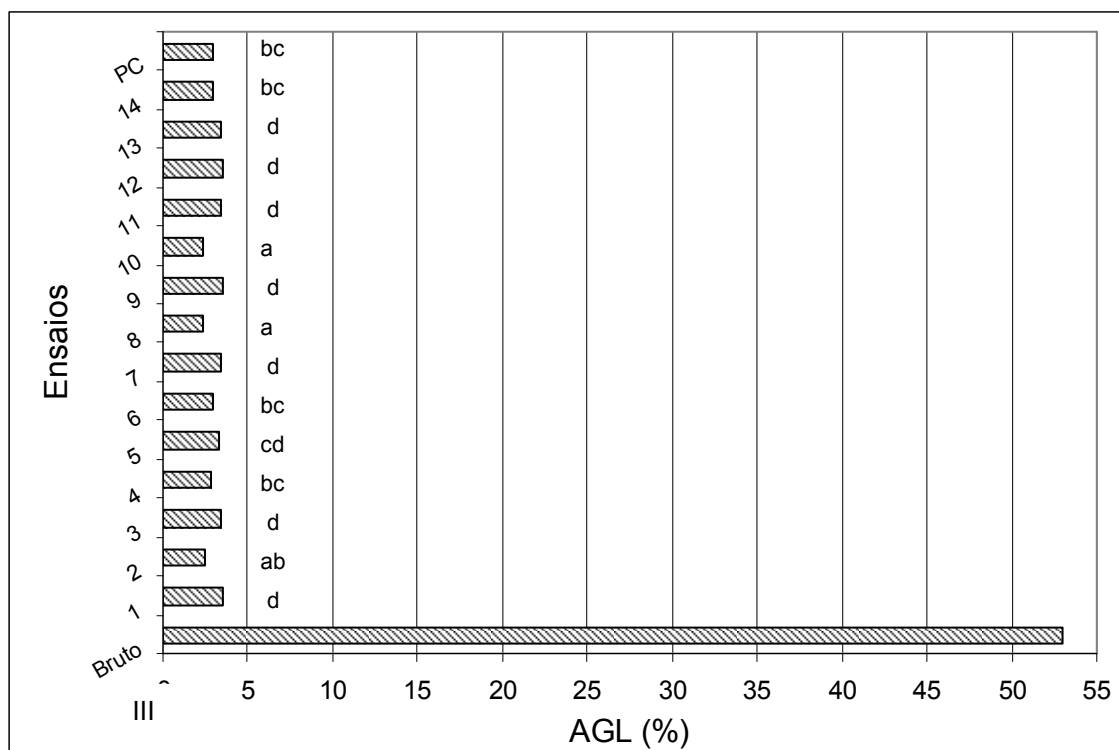


Figura 13. Teor de AGL (%) no DDOS bruto e nos DDOS neutros - 2º experimento fatorial

Letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

PC (ponto central) correspondente aos ensaios 15, 16, 17 e 18

A tabela 14 apresenta o efeito das variáveis na resposta redução de AGL, que foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Como existem 2 interações sem

significância estatística, elas foram retiradas do modelo matemático, para simplificação do mesmo.

Tabela 14. Efeito das variáveis no 2º planejamento fatorial para a resposta redução de AGL no DDOS neutro

	Coefficiente de regressão	Erro Puro	t (16)	p
Média *	50,1549	0,0655	765,91	0,0000
Concentração (L) *	0,4219	0,0218	19,35	0,0000
Concentração (Q)	0,0147	0,0287	0,51	0,6168
Temperatura (L)	0,0290	0,0218	1,33	0,2029
Temperatura (Q) *	-0,1861	0,0287	-6,47	0,0000
Tempo (L) *	0,1223	0,0218	5,61	0,0000
Tempo (Q) *	-0,0859	0,0287	-2,99	0,0087
Concentração (L) x Temperatura (L)	0,0172	0,0287	0,60	0,5545
Concentração (L) x Tempo (L)	-0,0521	0,0287	-1,83	0,0863
Temperatura (L) x Tempo (L) *	0,1374	0,0287	4,83	0,0002

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

(L) – fator em equação linear; (Q) – fator em equação quadrática

Na análise de variância para a redução de AGL, a relação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} é de 13,4 vezes ($F_{\text{calculado}} = 32,83$; $F_{\text{tabelado } 0,95;7;23} = 2,44$), sendo assim o modelo quadrático é adequado (Apêndice A). A variação explicada foi de 90,9% (R^2 em %) e a máxima variação explicável corresponde a 97,1%.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno apresentadas na figura 14, mostram que a maior redução de AGL do DDOS neutro ocorre nas regiões: a) com maior concentração de álcali e com temperatura em níveis médios; b) com maior concentração de álcali e tempo nos níveis médios; c) com temperatura e tempo nos níveis médios, mostrando-se bem otimizada.

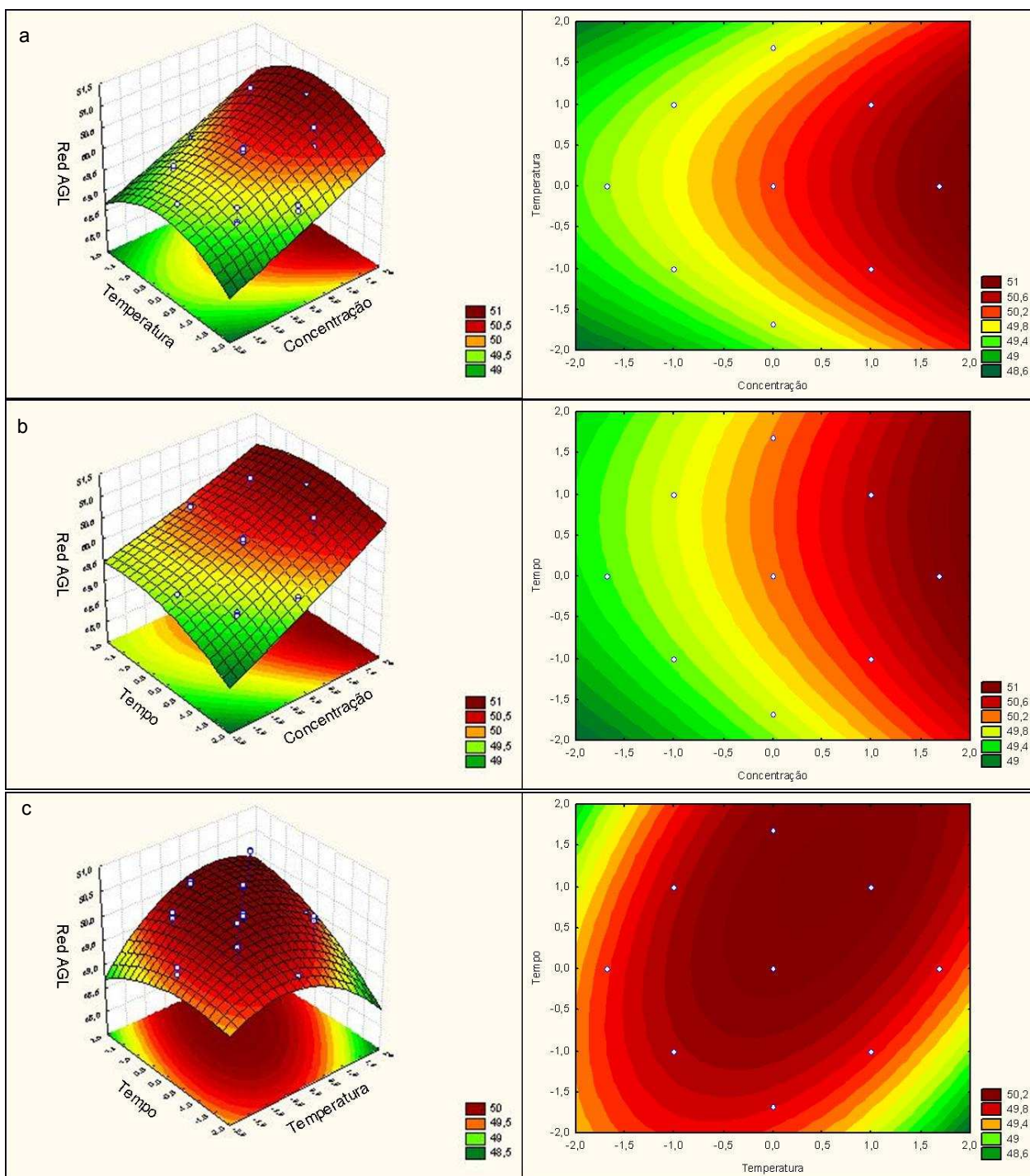


Figura 14. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a redução de AGL no 2º experimento (a) temperatura e concentração de Na_2CO_3 ; (b) tempo e concentração de Na_2CO_3 ; (c) temperatura e tempo

b) Resposta: Teor de α -TE

A tabela 15 apresenta os teores de cada isômero de tocoferol, bem como os tocoferóis totais no DDOS bruto e nos DDOS neutralizados obtidos com o 2º planejamento experimental. Como anteriormente, considera-se que cada isômero possui um poder vitamínico, convertendo-se em α -TE com os fatores: $\beta = 0,4027$; $\gamma = 0,1275$ e $\delta = 0,0067$. Os teores de α -TE nos DDOS neutros, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), entretanto os melhores resultados foram com maior concentração de álcali (ensaios 2, 4, 6, 8, 10 e 11).

Tabela 15. Teor de tocoferóis (%) dos DDOS bruto e neutros obtidos no 2º experimento

Amostra	α -tocoferol (%)	β -tocoferol (%)	γ -tocoferol (%)	δ -tocoferol (%)	Tocoferóis Totais (%)
Bruto III	1,28	0,22	6,59	2,36	10,44
Neutro					
1	1,67	0,22	5,67	1,60	9,15
2	1,82	0,25	6,32	1,77	10,16
3	1,46	0,21	4,69	1,39	7,75
4	1,60	0,22	5,27	1,53	8,61
5	1,51	0,20	4,82	1,44	7,97
6	1,69	0,22	5,69	1,64	9,24
7	1,56	0,22	5,09	1,50	8,36
8	1,82	0,25	6,29	1,77	10,14
9	1,55	0,21	5,03	1,47	8,25
10	1,80	0,24	6,09	1,75	9,88
11	1,74	0,23	5,79	1,61	9,36
12	1,59	0,21	5,13	1,49	8,43
13	1,56	0,21	5,07	1,48	8,32
14	1,60	0,22	5,26	1,56	8,64
PC	1,56	0,21	5,08	1,50	8,35

PC (ponto central) correspondente aos ensaios 15, 16, 17 e 18

A tabela 16 apresenta os coeficientes de regressão, os desvios padrão e valores de t e p para as variáveis, onde a maioria delas não tem influência estatística (5% de significância), entretanto apenas as interações entre variáveis não significativas foram ignoradas na elaboração do modelo. A análise de variância mostra que a variação explicada foi de 61,6% (R^2 em %) e a máxima variação explicável corresponde a 64,1%. A relação entre o $F_{\text{calculado}}$ (5,27) e o $F_{\text{tabelado } 0,95;7;23}$ (2,44) é pequena, sendo assim o modelo quadrático não é o mais adequado, entretanto como a falta de ajuste é pequena, o modelo deve ser reconsiderado para este processo (Apêndice A).

Tabela 16. Efeito das variáveis no 2º planejamento fatorial para a resposta teor de α -TE no DDOS neutro

	Coeficiente de regressão	Erro Puro	t (16)	p
Média *	2,3036	0,1076	21,40	0,0000
Concentração (L) *	0,13664	0,0358	3,81	0,0016
Concentração (Q)	0,0646	0,0472	1,37	0,1902
Temperatura (L)	-0,0581	0,0358	-1,62	0,1245
Temperatura (Q)	-0,0560	0,0472	1,19	0,2528
Tempo (L)	0,0097	0,0358	0,27	0,7901
Tempo (Q)	0,0125	0,0472	0,26	0,7954
Concentração (L) x Temperatura (L)	0,0121	0,0468	0,26	0,7996
Concentração (L) x Tempo (L)	0,0340	0,0468	0,73	0,4776
Temperatura (L) x Tempo (L) *	0,1280	0,0468	2,73	0,0147

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

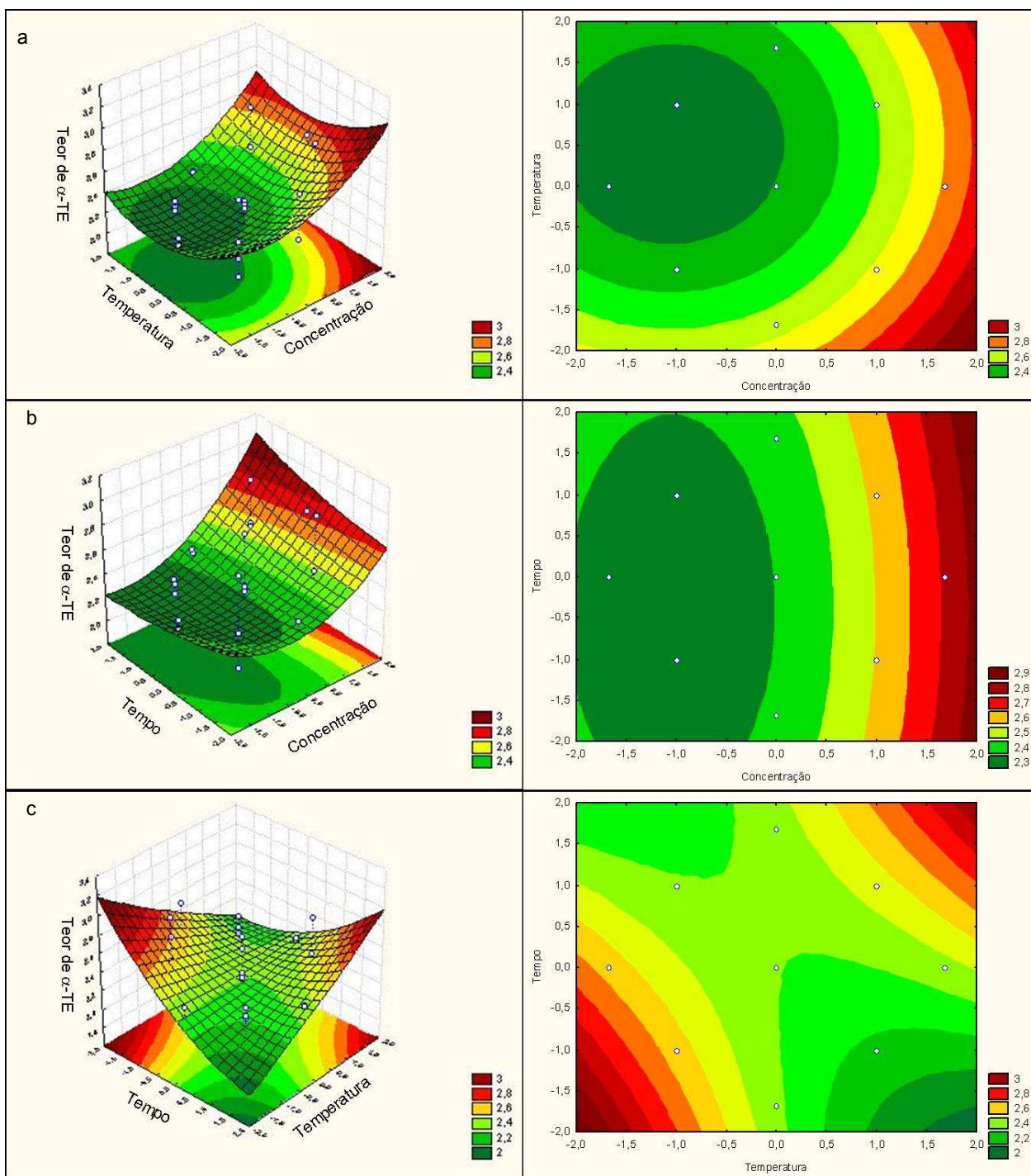


Figura 15. Superfícies de resposta e curvas de contorno para o teor de α -TE do DDOS neutro no 2º experimento (a) temperatura e concentração de Na_2CO_3 ; (b) tempo e concentração de Na_2CO_3 ; (c) temperatura e tempo

As superfícies de resposta e as curvas de contorno apresentadas na figura 15, mostram que o maior teor de α -TE está nas regiões com maior concentração de álcali (a; b) e com relação à temperatura e tempo (c), os maiores teores de α -TE estavam fora da faixa de operação do planejamento, formando faixas de elevado teor de tocoferóis nas extremidades onde os níveis são máximos (para temperatura e tempo) e mínimos (para temperatura e tempo). Matematicamente, as condições do processo não estão adequadas, entretanto, biologicamente a diferença entre os teores de α -TE é muito pequena, pois os resultados variam cerca de 0,5%.

c) Resposta: Rendimento de DDOS neutro

Os rendimentos obtidos nos ensaios do 2º planejamento, com melhores resultados (maior quantidade de DDOS neutro), foram os ensaios com a concentração do álcali maior ou mediana, coincidindo com o comportamento das variáveis nas demais respostas (redução de AGL e teor de α -TE). A tabela 17 apresenta o efeito das variáveis estudadas na resposta, para o prosseguimento da análise, as interações de 2ª ordem sem efeito estatisticamente significativo foram desconsideradas, para simplificação.

No Apêndice A, tem-se a tabela de análise de variância para o rendimento de DDOS neutro submetido a diferentes tipos de neutralização, onde o $F_{\text{calculado}}$ (4,30) em relação ao $F_{\text{tabelado } 0,95;7;23}$ (2,44) tem baixo valor (1,76), o que significa que os dados experimentais não se adequaram muito bem ao modelo. A variação explicada foi de 56,7% (R^2 em %) e a máxima variação explicável corresponde a 66,6%.

Tabela 17. Efeito das variáveis no 2º planejamento fatorial para a resposta rendimento de DDOS neutro

	Coeficiente de regressão	Erro Puro	t (16)	p
Média *	13,1786	0,6518	20,22	0,0000
Concentração (L) *	4,1138	0,2170	18,96	0,0000
Concentração (Q)	0,5055	0,2861	1,77	0,0963
Temperatura (L)	0,3314	0,2170	1,53	0,1463
Temperatura (Q) *	-1,1793	0,2861	-4,12	0,0008
Tempo (L) *	0,9506	0,2170	4,38	0,0005
Tempo (Q) *	-1,0934	0,2861	-3,82	0,0015
Concentração (L) x Temperatura (L)*	-1,0825	0,2834	-3,82	0,0015
Concentração (L) x Tempo (L)	-0,0513	0,2834	-0,18	0,8588
Temperatura (L) x Tempo (L)	0,3025	0,2834	1,07	0,3016

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

As superfícies de resposta e as curvas de contorno apresentadas na figura 16, mostram o mesmo perfil da resposta redução de AGL, onde o maior rendimento ocorre nas regiões: a) com maior concentração de álcali e com temperatura em níveis médios; b) com maior concentração de álcali e tempo nos níveis médios; c) com temperatura e tempo nos níveis médios, mostrando que a região com maior neutralização está otimizada.

Com base neste planejamento fatorial, verifica-se que para as respostas redução de AGL e rendimento de DDOS neutro, os melhores resultados foram para a variável concentração no maior nível estudado (4,34N). Para a resposta teor de α -TE, os melhores resultados também foram para com esta concentração, entretanto a região de ótimo não foi bem esclarecida.

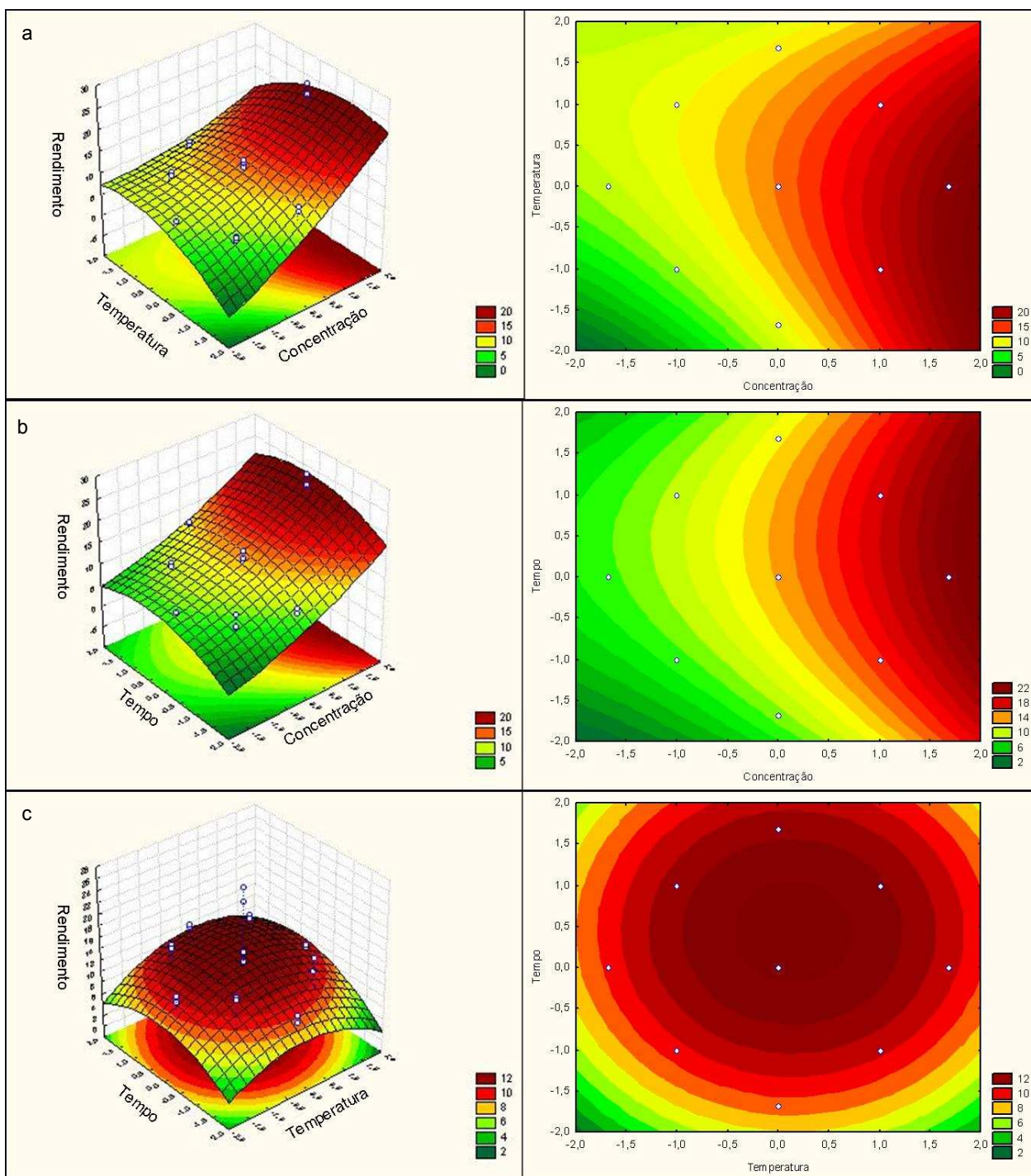


Figura 16. Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento de DDOS neutro no 2^o experimento (a) temperatura e concentração de Na_2CO_3 ; (b) tempo e concentração de Na_2CO_3 ; (c) temperatura e tempo

Através do programa STATISTICA 7.0 elaborou-se um gráfico *Desirability* (figura 21) que é a relação entre as respostas preditas pelas variáveis dependentes (redução de AGL, teor de α -TE e rendimento de DDOS neutro) e o desejável pelo pesquisador. Perfilar o *desirability* das respostas envolve, atribuir para cada variável dependente, valores que variam de 0 (muito indesejável) a 1 (muito desejável). As contagens individuais são combinadas, computando seu meio geométrico. Os perfis do *desirability* consistem em uma série de gráficos, um para cada variável independente (fatores: concentração de álcali, temperatura e tempo de homogeneização). Estes perfis podem mostrar em que níveis das variáveis são produzidas as respostas mais desejáveis nas variáveis dependentes. As variáveis mais relevantes (redução de AGL e teor de α -TE) nos níveis máximos foram atribuídos o valor de 1. Para o rendimento, este valor foi atribuído para o nível máximo e médio, indicando que não necessariamente seria o melhor.

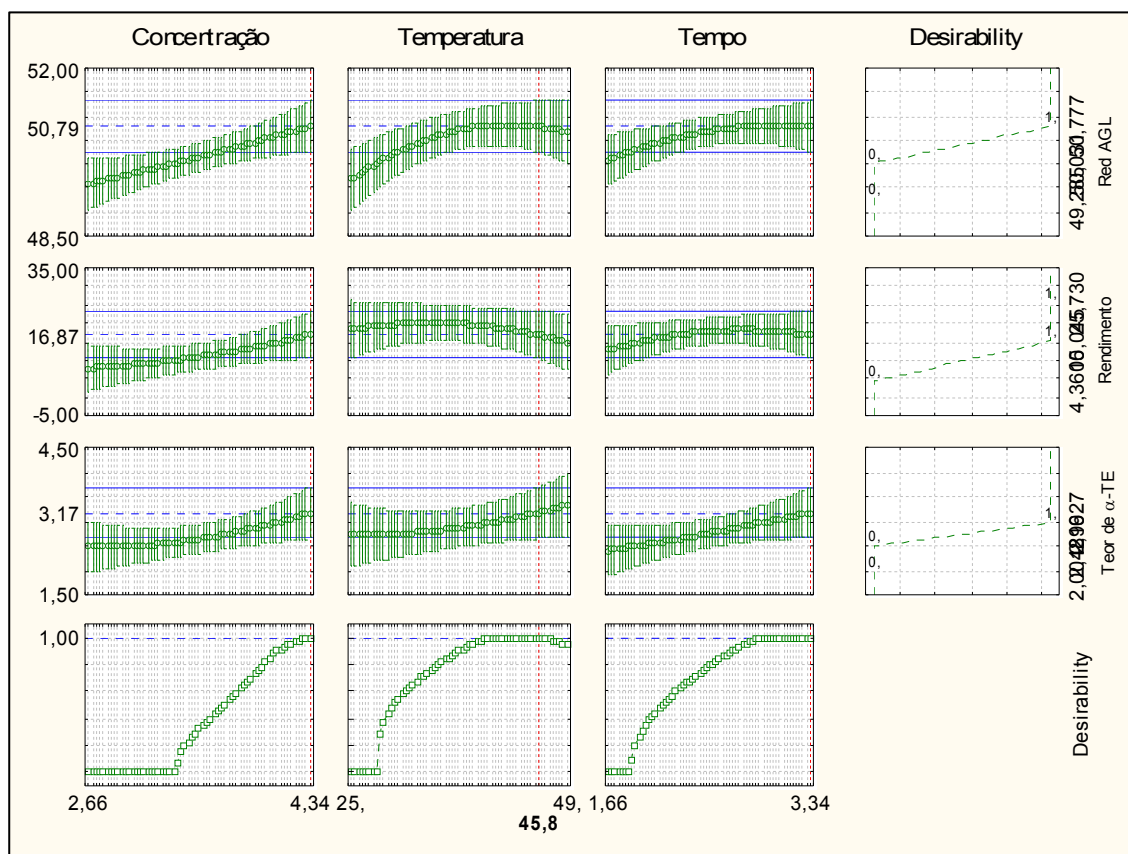


Figura 17. Valores Preditos e *Desirability* para as variáveis do 2º experimento

As respostas foram conciliadas para verificar os melhores níveis dos parâmetros de neutralização do DDOS (figura 17), onde as melhores condições foram: concentração do Na_2CO_3 de 4,34N, temperatura de 45,8°C e tempo de homogeneização de 3'20". Estas foram as condições ideais para este trabalho, com maior neutralização, menor arraste de tocoferóis e obtenção de maior quantidade de DDOS neutro. Utilizou-se estes parâmetros para neutralizar cerca de 7kg de DDOS bruto, a fim de obter-se a quantidade necessária de DDOS neutro, o qual foi utilizado para as análises físico-químicas de caracterização do mesmo, bem como para o ensaio biológico.

5.1.3 Caracterização do DDOS Neutro

O DDOS bruto apresentou 53,57% de AGL ($\pm 0,48$) e após a primeira neutralização, sob as condições estabelecidas no item 5.1.2 o teor de AGL foi para 6,14% ($\pm 0,31$), ou seja, foi reduzido em 47,43%. Realizando-se uma segunda neutralização, a concentração de AGL caiu para 1,80% ($\pm 0,10$). Assim, o DDOS que foi neutralizado teve seu teor de AGL reduzido cerca de 52% em valores absolutos. Entretanto com a segunda neutralização, o arraste de tocoferóis aumentou, já que seu teor não se elevou como o esperado.

Na tabela 18 constam os teores de cada isômero de tocoferol, bem como seus equivalentes em α -tocoferol (α -TE). Ambos os dados não diferem dos descritos por AUGUSTO (1988) e ALMEIDA *et al.* (2003). O DDOS utilizado por MARTINS *et al.* (2006b), apresenta teor de AGL 57,8%, ou seja, um pouco mais elevado que os obtidos neste trabalho. Já o teor de tocoferóis totais é inferior (8,97%), diferindo na proporção dos isômeros α -T (2,91%), β -T (0,14%), γ -T (4,66%) e δ -T (1,25%).

Com a tabela 19, nota-se dentre os AG que constituem o DDOS bruto e neutro, destacam-se o palmítico, oléico e linoléico, assim como nas análises de ALMEIDA *et al.* (2003), onde o DDOS bruto continha 17,7% de palmítico, 23,3% de oléico e 43,3% de linoléico. AUGUSTO (1988) corrobora estes dados, obtendo como AG com maiores teores no DDOS bruto: o palmítico 23,11%, o oléico 19,52% e o linoléico 48,51%.

Tabela 18. Teor de tocoferóis totais (%) e seus isômeros nos DDOS bruto e neutro

Amostra	Teor de isômeros (%)						Total (%)	
	α	β	α -TE	γ	α -TE	δ	α -TE	isômeros α -TE
Bruto	1,28	0,22	0,09	6,59	0,84	2,36	0,02	10,44
DP ($\pm$)	0,02	0,01		0,03		0,04		
CV	1,39	5,94		0,39		1,69		
Neutro	2,03	0,25	0,10	6,67	0,85	2,03	0,01	10,98
DP ($\pm$)	0,04	0,01		0,28		0,08		2,99
CV	2,02	1,70		4,15		3,99		

Tabela 19. Composição em ácidos graxos (%) no DDOS bruto e no DDOS neutro

AG	DDOS Bruto (%)	DDOS Neutro (%)
14:0	0,24	0,21
16:0	17,77	14,46
16:1	0,14	0,15
18:0	6,52	4,11
18:1 t	1,61	1,58
18:1 c	23,33	23,98
18:2 t	0,53	0,71
18:2 c	43,34	47,51
18:3 t	1,02	1,48
18:3 c	4,14	4,08
20:0	0,46	0,77
20:1	0,18	0,23
22:0	0,47	0,56
22:1	nd	nd
24:0	0,26	0,25
24:1	nd	nd

As principais características físicas e químicas das amostras de DDOS estão descritas na tabela 20, em relação aos índices de oxidação do DDOS bruto

e neutro, é evidenciada a diminuição destes no DDOS neutro, ou seja, estes produtos foram parcialmente separados durante o processo de neutralização. Na literatura não foram encontrados valores de referência para estes índices, isto porque são dados bem característicos da qualidade no armazenamento do produto.

Tabela 20. Caracterização físico-química do DDOS bruto e DDOS neutro

Análises *	DDOS					
	Bruto			Neutro		
IP (mEq/kg)	7,5 ($\pm 2,7$)			4,8 ($\pm 0,9$)		
TBA (mg MDA/kg) *	16,0 ($\pm 4,2$)			11,0 ($\pm 3,5$)		
Índice de Iodo (mEq Iodo/g amostra)	109,6 ($\pm 1,8$)			114,8 ($\pm 4,2$)		
Índice de Saponificação (mg KOH/g amostra)	159,4 ($\pm 3,7$)			130,2 ($\pm 4,6$)		
Teor de água (%)	0,8 ($\pm 0,1$)			0,8 ($\pm 0,1$)		
Valor calórico (kcal/g)	9,5 ($\pm 0,01$)			9,7 ($\pm 0,1$)		
Matéria Insaponificável (%)	20,1 ($\pm 0,1$)			35,4 ($\pm 1,0$)		
Densidade	0,906 ($\pm 0,002$)			0,906 ($\pm 0,001$)		
Cor	L*	a*	b*	L*	a*	b*
	52,46 ($\pm 0,04$)	31,10 ($\pm 0,05$)	77,43 ($\pm 0,05$)	18,65 ($\pm 0,39$)	33,94 ($\pm 0,34$)	29,67 ($\pm 0,71$)

* Médias ($\pm$ DP)

ALMEIDA *et al.* (2003) realizou as análises de densidade, índice de saponificação e resíduo de evaporação, sendo que as 2 primeiras análises

corroboram com as realizadas neste trabalho, mas o teor de água é maior, possivelmente devido a diferenciação na metodologia empregada. O valor calórico do DDOS, medido por bomba calorimétrica, é coerente com o de produtos oleosos (cerca de 9 kcal/g). Quanto ao teor de matéria insaponificável, as amostras de ALMEIDA *et al.* (2003) foram muito variáveis (3,5 – 27,1%), como no DDOS utilizado neste trabalho este teor foi maior (20,06%), o conteúdo de tocoferóis também deve ser maior, já que os tocoferóis são parte integrante da matéria insaponificável. Este fato é confirmado, pois no DDOS deste trabalho, o teor de tocoferóis totais é de 10,4% e na amostra com maior teor de matéria insaponificável de ALMEIDA *et al.* (2003) este teor foi de 8,6%.

De acordo com AUGUSTO (1988) a caracterização do DDOS bruto apresenta os seguintes resultados: peso específico de 0,9116; índice de peróxidos de 3,40; índice de acidez de 37,09; índice de saponificação de 159,40; sólidos totais 95,26%, ácidos graxos totais variando entre 58,13 e 60,13%; AGL 37,09%; matéria insaponificável entre 26,1 e 36,46% e tocoferóis totais 8,50%. Após esta caracterização físico-química, onde o principal aspecto foi o teor de tocoferóis, este DDOS neutro foi utilizado na suplementação de ratos Wistar, durante o ensaio biológico.

5.2 Aplicação Biológica do DDOS

5.2.1 Caracterização da Dieta Experimental e dos Suplementos

Os resultados da determinação da composição proximal da dieta experimental utilizada no ensaio biológico estão expressos na tabela 21 e estão de acordo com o previsto pelos cálculos de elaboração da dieta.

A tabela 22 apresenta o teor de tocoferóis totais e seus isômeros, para todos os produtos utilizados como suplemento para os animais (DDOS neutro, óleo de soja e Ephynal®). Para o DDOS neutro, transformando-se o teor de cada isômero para α -TE, obtém-se para β -T 0,10% de α -TE, para γ -T 0,85% de α -TE, para δ -T 0,01% de α -TE e como somatório dos α -TE tem-se 2,99%. No óleo de soja esta conversão resulta em 0,001% α -TE e 0,01% α -TE respectivamente para

os isômeros β -T e γ -T. A quantidade de δ -T foi muito pequena e o somatório de α -TE foi de 0,026%.

Tabela 21. Composição proximal (%), valor energético (kcal/100g) e teor de α -TE (%) da dieta experimental AIN-93G

Componente	AIN-93G
Umidade (%)	12,715
Proteína Bruta (%)	12,793
Minerais Totais (%)	3,311
Lipídios Totais (%)	6,938
Fibra Bruta (%)	5,006
Carboidratos (%)*	59,237
Valor energético (kcal/100g) **	350,562
α -TE (%)	0,001

* Determinação de carboidratos feita por diferença

** Valor energético = (proteína bruta x 4) + (lipídios totais x 9) + (carboidratos) x 4

Tabela 22. Teor de isômeros de tocoferóis (%), tocoferóis totais (%) e equivalentes de α -tocoferol (%) nos suplementos administrados a ratos Wistar

Amostra	Teor de isômeros (%)				Total (%)	
	α	β	γ	δ	isômeros	α-TE
DDOS neutro	2,03	0,25	6,67	2,03	10,976	2,990
DP(±)	0,041	0,004	0,277	0,081		
Óleo de Soja	0,02	0,002	0,07	0,02	0,102	0,026
DP (±)	0,001	0,00	0,006	0,001		
Ephynal®	3,75				3,75	3,75
DP (±)	0,049					

A análise de AG dos produtos utilizados na suplementação está relacionada na tabela 23, onde se destacam os AG palmítico, oléico e linoléico em todos os suplementos. Os teores de AG do DDOS não foram afetados com a neutralização (tabela 19), o óleo de soja apresentou 11,4% de palmítico, 24,2% de oléico e

51,4% de linoléico, não diferindo muito dos encontrados por AUGUSTO (1988), sendo respectivamente, 10,9%, 21,8% e 57,1%.

Tabela 23. Composição em ácidos graxos (%) nos produtos utilizados na suplementação dos animais

AG	DDOS Neutro (%)	Soja (%)	Ephynal® (%)
14:0	0,21	0,09	0,15
16:0	14,46	11,38	12,74
16:1	0,15	0,10	nd
18:0	4,11	4,57	4,44
18:1 t	1,58	0,15	nd
18:1 c	23,98	24,24	26,36
18:2 t	0,71	0,74	0,37
18:2 c	47,51	51,44	50,51
18:3 t	1,48	1,71	0,65
18:3 c	4,08	4,09	4,26
20:0	0,77	0,43	0,51
20:1	0,23	0,24	nd
22:0	0,56	0,50	0,53
22:1	nd	0,08	0,37
24:0	0,25	0,19	0,35
24:1	nd	0,10	nd

5.2.2 Avaliação Biológica dos Animais

O perfil comportamental dos animais foi observado ao longo do experimento e foi considerado totalmente dentro da normalidade, sem sinais de agressividade, irritação, ou perturbação acarretada pela gavagem diária. A figura 18 apresenta a curva de crescimento ponderal média dos animais ao longo dos 60 dias de experimentação, já as figuras 19 e 20 apresentam respectivamente, os

ganhos de peso médio dos ratos para 30 e 60 dias de suplementação. Tais dados corroboram as observações do comportamento dos animais.

A evolução ponderal dos ratos foi muito semelhante em todos os tratamentos, evidenciando a homogeneidade dos grupos e a não influência das diferentes suplementações no crescimento dos animais. Com as curvas de ganho de peso, percebe-se que no segundo mês de experimento os grupos se distanciam um pouco, sobressaindo-se os grupos suplementados com DDOS nos diferentes níveis. Comparando-se os pesos destes animais experimentais aos animais de referência do Instituto Galas, nota-se que de acordo com as faixas etárias, os pesos são muito semelhantes. Os animais de T0, com 4 semanas de idade, a média dos pesos dos animais experimentais foi 66,7g correspondendo a 77% dos animais de referência (média 86,9g). Aos 30 e 60 dias de experimento, ou seja, nas 8ª e 12ª semanas de vida, os animais experimentais apresentavam peso de respectivamente 252,0g e 348,0g, enquanto os de referência 254,8g e 355,6g, correspondendo a 99 e 98% do padrão Galas (TACONIC FARMS, 2005).

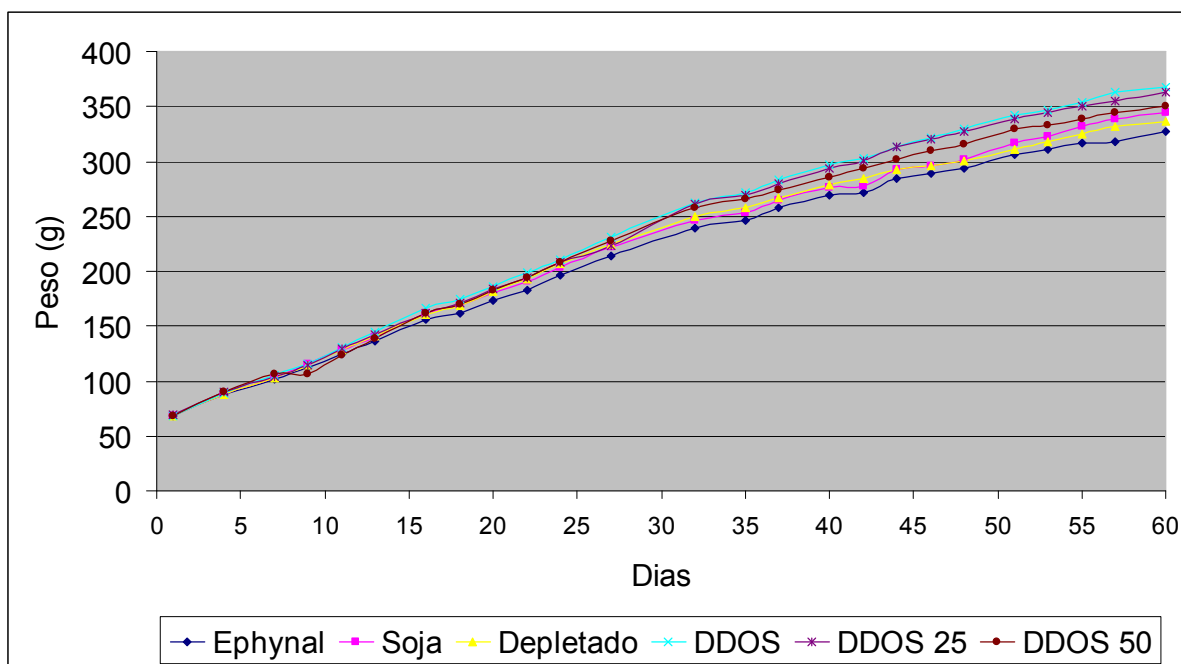


Figura 18. Evolução ponderal dos ratos submetidos as diferentes suplementações durante 60 dias de experimento (n=42, 7 ratos/grupo)

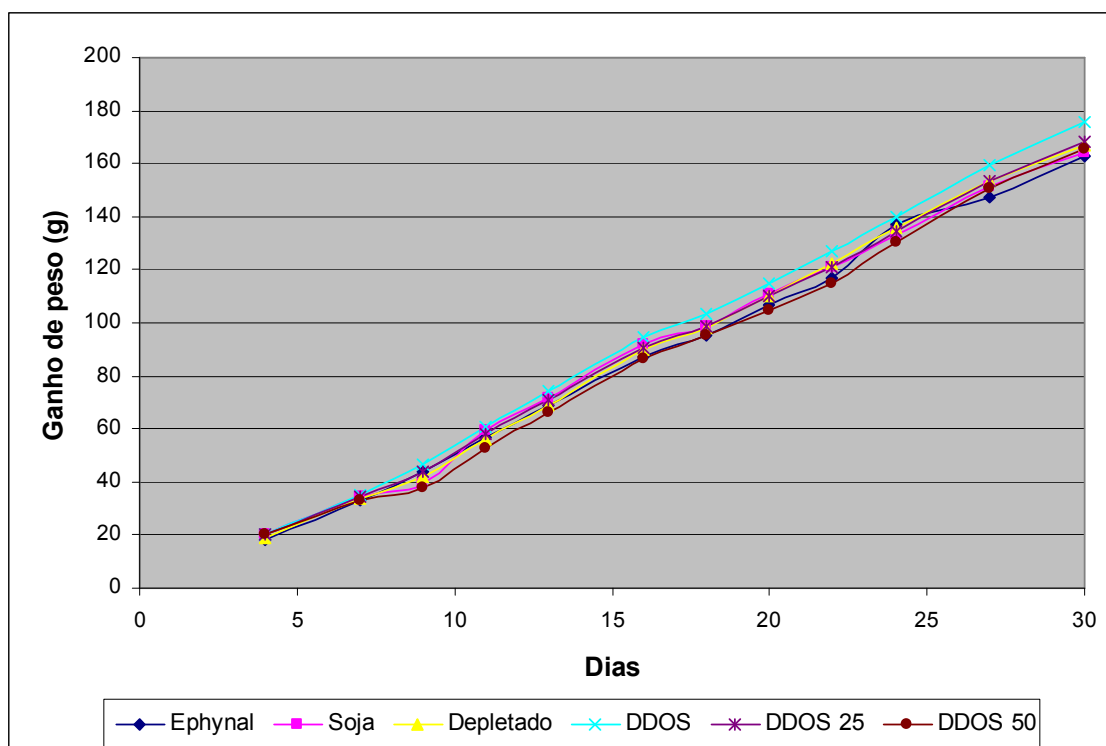


Figura 19. Curva de ganho de peso médio dos animais durante 30 dias (n=42)

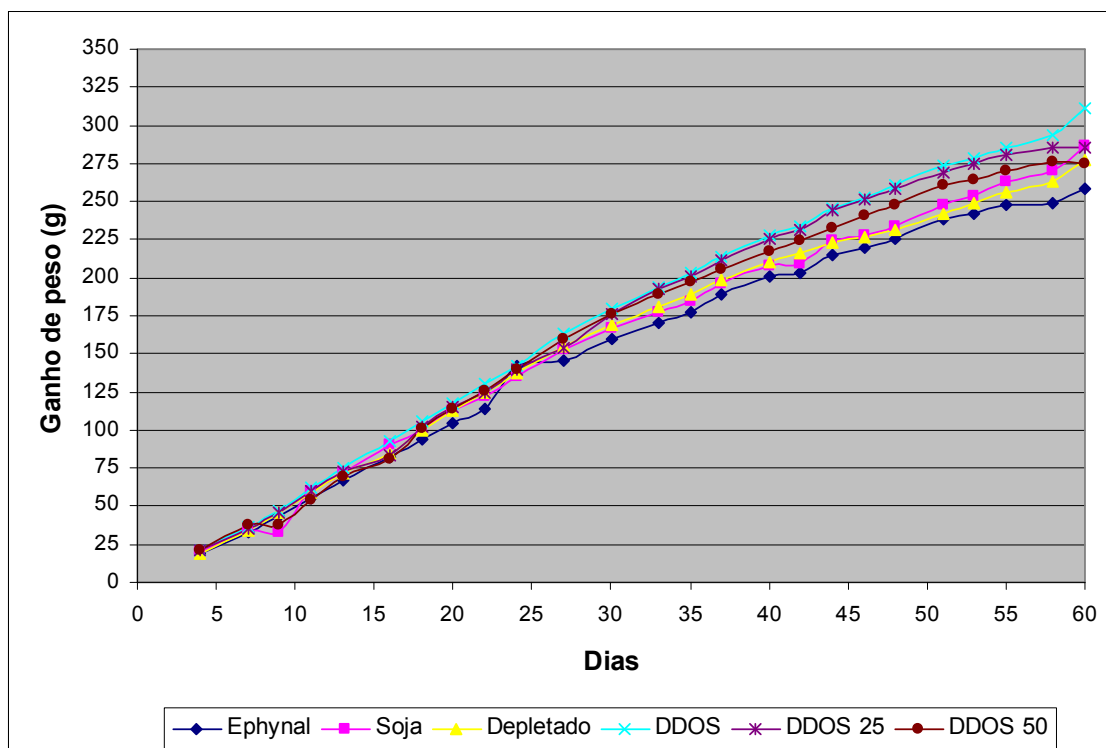


Figura 20. Curva de ganho de peso médio dos animais durante 60 dias (n=42)

A tabela 24 apresenta os valores médios de ingestão de dieta e excreção, onde se observa que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos, aos 30 e aos 60 dias, sendo que os valores aos 60 dias são maiores devido ao crescimento dos animais. Também constam na tabela os valores de eficiência alimentar, que é um método de avaliação que compreende a determinação do valor nutritivo através de avaliação biológica, relacionando o ganho de peso do animal e o consumo alimentar, como “eficiência de conversão alimentar” (PELLET & YOUNG, 1980). Este indicador tem sido muito usado em nutrição experimental e toxicologia, seus valores indicam que as diferentes suplementações não alteraram a eficiência da dieta. Para 30 dias são melhores, ou seja, a eficiência alimentar dos ratos durante os primeiros 30 dias de experimento é maior. Isto significa dizer que os ratos utilizaram melhor a dieta que comeram para converter em peso corporal, o que de certa forma é esperado, pois estão em fase de crescimento. Dos 30 aos 60 dias de experimento, os animais diminuem sua velocidade de crescimento e o que consomem é mais utilizado para a manutenção fisiológica. Os valores encontrados estão em concordância com outros estudos para ratos em crescimento (BOTELHO *et al.*, 2005; QUEIROZ-MONICI *et al.*, 2005).

Em estudo com DDOS como fonte de vitamina E para ratos Wistar durante 10 dias, observou-se que os animais suplementados com DDOS bruto e neutralizado apresentaram redução significativa do quociente de eficiência protéica (NPR), no quociente de conversão alimentar (QCA) e leve diminuição na evolução ponderal dos animais em relação ao controle fármaco Ephynal[®], indicando que o DDOS influenciou os índices analisados de forma negativa, o que os autores chamaram de “fatores antinutricionais ou tóxicos”, fazendo com que o DDOS neutro tenha sido superior ao DDOS bruto, mas sem se equiparar ao controle (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Entretanto, de acordo com a metodologia utilizada, é bastante provável que a neutralização dos AGL tenha sido incompleta, pois consta que tenha sido feita uma redução nos AGL, não uma neutralização completa dos mesmos.

Tabela 24. Valores médios de ingestão e excretas (g/dia) e eficiência alimentar aos 30 e 60 dias de experimento (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	Ingestão (g/dia)	Excreta (g/dia)	Eficiência Alimentar *
30 dias			
Depletado	15,77 ^a (± 2,85)	1,56 ^a (± 0,57)	0,37 ^a (± 0,03)
Soja	15,26 ^a (± 2,41)	1,49 ^a (± 0,52)	0,37 ^a (± 0,02)
Ephynal [®]	14,81 ^a (± 2,79)	1,70 ^a (± 0,66)	0,38 ^a (± 0,02)
DDOS	15,51 ^a (± 3,09)	1,69 ^a (± 0,73)	0,39 ^a (± 0,02)
DDOS 25	15,37 ^a (± 3,20)	1,77 ^a (± 0,72)	0,38 ^a (± 0,03)
DDOS 50	15,03 ^a (± 3,32)	1,75 ^a (± 0,75)	0,38 ^a (± 0,02)
60 dias			
Depletado	19,61 ^a (± 0,54)	1,87 ^a (± 0,54)	0,24 ^a (± 0,04)
Soja	19,60 ^a (± 0,52)	1,82 ^a (± 0,52)	0,24 ^a (± 0,02)
Ephynal [®]	18,86 ^a (± 0,29)	1,96 ^a (± 0,29)	0,23 ^a (± 0,03)
DDOS	19,74 ^a (± 0,37)	2,04 ^a (± 0,37)	0,26 ^a (± 0,03)
DDOS 25	20,61 ^a (± 0,36)	2,11 ^a (± 0,36)	0,24 ^a (± 0,03)
DDOS 50	21,09 ^a (± 0,38)	1,97 ^a (± 0,38)	0,22 ^a (± 0,02)

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período * Eficiência Alimentar = ganho de peso total / consumo de dieta total

A figura 21 apresenta a média de consumo de dieta (g) de cada rato de acordo com o período em que foram feitas as pesagens dos animais, percebe-se que os tratamentos não diferiram entre si, o que mostra a homogeneidade dos animais, já que a vitamina E não influencia diretamente nestes parâmetros, além de indicar que o DDOS não altera o desenvolvimento dos animais.

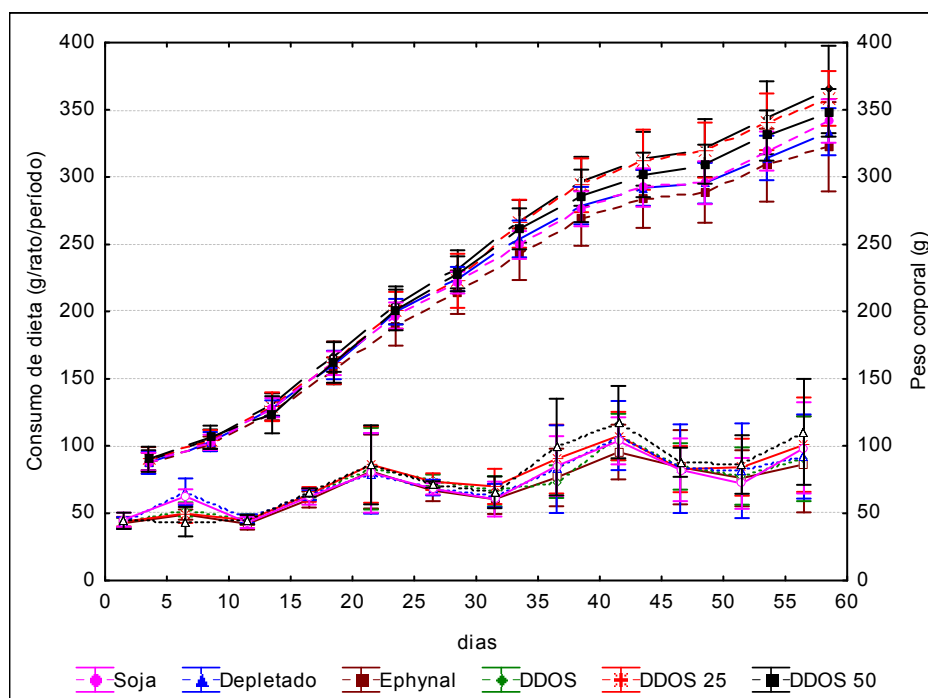


Figura 21. Consumo de dieta (g/rato/período) e peso corporal (g) dos ratos (n=42)

Marcadores cheios indicam valores referentes ao peso médio (g)

Marcadores vazios indicam valores referentes ao consumo médio de dieta (g)

A relação entre o peso dos órgãos e o peso corporal dos ratos também não diferiu entre as suplementações, aos 30 e aos 60 dias como expressos na tabela 25, demonstrando mais uma vez, a homogeneidade entre os animais e sendo mais um indicativo de que o DDOS não acarreta em alterações biológicas. Os valores encontrados para os animais de referência foram: 0,36g/100g de peso corporal para baço; 1,06g/100g para rins; 3,91g/100g para fígado; 0,65g/100g para coração; 0,76g/100g para pulmões e 0,99g/100g para testículos. Vale ressaltar que esta relação, de acordo com o tempo vai diminuindo, ou seja, com o

crescimento corpóreo do animal, a proporção diminui levemente e se mantém após o período de crescimento. Para animais mais velhos (21 semanas), esta proporção é de: 0,17g/100g para baço; 0,65g/100g para rins; 2,75g/100g para fígado; 0,30g/100g para coração; 0,44g/100g para pulmões e 0,93g/100g para testículos (TACONIC FARMS, 2005).

Todos os aspectos da avaliação biológica auxiliam também a indicar um possível efeito toxicológico dos suplementos. Sendo assim, a suplementação com DDOS neutro, não apresentou comprometimentos, nem tão pouco, alterações macroscópicas nos órgãos. Em trabalho com suplemento de DDOS (0,5 mL/rato/dia) durante 14 dias, os ratos que receberam o produto não apresentaram alterações nem diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p>0,05$) para os dados avaliados: consumo de dieta, crescimento dos animais e relação entre peso dos órgãos e peso corporal, para rins, fígado, pulmões, testículos e coração, indicando que os componentes do DDOS não apresentaram toxicidade aguda aos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Tabela 25. Relação entre o peso dos órgãos (g) e o peso corporal (100g) dos ratos aos 30 e 60 dias de experimento (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	Relação Peso Órgão / Peso Corporal (g/100g)					
	Baço	Rins	Fígado	Coração	Pulmões	Testículos
30 dias						
Depletado	0,26 ^a (± 0,05)	0,78 ^a (± 0,07)	3,43 ^a (± 0,24)	0,38 ^a (± 0,09)	0,53 ^a (± 0,07)	1,25 ^a (± 0,08)
Soja	0,25 ^a (± 0,04)	0,77 ^a (± 0,05)	3,42 ^a (± 0,32)	0,39 ^a (± 0,04)	0,55 ^a (± 0,05)	1,30 ^a (± 0,15)
Ephynal [®]	0,29 ^a (± 0,07)	0,76 ^a (± 0,05)	3,43 ^a (± 0,27)	0,40 ^a (± 0,07)	0,54 ^a (± 0,08)	1,29 ^a (± 0,10)
DDOS	0,27 ^a (± 0,03)	0,80 ^a (± 0,06)	3,78 ^a (± 0,32)	0,36 ^a (± 0,05)	0,55 ^a (± 0,09)	1,26 ^a (± 0,05)
DDOS 25	0,27 ^a (± 0,03)	0,78 ^a (± 0,05)	3,75 ^a (± 0,22)	0,38 ^a (± 0,03)	0,56 ^a (± 0,03)	1,31 ^a (± 0,14)
DDOS 50	0,30 ^a (± 0,03)	0,81 ^a (± 0,04)	3,65 ^a (± 0,27)	0,39 ^a (± 0,05)	0,57 ^a (± 0,07)	1,25 ^a (± 0,07)
60 dias						
Depletado	0,22 ^a (± 0,03)	0,68 ^a (± 0,07)	2,93 ^a (± 0,54)	0,34 ^a (± 0,05)	0,46 ^a (± 0,10)	1,02 ^a (± 0,07)
Soja	0,24 ^a (± 0,03)	0,62 ^a (± 0,04)	2,71 ^a (± 0,18)	0,33 ^a (± 0,03)	0,43 ^a (± 0,04)	1,00 ^a (± 0,07)
Ephynal [®]	0,21 ^a (± 0,03)	0,64 ^a (± 0,04)	2,88 ^a (± 0,16)	0,33 ^a (± 0,04)	0,43 ^a (± 0,06)	0,99 ^a (± 0,11)
DDOS	0,23 ^a (± 0,02)	0,63 ^a (± 0,06)	3,00 ^a (± 0,15)	0,31 ^a (± 0,02)	0,42 ^a (± 0,04)	0,98 ^a (± 0,09)
DDOS 25	0,20 ^a (± 0,04)	0,62 ^a (± 0,05)	2,93 ^a (± 0,14)	0,31 ^a (± 0,03)	0,40 ^a (± 0,03)	0,99 ^a (± 0,09)
DDOS 50	0,21 ^a (± 0,03)	0,65 ^a (± 0,07)	3,02 ^a (± 0,27)	0,31 ^a (± 0,03)	0,43 ^a (± 0,04)	1,02 ^a (± 0,09)

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período

5.2.3 Perfil Lipídico dos Ratos

Os valores de triacilgliceróis e colesterol total são importantes na avaliação do metabolismo de lipídios. Quando os mesmos estão elevados indicam hiperlipidemias e até doenças hepáticas, do contrário, podem presumir desde desnutrição até síndrome da má-absorção.

Neste trabalho, os animais de referência (T0) apresentaram triacilgliceróis séricos de 60,1 mg/dL ($\pm 20,9$) e colesterol total sérico de 65,6 mg/dL ($\pm 7,5$). Para ratos de referência do Instituto Galas, com 21 semanas, os TAG foram de 86,7 mg/dL ($\pm 26,7$) e colesterol 66,3 mg/dL ($\pm 12,9$), não diferindo dos observados experimentalmente neste estudo (TACONIC FARMS, 2005). Na tabela 26 pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos aos 30 e aos 60 dias, indicando que o perfil lipídico dos animais não se alterou com a suplementação. Entretanto, nota-se uma grande variação na dosagem de triacilgliceróis (elevado desvio padrão), possivelmente devido a uma homeostase não tão bem regulada quanto a do metabolismo do colesterol, além da própria variabilidade entre os animais.

As figuras 22 e 23 apresentam os teores de lipídios totais nos tecidos hepático e muscular dos animais. Os valores encontrados nos animais de referência foram de 6,37% ($\pm 0,66$) e 4,91% ($\pm 0,15$), sendo respectivamente em fígado e músculo.

Tabela 26. Valores médios dos triacilgliceróis e colesterol total séricos dos animais suplementados durante 30 e 60 dias (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	Triacilglicerol sérico (mg/dL)	Colesterol Total sérico (mg/dL)
30 dias		
Depletado	137,80 ^a (± 58,02)	64,58 ^a (± 5,91)
Soja	108,42 ^a (± 44,52)	66,80 ^a (± 5,11)
Ephynal [®]	107,22 ^a (± 36,89)	70,11 ^a (± 11,98)
DDOS	145,61 ^a (± 39,36)	79,11 ^a (± 18,21)
DDOS 25	115,20 ^a (± 29,36)	71,04 ^a (± 4,84)
DDOS 50	98,48 ^a (± 31,52)	67,39 ^a (± 9,72)
60 dias		
Depletado	72,88 ^a (± 43,81)	58,99 ^a (± 6,59)
Soja	73,58 ^a (± 13,23)	64,01 ^a (± 13,54)
Ephynal [®]	90,34 ^a (± 29,06)	68,60 ^a (± 10,72)
DDOS	93,77 ^a (± 36,53)	69,89 ^a (± 10,10)
DDOS 25	98,69 ^a (± 15,68)	65,82 ^a (± 6,32)
DDOS 50	84,13 ^a (± 21,90)	65,80 ^a (± 10,43)

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período

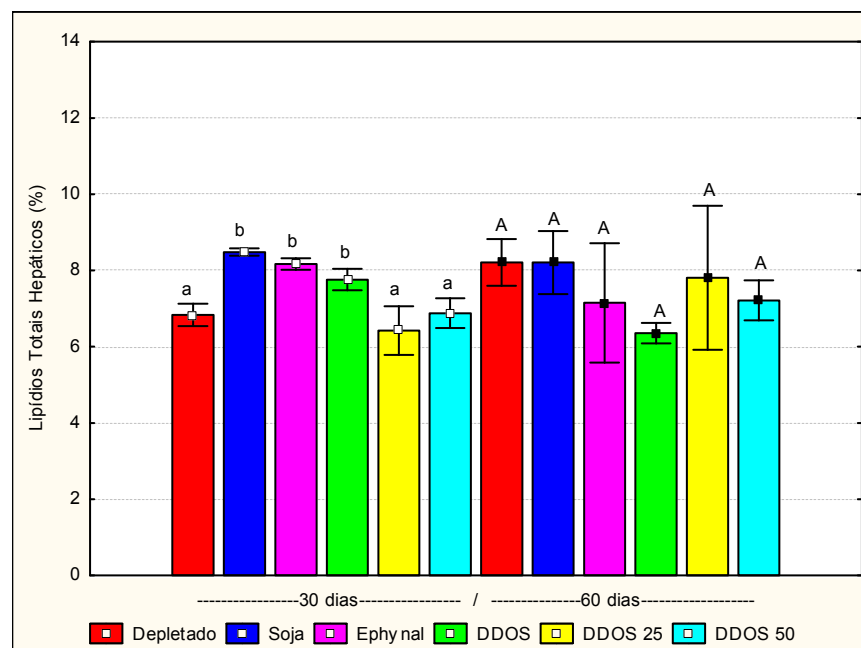


Figura 22. Teor de lipídios totais (%) no fígado dos ratos (n=42, 7 ratos/grupo)

Marcadores vazios indicam valores referentes a 30 dias e marcadores cheios referentes a 60 dias
 Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$ - teste de Tukey) aos 30 dias
 Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$ - teste de Tukey) aos 60 dias

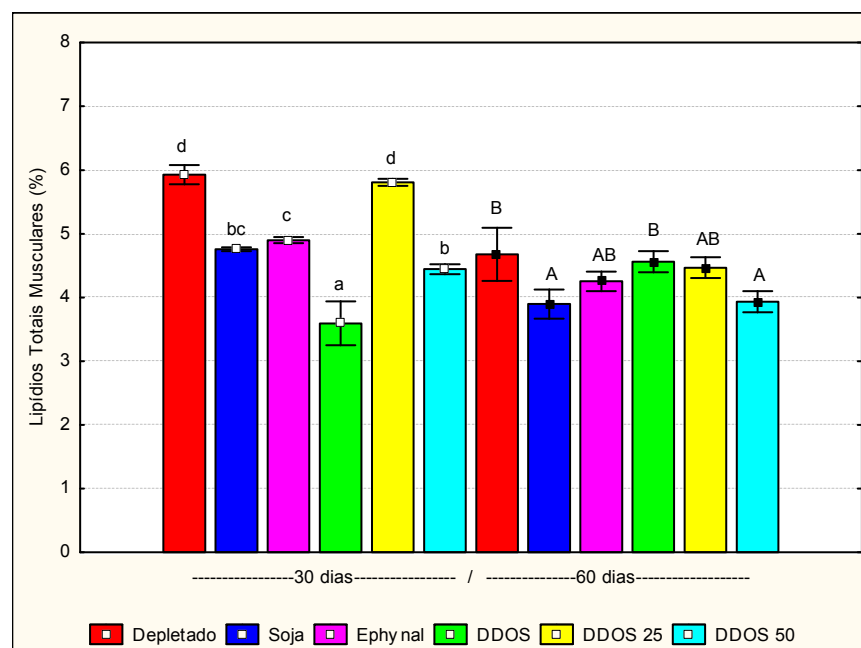


Figura 23. Teor de lipídios totais (%) no músculo dos ratos (n=42, 7 ratos/grupo)

Marcadores vazios indicam valores referentes a 30 dias e marcadores cheios referentes a 60 dias
 Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$ - teste de Tukey) aos 30 dias
 Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$ - teste de Tukey) aos 60 dias

5.2.4 Dano Hepático

As determinações de transaminases séricas, GPT e GOT; e de bilirrubinas foram feitas nos animais de referência, onde encontraram-se os valores de 105,31 U/L ($\pm 9,40$) para GOT; 26,37 U/L ($\pm 3,97$) para GPT e para bilirrubinas: 0,17 mg/dL ($\pm 0,08$), 0,09 mg/dL ($\pm 0,08$) e 0,08 mg/dL ($\pm 0,02$), sendo respectivamente total, direta e livre.

Na tabela 27, observa-se que para GOT e bilirrubinas (total, direta e livre), os suplementos não diferiram ($p>0,05$) em cada período. Apenas, a análise de GPT nos animais suplementados durante 30 dias é que diferiu significativamente ($p<0,05$), sendo que a suplementação com DDOS apresentou os valores menores em todos os níveis (DDOS, DDOS 25 e DDOS 50). Comparando-se os valores de transaminases obtidos aos 60 dias de experimento, que não diferiram entre os tratamentos, com os animais de referência do Instituto Galas com a mesma idade, percebe-se que se assemelham, cuja média de GPT foi 22 U/L e GOT 65 U/L, comparada à média geral deste experimento, respectivamente 28 U/L e 81 U/L. Aos 30 dias os tratamentos suplementados com Ephynal[®], DDOS, DDOS 25 e principalmente DDOS 50 apresentaram valores de GPT mais baixos, ou seja, a enzima GPT que indica dano hepático estava atuando em menor proporção nestes grupos do que no Soja e Depletado, evidenciando-se portanto, um efeito protetor da vitamina E.

Tabela 27. Determinação das enzimas transaminases e bilirrubinas no soro de ratos suplementados durante 30 e 60 dias (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	Transaminases (U/L)		Bilirrubinas (mg/dL)		
	GOT	GPT	Total	Direta	Livre
30 dias					
Depletado	72,39 ^a (± 7,97)	26,64 ^{bc} (± 4,44)	0,28 ^a (± 0,10)	0,09 ^a (± 0,05)	0,18 ^a (± 0,10)
Soja	77,87 ^a (± 11,80)	32,41 ^c (± 5,23)	0,18 ^a (± 0,09)	0,10 ^a (± 0,08)	0,08 ^a (± 0,06)
Ephynal®	75,70 ^a (± 5,97)	21,78 ^{ab} (± 5,98)	0,25 ^a (± 0,10)	0,09 ^a (± 0,06)	0,16 ^a (± 0,09)
DDOS	69,26 ^a (± 11,00)	18,98 ^{ab} (± 2,98)	0,25 ^a (± 0,09)	0,16 ^a (± 0,09)	0,10 ^a (± 0,07)
DDOS 25	74,12 ^a (± 5,90)	24,05 ^{ab} (± 3,94)	0,30 ^a (± 0,21)	0,11 ^a (± 0,05)	0,19 ^a (± 0,16)
DDOS 50	69,50 ^a (± 12,66)	17,98 ^a (± 2,70)	0,16 ^a (± 0,05)	0,05 ^a (± 0,05)	0,10 ^a (± 0,07)
60 dias					
Depletado	84,90 ^a (± 7,21)	30,16 ^a (± 7,48)	0,37 ^a (± 0,04)	0,11 ^a (± 0,06)	0,26 ^a (± 0,05)
Soja	75,27 ^a (± 7,00)	23,90 ^a (± 6,67)	0,25 ^a (± 0,05)	0,16 ^a (± 0,08)	0,08 ^a (± 0,06)
Ephynal®	82,56 ^a (± 9,15)	30,87 ^a (± 5,56)	0,31 ^a (± 0,12)	0,08 ^a (± 0,08)	0,23 ^a (± 0,06)
DDOS	80,22 ^a (± 12,19)	24,93 ^a (± 9,43)	0,33 ^a (± 0,05)	0,22 ^a (± 0,09)	0,12 ^a (± 0,04)
DDOS 25	79,29 ^a (± 8,23)	31,39 ^a (± 9,23)	0,37 ^a (± 0,20)	0,13 ^a (± 0,04)	0,24 ^a (± 0,16)
DDOS 50	85,26 ^a (± 8,78)	28,79 ^a (± 5,89)	0,20 ^a (± 0,04)	0,07 ^a (± 0,06)	0,13 ^a (± 0,09)

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período

5.2.5 Hemograma

As tabelas 28 e 29 apresentam os valores de hemograma dos animais aos 15 e 30 dias, bem como aos 45 e 60 dias, respectivamente. Sendo que os valores estão dentro do padrão para ratos Wistar do equipamento utilizado (ADVIA – 120), constantes no quadro 2. Entretanto, percebe-se que a contagem de leucócitos foi um pouco mais elevada. Aos 15 dias os valores diferiram entre os tratamentos, como os valores de hemoglobina corpuscular média (MCH), que indica a cor da hemácea e os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), que indica a forma da hemácea, mas estas elevações não representaram alterações fisiológicas, pois continuam dentro do padrão para ratos Wistar. Aos 30, 45 e 60 dias as diferenças estatísticas desaparecem completamente.

Ainda no quadro 2 constam os valores de referência para ratos Wistar do Instituto Galas (TACONIC FARMS, 2005), para as idades de 5 e 10 semanas, que foram as que mais se aproximaram da faixa etária dos animais deste experimento (T0, equivale a 4 semanas; 30 e 60 dias de experimento equivalem a 8 e 12 semanas de vida).

A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) indica as respostas celulares à: inflamações, agressões crônicas, bactérias e alergias. De acordo com PASS & FREETH (1993), os valores desejáveis são: neutrófilos 15 – 20%; linfócitos 69 – 86%; monócitos 1 – 6%; eosinófilos 1 – 4% e basófilos raramente aparecem. Conforme estes parâmetros os dados obtidos neste trabalho se enquadram dentro do padrão de normalidade para a espécie e ressalta-se que os valores de basófilos foram suprimidos das tabelas 35 e 36, pois foram iguais a zero.

Quadro 2. Padrões de referência normais para ratos Wistar de acordo com o equipamento utilizado para o hemograma e o Instituto Galas

Hemograma	Padrões para Ratos Wistar		
	ADVIA – 120*	Instituto Galas **	
		5 semanas	10 semanas
Contagem Global de Células			
Leucócitos ($\times 10^3$ células/ μL)	3,3 – 8,7	6,9	10,8
Hemáceas ($\times 10^6$ células/ μL)	5,5 – 9,3	7,15	8,16
Hemoglobina (g/dL)	10,6 – 15,6	14,8	15,4
Hematócrito (%)	32,7 – 44,8	45,6	49,8
Volume corpuscular médio (fL)	43,5 – 62,7	64	61
Hemoglobina corpuscular média (pg)	15,8 – 19,9	20,9	18,9
Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL)	31,4 – 36,0	32,5	30,9
Plaquetas ($\times 10^3$ células/ μL)	493 – 1124	11,84	1109
Diferencial de Leucócitos			
Neutrófilos (%)	3,3 – 26,6		
Linfócitos (%)	68,6 – 94,5		
Monócitos (%)	0 – 4,1		
Eosinófilos (%)	0 – 5,0		

* Equipamento do Laboratório de Rotinas Hematológicas do Hemocentro (UNICAMP)

** TACONIC FARMS (2005)

Tabela 28. Hemograma aos 15 e 30 dias (n=30, 5 ratos/grupo)

Tratamento	Contagem Global de Células							Diferencial de Leucócitos (%)			
	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos
Animais de Referência	4,8 (± 1,9)	8,9 (± 0,4)	11,3 (± 0,8)	39,7 (± 2,8)	68,0 (± 3,6)	19,4 (± 0,9)	28,6 (± 0,7)	19994,1 (± 2787,5)	10,4 (± 7,9)	87,4 (± 9,7)	1,9 (± 2,1)
15 dias											
Depletado	11,2 ^c (± 1,3)	7,1 ^a (± 0,2)	13,0 ^a (± 1,0)	45,7 ^a (± 3,4)	64,5 ^a (± 5,5)	18,3 ^{ab} (± 1,6)	28,4 ^{ab} (± 0,9)	1087,8 ^a (± 166,1)	8,7 ^a (± 3,7)	89,0 ^a (± 3,9)	2,2 ^a (± 1,2)
Soja	10,6 ^{bc} (± 2,0)	6,9 ^a (± 0,4)	13,2 ^a (± 0,7)	46,4 ^a (± 2,2)	67,4 ^a (± 2,4)	19,1 ^{ab} (± 0,6)	28,4 ^{ab} (± 0,2)	1009,3 ^a (± 157,2)	12,1 ^a (± 7,1)	85,1 ^a (± 6,2)	2,6 ^a (± 0,8)
Ephynal®	9,3 ^{abc} (± 1,5)	7,2 ^a (± 0,3)	12,6 ^a (± 0,9)	45,1 ^a (± 2,8)	62,8 ^a (± 3,6)	17,6 ^a (± 1,3)	28,0 ^a (± 0,7)	1053,3 ^a (± 316,9)	10,4 ^a (± 2,9)	87,7 ^a (± 3,0)	1,9 ^a (± 1,1)
DDOS	8,4 ^{ab} (± 1,4)	6,7 ^a (± 0,4)	12,8 ^a (± 0,4)	44,6 ^a (± 1,3)	66,9 ^a (± 3,6)	19,2 ^{ab} (± 1,0)	28,8 ^{ab} (± 0,5)	880,4 ^a (± 255,2)	9,6 ^a (± 2,6)	87,9 ^a (± 3,3)	2,4 ^a (± 1,4)
DDOS 25	8,78 ^{abc} (± 1,3)	6,5 ^a (± 0,8)	12,7 ^a (± 1,2)	43,5 ^a (± 4,9)	67,2 ^a (± 1,8)	19,7 ^b (± 0,8)	29,2 ^b (± 0,8)	920,6 ^a (± 146,4)	13,0 ^a (± 11,7)	83,9 ^a (± 10,9)	2,6 ^a (± 1,6)
DDOS 50	7,3 ^a (± 2,0)	6,9 ^a (± 0,6)	13,0 ^a (± 1,1)	46,0 ^a (± 3,8)	66,9 ^a (± 2,9)	19,0 ^{ab} (± 1,0)	28,4 ^{ab} (± 0,4)	993,1 ^a (± 96,9)	13,4 ^a (± 6,3)	85,9 ^a (± 6,8)	0,7 ^a (± 0,8)
30 dias											
Depletado	11,1 (± 3,2)	8,0 (± 0,5)	14,3 (± 0,6)	49,3 (± 1,7)	62,1 (± 3,7)	18,0 (± 1,5)	29,0 (± 1,1)	1140,1 (± 117,1)	10,1 (± 3,1)	88,6 (± 3,8)	1,0 (± 0,8)
Soja	7,7 (± 1,5)	8,0 (± 0,2)	14,6 (± 0,4)	50,4 (± 2,2)	63,4 (± 2,4)	18,5 (± 0,6)	29,1 (± 1,0)	1126,1 (± 95,4)	13,6 (± 3,2)	84,7 (± 3,2)	1,7 (± 1,1)
Ephynal®	10,1 (± 2,7)	7,9 (± 0,8)	13,9 (± 1,1)	47,5 (± 3,2)	60,8 (± 3,3)	17,5 (± 0,9)	29,3 (± 0,8)	1058,3 (± 251,6)	12,7 (± 3,4)	86,5 (± 3,0)	0,7 (± 0,5)
DDOS	10,0 (± 3,1)	7,6 (± 0,4)	14,2 (± 0,8)	47,6 (± 2,3)	62,3 (± 1,0)	18,5 (± 0,2)	29,7 (± 0,5)	1107,2 (± 97,7)	9,7 (± 2,9)	89,3 (± 3,9)	0,7 (± 0,5)
DDOS 25	9,8 (± 1,8)	7,8 (± 0,6)	14,7 (± 1,2)	49,8 (± 4,8)	63,5 (± 2,6)	18,8 (± 0,7)	29,6 (± 0,8)	1011,0 (± 77,4)	10,3 (± 2,9)	88,7 (± 3,5)	0,9 (± 0,9)
DDOS 50	10,0 (± 2,7)	8,0 (± 0,4)	14,8 (± 0,8)	50,3 (± 2,2)	63,3 (± 2,5)	18,6 (± 0,8)	29,5 (± 1,4)	1071,2 (± 149,5)	9,6 (± 1,5)	89,4 (± 2,0)	1,0 (± 1,2)

WBC – Leucócitos ($\times 10^3$ células/ μ L); RBC – Hemácias ($\times 10^6$ células/ μ L); HGB – Hemoglobina (g/dL); HCT – Hematócrito (%); MCV – Volume corpuscular médio (fL); MCH – Hemoglobina corpuscular média (pg); MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL); PLT – Plaquetas ($\times 10^3$ células/ μ L).

Tabela 29. Hemograma aos 45 e 60 dias (n=30, 5 ratos/grupo)

Tratamento	Contagem Global de Células							Diferencial de Leucócitos (%)			
	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos
45 dias											
Depletado	10,7 (±4,2)	8,0 (±0,5)	15,0 (±0,9)	48,5 (±2,8)	60,7 (±2,3)	18,8 (±0,5)	31,0 (±0,4)	826,7 (±199,3)	12,3 (±3,7)	85,5 (±3,6)	1,7 (±1,4)
Soja	13,6 (±1,9)	7,9 (±0,4)	14,6 (±0,9)	47,1 (±2,7)	59,9 (±0,8)	18,5 (±0,5)	31,0 (±0,7)	882,5 (±137,9)	11,3 (±3,4)	86,5 (±3,5)	1,8 (±1,0)
Ephynal®	12,4 (±3,1)	8,2 (±0,4)	14,9 (±0,7)	47,9 (±3,1)	58,7 (±1,5)	18,1 (±0,3)	31,2 (±0,9)	931,4 (±88,8)	10,3 (±2,1)	86,7 (±2,9)	2,6 (±1,3)
DDOS	12,0 (±1,4)	8,0 (±0,5)	15,0 (±0,7)	47,6 (±2,5)	59,5 (±1,9)	18,7 (±0,8)	31,4 (±0,6)	906,9 (±87,9)	9,9 (±4,1)	88,4 (±3,9)	1,6 (±1,8)
DDOS 25	10,8 (±1,0)	8,2 (±0,4)	15,1 (±0,4)	49,4 (±3,5)	60,2 (±4,3)	18,4 (±0,6)	30,6 (±1,4)	900,0 (±138,6)	9,4 (±3,7)	88,3 (±4,1)	1,9 (±1,4)
DDOS 50	12,2 (±1,7)	7,9 (±0,2)	14,7 (±0,6)	47,0 (±2,0)	59,8 (±1,4)	18,8 (±0,4)	31,4 (±0,6)	988,6 (±152,4)	12,1 (±9,7)	85,3 (±11,2)	1,4 (±0,8)
60 dias											
Depletado	11,5 (±3,3)	8,1 (±0,2)	15,0 (±0,3)	48,2 (±1,3)	59,4 (±2,7)	18,5 (±0,5)	31,2 (±0,4)	914,6 (±102,3)	11,4 (±5,0)	86,7 (±4,9)	1,3 (±1,1)
Soja	11,3 (±1,5)	8,2 (±0,4)	15,0 (±0,5)	49,0 (±3,1)	59,7 (±2,4)	18,3 (±0,5)	30,7 (±1,1)	950,7 (±79,4)	11,3 (±5,0)	86,0 (±4,0)	1,4 (±1,0)
Ephynal®	12,7 (±4,1)	8,3 (±0,3)	15,0 (±0,5)	48,1 (±2,5)	58,3 (±2,4)	18,1 (±0,4)	31,1 (±1,1)	864,1 (±118,0)	9,9 (±5,0)	88,0 (±4,8)	1,4 (±1,4)
DDOS	11,6 (±2,7)	8,2 (±0,3)	14,8 (±0,6)	49,2 (±3,6)	59,9 (±5,1)	18,0 (±1,0)	30,2 (±1,2)	886,6 (±94,0)	10,9 (±1,8)	86,9 (±2,4)	2,0 (±1,9)
DDOS 25	12,5 (±2,7)	8,5 (±0,2)	15,4 (±0,4)	51,1 (±3,3)	59,9 (±3,7)	18,1 (±0,5)	30,3 (±1,7)	865,4 (±73,0)	11,0 (±3,6)	87,9 (±4,0)	1,1 (±0,7)
DDOS 50	9,6 (±2,7)	8,1 (±0,4)	14,7 (±0,9)	48,4 (±4,5)	59,8 (±3,6)	18,2 (±0,6)	30,5 (±1,3)	902,3 (±127,5)	11,3 (±7,1)	86,7 (±8,3)	1,7 (±1,4)
WBC – Leucócitos ($\times 10^3$ células/ μ L); RBC – Hemácias ($\times 10^6$ células/ μ L); HGB – Hemoglobina (g/dL); HCT – Hematócrito (%); MCV – Volume corpuscular médio (fL); MCH – Hemoglobina corpuscular média (pg); MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL); PLT – Plaquetas ($\times 10^3$ células/ μ L);											

5.2.6 Genotoxicidade na Medula Óssea

As figuras 24 e 25 apresentam 2 fotos das lâminas de medula óssea dos ratos nos diferentes tratamentos, sendo respectivamente NCEMN e PCEMN.



Figura 24. Fotomicrografia de eritrócitos de rato Wistar, detalhe NCEMN (Giemsa, 10x100)

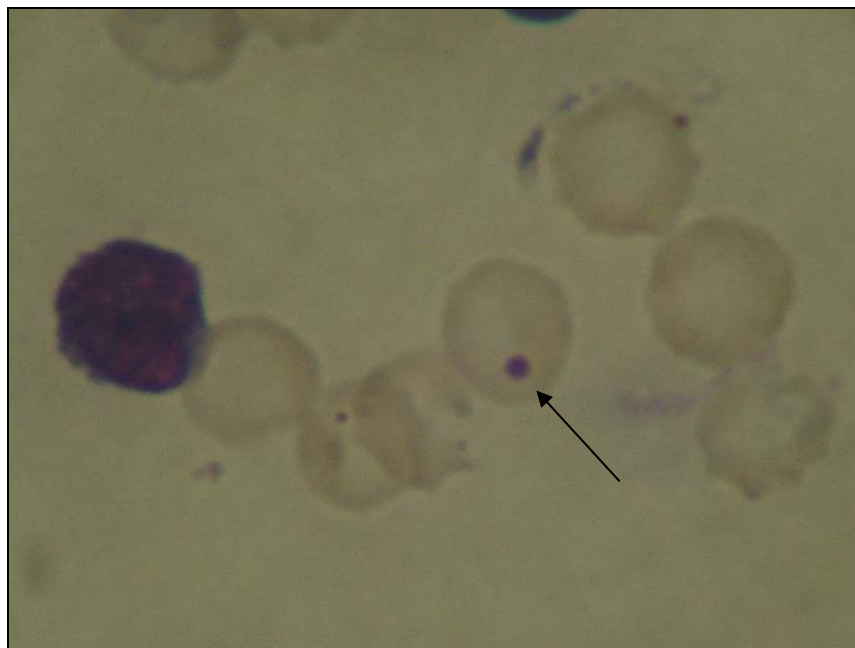


Figura 25. Fotomicrografia de eritrócitos de rato Wistar, em detalhe PCEMN (Giemsa, 10x100)

A tabela 30 apresenta a frequência de células micronucleadas na medula óssea. Para os animais de referência os resultados foram: 1,20 ($\pm 1,10$) para PCEMN e 0,40 ($\pm 0,55$) para NCEMN. Nestes animais, os eventuais eritrócitos micronucleados, procedentes de eritroblastos que sofreram danos cromossômicos durante a divisão celular, tem uma origem que pode ser atribuída a diversos fatores, como: condições ambientais do criadouro, estado de saúde do animal, estresse e a própria taxa espontânea de PCE (KRISHNA & HAYASHI, 2000). De acordo com RABELLO-GAY *et al.* (1991), a frequência de até 3 PCEMN para cada 1000 PCE é considerado dentro da taxa espontânea de mutação dos roedores. Ressalta-se que as mutações denominadas espontâneas, são mutações naturais que todos os seres vivos sofrem certo número de vezes. A taxa de ocorrência das mesmas é característica de um determinado organismo e constitui o chamado nível basal - *background* (KRISHNA & HAYASHI, 2000).

Uma substância testada é considerada mutagênica quando produz aumento significativo (nível de 5%) da frequência de PCEMN em relação ao controle (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Neste caso, os tratamentos com as diferentes doses de DDOS, principalmente DDOS 50, apresentaram valores alterados aos 30 dias. Conforme a frequência de células, PCEMN funciona como um indicador de dano de forma mais aguda que a frequência de NCEMN, já que estes devem ser apresentados quando os animais são tratados continuamente por 4 semanas ou mais (KRISHNA & HAYASHI, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2004; OECD, 2005). Sendo assim, o dano apresentado pelos animais submetidos ao tratamento DDOS 50, não foi refletido de forma mais crônica, ou seja, nas células NCEMN. Percebe-se ainda que este dano não ocorreu aos 60 dias, supondo-se que os animais passaram por uma adaptação ao suplemento.

Tabela 30. Frequência de eritrócitos jovens micronucleados (PCEMN) e maduros micronucleados (NCEMN) na medula óssea de ratos Wistar (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	Eritrócitos Micronucleados	
	PCEMN	NCEMN
30 dias		
Depletado	0,40 ^a (± 0,89)	1,80 ^a (± 2,49)
Soja	1,00 ^a (± 1,00)	2,80 ^a (± 1,92)
Ephynal [®]	1,20 ^a (± 0,45)	3,80 ^a (± 2,05)
DDOS	2,20 ^{ab} (± 1,48)	3,60 ^a (± 0,89)
DDOS 25	2,40 ^{ab} (± 1,52)	4,20 ^a (± 1,10)
DDOS 50	4,40 ^b (± 1,67)	5,40 ^a (± 2,19)
60 dias		
Depletado	1,20 ^a (± 1,30)	3,60 ^a (± 2,41)
Soja	2,00 ^a (± 1,00)	1,60 ^a (± 1,82)
Ephynal [®]	2,60 ^a (± 0,55)	4,20 ^a (± 2,49)
DDOS	1,60 ^a (± 1,52)	1,40 ^a (± 1,34)
DDOS 25	1,60 ^a (± 1,82)	1,60 ^a (± 1,52)
DDOS 50	0,40 ^a (± 0,55)	2,40 ^a (± 1,52)

PCEMN - total de células policromáticas micronucleadas entre 1000 células policromáticas da medula óssea; NCEMN - total de células normocromáticas micronucleadas entre 1000 células normocromáticas da medula óssea

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período

Tendo-se em vista a taxa espontânea de mutação, apenas o tratamento DDOS 50 aos 30 dias apresentou valores aumentados. Baseado nos estudos de KRISHNA & HAYASHI (2000), a frequência de PCEMN para ratos Wistar machos de referência está entre 1,1 – 6,4 PCEMN/1000 PCE. Sendo assim, os resultados deste trabalho demonstram que a suplementação com DDOS não apresenta dano ao DNA, no que se refere à formação de micronúcleos. Nota-se portanto, a importância de utilizar-se a estatística como auxiliar na avaliação e interpretação dos resultados, considerando-se em primeiro lugar a relevância biológica dos resultados (RIBEIRO *et al.*, 2004).

5.2.7 Estado de Oxidação

Os dados de literatura são escassos e pouco conclusivos, pois além de não haver valores de referência para os animais, a bibliografia comenta a utilização de isoprostanas em casos de produtos específicos e também em doenças crônicas como diabetes, aterosclerose ou alzheimer. Os valores encontrados para ratos Wistar variam desde menos de 20 pg/mL (NANJI *et al.*, 1994) até 2053 pg/mL (SCHRIJVERS *et al.*, 2004).

As figuras 26 e 27 mostram as dosagens de isoprostanas (8-iso-PGF_{2α}) no soro dos ratos aos 30 e 60 dias, respectivamente. A quantificação no soro dos animais de referência foi de 65,7 pg/mL ($\pm$ 13,2). Observa-se que aos 30 dias o grupo Depletado apresentou-se levemente aumentado, mas aos 60 dias os tratamentos não tiveram diferença estatística. Devido a inexistência de dados bibliográficos de referência, apenas comparou-se os tratamentos entre si.

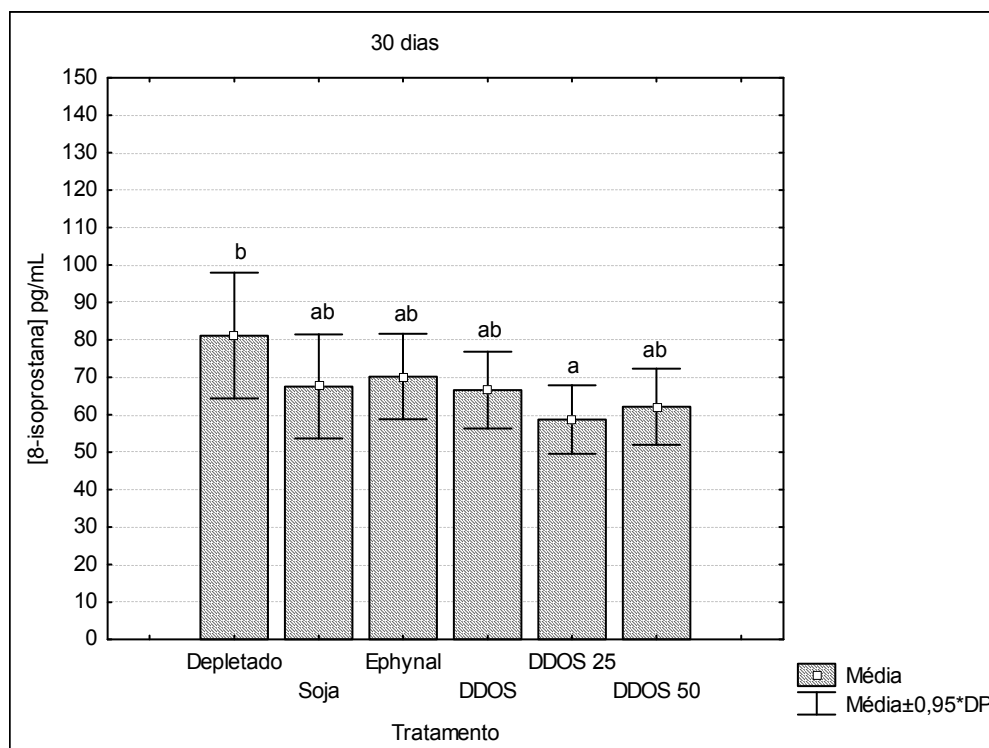


Figura 26. Isoprostanas séricas de ratos com suplementação por 30 dias (n=30, 5 ratos/grupo)

Letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Portanto, a exceção do DDOS 25, os demais tratamentos não apresentaram variações ao Depletado aos 30 dias. Já aos 60 dias não houve diferença entre os tratamentos. Comparando-se as médias aos 30 dias (67,7 pg/mL) e 60 dias (84,1 pg/mL) também não houve diferença, assim, percebe-se que a isoprostana não apresentou-se como um índice sensível para avaliar a oxidação lipídica neste caso.

A correlação obtida entre a ingestão de α -TE e o teor de isoprostanas séricas foi negativa ($r = -0,5$), mas não significativa, indicando apenas uma tendência à diminuição na concentração deste indicador de autooxidação lipídica no soro dos ratos com o aumento na ingestão de tocoferóis.

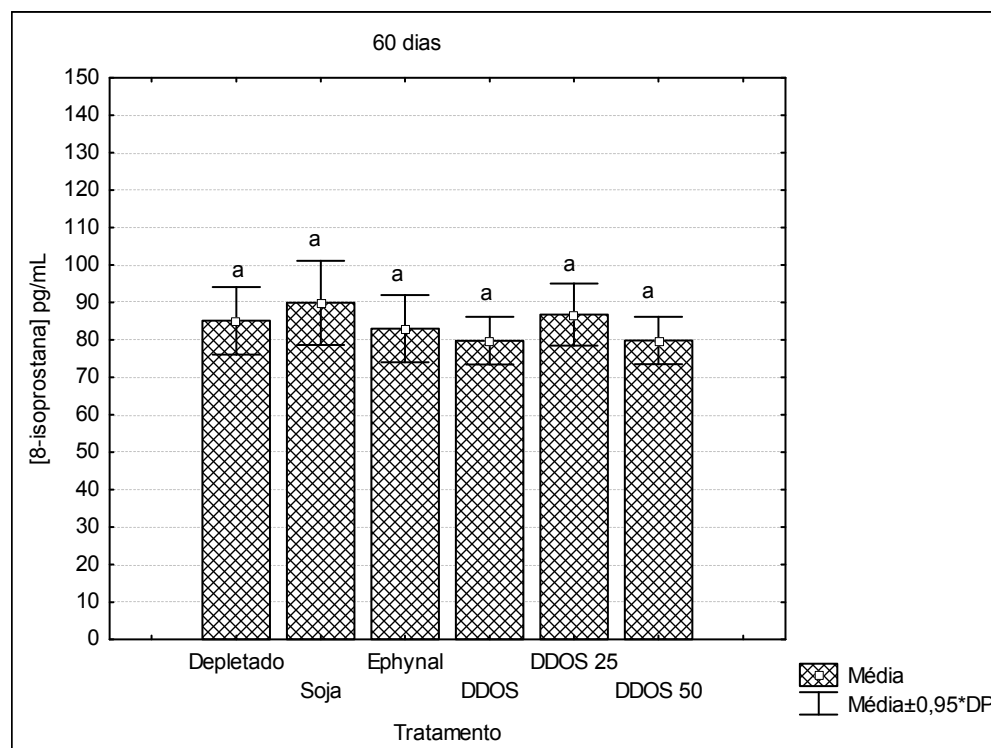


Figura 27. Isoprostanas séricas de ratos com suplementação por 60 dias (n=30, 5 ratos/grupo)

Em relação ao MDA como indicador de autoxidação lipídica, os teores deste produto nos diferentes tecidos dos animais de referência foram: 2,90 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,74$) no tecido hepático; 1,90 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,51$) no tecido adiposo abdominal e 2,83 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 1,79$) no tecido muscular.

O teor de MDA no fígado e no músculo de ratos Wistar suplementados com vitamina E na dieta durante 21 semanas, foi menor do que os animais controle, indicando que a dieta suplementada com 0,285% de acetato de α -T promoveu menor prejuízo lipídico. Em tecidos em que isto não ocorre, sugere maior susceptibilidade aos danos oxidativos, ou dose insuficiente para propiciar o efeito protetor (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Tabela 31. Determinação de malonaldeído nos tecidos hepático, adiposo e muscular dos ratos suplementados por 30 e 60 dias (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	MDA ($\mu\text{g/g}$ amostra)		
	Tecido Hepático	Tecido Adiposo	Tecido Muscular
30 dias			
Depletado	2,77 ^{cd} ($\pm 0,29$)	1,93 ^a ($\pm 0,56$)	2,08 ^a ($\pm 0,69$)
Soja	1,93 ^{ab} ($\pm 0,13$)	2,17 ^a ($\pm 0,38$)	2,13 ^a ($\pm 0,93$)
Ephynal®	1,54 ^a ($\pm 0,23$)	2,20 ^a ($\pm 0,13$)	0,97 ^a ($\pm 0,11$)
DDOS	3,01 ^d ($\pm 0,24$)	1,48 ^a ($\pm 0,08$)	0,61 ^a ($\pm 0,07$)
DDOS 25	2,53 ^{bcd} ($\pm 0,18$)	1,45 ^a ($\pm 0,33$)	1,91 ^a ($\pm 0,13$)
DDOS 50	2,05 ^{abc} ($\pm 0,06$)	1,98 ^a ($\pm 0,12$)	2,11 ^a ($\pm 0,98$)
60 dias			
Depletado	4,01 ^a ($\pm 1,20$)	3,86 ^b ($\pm 0,46$)	0,60 ^a ($\pm 0,34$)
Soja	2,99 ^a ($\pm 0,10$)	2,80 ^{ab} ($\pm 0,52$)	0,46 ^a ($\pm 0,04$)
Ephynal®	2,44 ^a ($\pm 0,12$)	2,49 ^a ($\pm 0,28$)	0,37 ^a ($\pm 0,07$)
DDOS	2,88 ^a ($\pm 0,63$)	2,01 ^a ($\pm 0,09$)	0,49 ^a ($\pm 0,03$)
DDOS 25	4,17 ^a ($\pm 0,86$)	3,02 ^{ab} ($\pm 0,28$)	0,45 ^a ($\pm 0,02$)
DDOS 50	2,03 ^a ($\pm 0,13$)	1,74 ^a ($\pm 0,04$)	0,67 ^a ($\pm 0,14$)

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período

Na tabela 31 percebe-se que o teor de MDA no tecido muscular aos 30 dias, não apresentou variação entre os grupos (1,6 μg MDA/g amostra) e aos 60 dias verificou-se uma redução neste teor (0,5 μg MDA/g amostra), também sem diferença estatística entre os tratamentos. Para o tecido adiposo, aos 30 dias não

houve variação entre os grupos (1,9 µg MDA/g amostra) e aos 60 dias houve aumento no teor de MDA, sendo que os valores foram diferentes apenas matematicamente, sendo que com exceção do grupo Depletado, os demais não se diferenciaram, fornecendo uma média aparente de 2,7 µg MDA/g amostra. No tecido hepático, aos 30 dias houve uma diferença entre os grupos, com média aparente de 2,3 µg MDA/g amostra, posteriormente, aos 60 dias, houve um aumento no teor de MDA, sem diferença estatística entre os tratamentos (3,1 µg MDA/g amostra). Verificou-se também que não existiram correlações significativas entre a quantidade deste indicador nos tecidos e a quantidade de α -TE ingerida pelos animais durante a suplementação.

De acordo com LAGE *et al.* (2003), os músculos de bovinos Nelore suplementados com acetato de α -T, apresentaram menor teor de MDA em relação aos animais de controle (não suplementados), demonstrando mais estabilidade lipídica dos primeiros, principalmente após o período de exposição da carne em condições de varejo. Entretanto, em relação ao tipo de músculo, o que apresentou maior teor de vitamina E (*Supraspinatus*) foi o que obteve menor estabilidade. Em outro trabalho com bovinos, a suplementação de 5000mg DL- α -T/cabeça/dia, durante 1 semana pré-abate, retardou a oxidação lipídica de 0,26 à 2,62 mg MDA/kg no grupo controle e de 0,17 à 1,01 mg MDA/kg no grupo suplementado, sendo do 1º ao 4º dia, respectivamente. A suplementação por 10 dias aumenta a estabilidade e conseqüentemente a vida de prateleira da carne, tanto prevenindo a oxidação dos lipídios de membrana, quanto indiretamente prevenindo a oxidação dos pigmentos. Sugere-se que estas diferenças se devem a estabilidade das mitocôndrias e retículo sarcoplasmático que podem ser afetados pela suplementação de vitamina E na dieta (MITSUMOTO *et al.*, 1998). Em relação à suplementação intra-ruminal com DDOS, feita por BORHER *et al.* (2002), 48h antes do abate aumenta significativamente a estabilidade da gordura de cobertura do músculo *Gluteus biceps* de bovinos, inclusive quando a carne foi mantida sob refrigeração durante 2 semanas.

De forma geral, neste Trabalho, os resultados obtidos, especialmente no tecido hepático, estão sugerindo a possibilidade de que a variação entre os grupos

aos 30 dias seja de caráter individual de adaptação aos lipídios da suplementação introduzida. Posteriormente, aos 60 dias esta variação individual desaparece, pois já houve uma estabilização do estado de oxidação nos tecidos dos ratos nos diferentes grupos.

A mesma explicação vale para o tecido adiposo, sendo que se pode ainda especular, que os ratos mais jovens praticamente não apresentaram tecido adiposo abdominal, estando de forma não patogênica no fígado. Pois, à medida que ocorre o crescimento, os lipídios vão deixando de se acumular no fígado e vão se acumulando no tecido adiposo abdominal, assim como nos seres humanos.

Assim, o teor de MDA no fígado e tecido adiposo aumenta aos 60 dias, em relação aos 30 dias, pois há uma estabilização na síntese, ou seja, os valores aos 30 dias não expressam a realidade, pois estão com metabolismo mais acelerado.

5.2.8 Distribuição dos Tocoferóis

A análise do teor de tocoferóis nos animais em T0 é extremamente importante para obtenção de um referencial antes da suplementação. A tabela 32 apresenta estes valores nos tecidos estudados: soro, fígado, gordura e músculo.

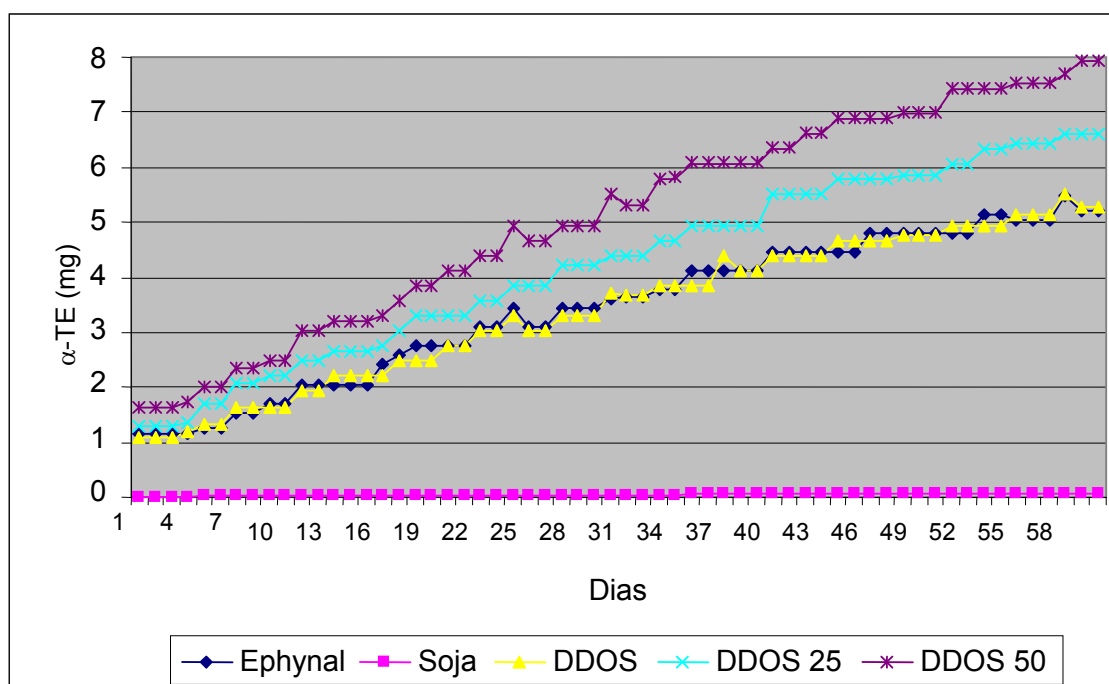
As médias dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais na dieta AIN-93G depletada em vitamina E foram determinadas e seguem: α -T 9,07 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 1,28$); β -T 0,70 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,42$); γ -T 26,96 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 3,18$); δ -T 8,17 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,96$), perfazendo um total de 44,89 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 5,78$). Convertendo para α -TE o total é de 12,84 $\mu\text{g/g}$ de dieta, ou seja, 0,01 mg/g de dieta, portanto um valor muito baixo comparado à suplementação.

Na figura 28 constam as quantidades de α -TE fornecidas nas intubações ao longo do período experimental, sendo valores referentes ao teor diário de cada intubação, ressaltando-se que o grupo Depletado não recebeu suplementação alguma.

Tabela 32. Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais nos diferentes tecidos dos animais de referência (n=7)

Animais de Referência	α -T	β -T	γ -T	δ -T	Tocoferóis Totais
Soro ($\mu\text{g/mL}$)	5,19 ($\pm 0,67$)	0,37 ($\pm 0,15$)	1,09 ($\pm 0,54$)	nd	6,65 ($\pm 1,06$)
Tecido Hepático ($\mu\text{g/g}$)	5,62 ($\pm 1,16$)	0,15 ($\pm 0,16$)	0,72 ($\pm 0,13$)	0,01 ($\pm 0,02$)	6,50 ($\pm 1,35$)
Tecido Adiposo ($\mu\text{g/g}$)	70,87 ($\pm 23,41$)	0,49 ($\pm 0,52$)	2,78 ($\pm 2,23$)	0,62 ($\pm 0,44$)	74,78 ($\pm 25,12$)
Tecido Muscular ($\mu\text{g/g}$)	18,07 ($\pm 1,41$)	0,34 ($\pm 0,18$)	0,86 ($\pm 0,30$)	0,05 ($\pm 0,00$)	19,32 ($\pm 1,89$)

nd = não detectado

Figura 28. Quantidade de α -TE fornecida por intubação orogástrica

Em relação aos teores de tocoferóis nos tecidos, as tabelas 33 a 36 apresentam as determinações de cada isômero e o somatório dos tocoferóis totais para cada tecido, de acordo com o período de suplementação, sendo respectivamente os tecidos: sérico, hepático, adiposo e muscular.

Tabela 33. Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais séricos (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	α -T ($\mu\text{g/mL}$)	β -T ($\mu\text{g/mL}$)	γ -T ($\mu\text{g/mL}$)	δ -T ($\mu\text{g/mL}$)	Tocoferóis Totais ($\mu\text{g/mL}$)
30 dias					
Depletado	1,94 ^a ($\pm$ 0,42)	0,35 ^a ($\pm$ 0,30)	0,43 ^a ($\pm$ 0,25)	nd ^a	2,72 ^a ($\pm$ 0,85)
Soja	4,23 ^{ab} ($\pm$ 0,99)	0,84 ^a ($\pm$ 0,27)	1,06 ^{ab} ($\pm$ 0,38)	nd ^a	6,13 ^{ab} ($\pm$ 1,45)
Ephynal [®]	12,77 ^d ($\pm$ 2,82)	0,45 ^a ($\pm$ 0,43)	0,45 ^a ($\pm$ 0,26)	nd ^a	13,68 ^c ($\pm$ 3,36)
DDOS	6,82 ^{bc} ($\pm$ 1,49)	0,61 ^a ($\pm$ 0,40)	1,15 ^b ($\pm$ 0,37)	0,04 ^a ($\pm$ 0,06)	8,63 ^b ($\pm$ 1,85)
DDOS 25	7,82 ^c ($\pm$ 1,68)	0,40 ^a ($\pm$ 0,28)	0,75 ^{ab} ($\pm$ 0,62)	0,15 ^a ($\pm$ 0,14)	9,12 ^b ($\pm$ 2,12)
DDOS 50	7,17 ^{bc} ($\pm$ 1,62)	0,81 ^a ($\pm$ 0,63)	1,10 ^{ab} ($\pm$ 0,38)	0,69 ^a ($\pm$ 1,55)	9,76 ^b ($\pm$ 2,18)
60 dias					
Depletado	1,34 ^a ($\pm$ 0,43)	0,23 ^a ($\pm$ 0,29)	0,26 ^a ($\pm$ 0,27)	nd ^a	1,83 ^a ($\pm$ 0,95)
Soja	3,22 ^a ($\pm$ 0,82)	0,31 ^a ($\pm$ 0,20)	0,43 ^a ($\pm$ 0,26)	0,01 ^a ($\pm$ 0,01)	3,97 ^a ($\pm$ 1,17)
Ephynal [®]	13,90 ^c ($\pm$ 2,97)	0,40 ^a ($\pm$ 0,20)	0,30 ^a ($\pm$ 0,13)	0,01 ^a ($\pm$ 0,01)	14,60 ^c ($\pm$ 3,07)
DDOS	6,90 ^b ($\pm$ 1,53)	0,39 ^a ($\pm$ 0,12)	0,77 ^a ($\pm$ 0,25)	0,16 ^a ($\pm$ 0,09)	8,22 ^b ($\pm$ 1,81)
DDOS 25	6,27 ^b ($\pm$ 1,47)	0,41 ^a ($\pm$ 0,26)	0,74 ^a ($\pm$ 0,65)	0,11 ^a ($\pm$ 0,17)	7,53 ^b ($\pm$ 2,09)
DDOS 50	7,03 ^b ($\pm$ 1,29)	0,27 ^a ($\pm$ 0,20)	0,66 ^a ($\pm$ 0,41)	0,14 ^a ($\pm$ 0,11)	8,10 ^b ($\pm$ 1,84)

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, de acordo com cada período
nd = não detectado

O teor de α -T sérico (tabela 33) no grupo Ephynal[®] foi estatisticamente superior aos demais tratamentos, tanto com 30 dias de suplementação, quanto aos 60 dias. De acordo com LICHTENSTEIN & RUSSEL (2005), a suplementação com elevadas doses de α -T, diminui a concentração plasmática dos demais isômeros devido a seletividade destes na absorção.

Na figura 29 observa-se que o teor de α -TE sérico dos grupos Depletado e Soja diminuiu ao longo do período experimental, indicando que os animais utilizaram sua vitamina E intrínseca para o metabolismo. O grupo Ephynal[®] se destacou com teores mais elevados e os grupos com DDOS obtiveram um desempenho intermediário.

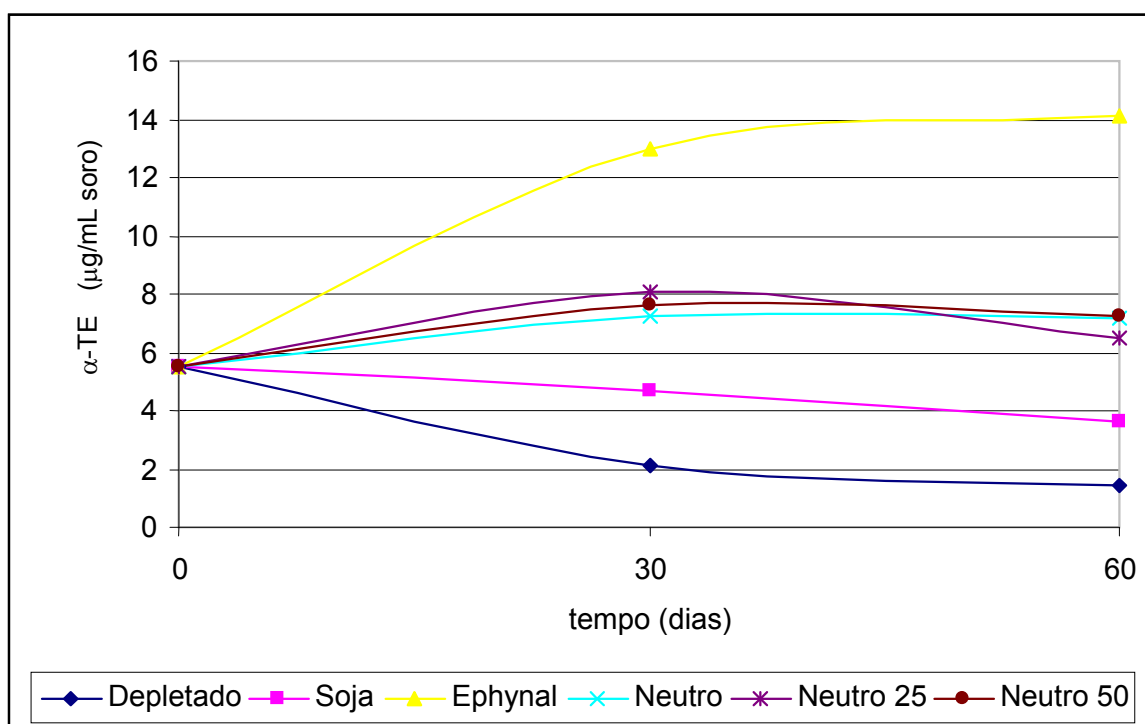


Figura 29. Teor de α -TE sérico ($\mu\text{g/mL}$) ao longo do período experimental

Existiu uma forte correlação entre a concentração de vitamina E no soro e o teor de vitamina E ingerido pelos animais com 30 dias ($r=0,80$, figura 30) e aos 60 dias ($r=0,81$, figura 31), o que é corroborado por OLIVEIRA *et al.* (2003).

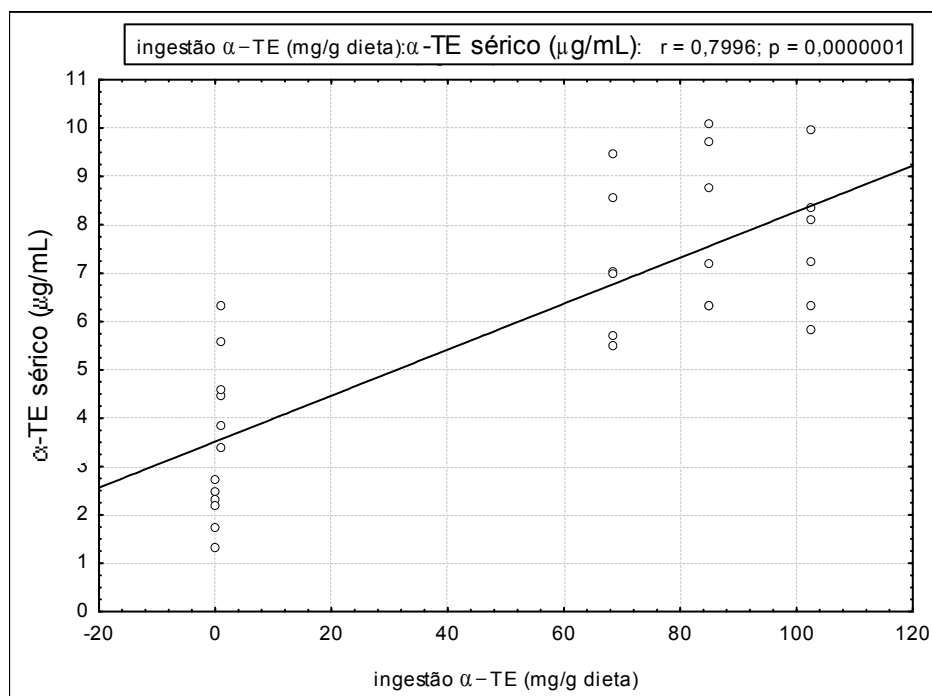


Figura 30. Correlação entre o teor de α -TE sérico (μ g/mL) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias

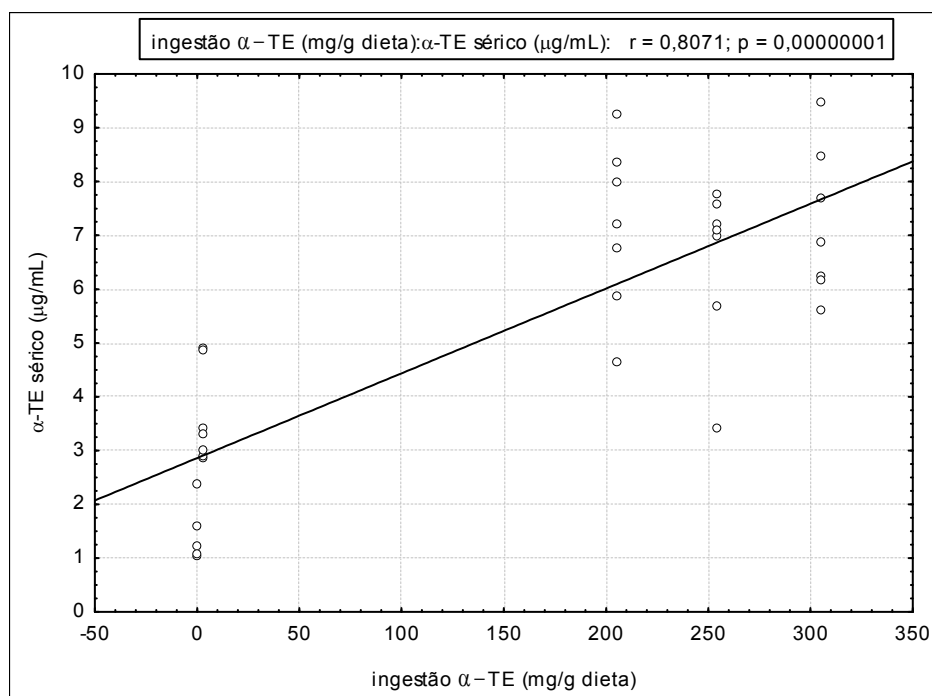


Figura 31. Correlação entre o teor de α -TE sérico (μ g/mL) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias

Tabela 34. Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais hepáticos (n=84, 7 ratos/grupo)

Tratamentos	α -T (μ g/g)	β -T (μ g/g)	γ -T (μ g/g)	δ -T (μ g/g)	Tocoferóis Totais (μ g/g)
30 dias					
Depletado	2,11 ^a ($\pm$ 0,51)	0,10 ^a ($\pm$ 0,14)	0,65 ^a ($\pm$ 0,15)	0,02 ^a ($\pm$ 0,03)	2,87 ^a ($\pm$ 0,63)
Soja	4,89 ^{ab} ($\pm$ 0,50)	0,20 ^{ab} ($\pm$ 0,19)	0,76 ^a ($\pm$ 0,31)	0,01 ^a ($\pm$ 0,01)	5,87 ^a ($\pm$ 0,56)
Ephynal®	18,00 ^d ($\pm$ 3,50)	0,07 ^{ab} ($\pm$ 0,08)	0,16 ^a ($\pm$ 0,11)	nd ^a	18,23 ^c ($\pm$ 3,55)
DDOS	10,64 ^c ($\pm$ 1,55)	0,24 ^{ab} ($\pm$ 0,23)	1,36 ^a ($\pm$ 0,83)	0,54 ^a ($\pm$ 0,45)	12,77 ^b ($\pm$ 1,44)
DDOS 25	8,84 ^{bc} ($\pm$ 1,86)	0,30 ^{ab} ($\pm$ 0,16)	1,68 ^a ($\pm$ 0,99)	0,55 ^a ($\pm$ 0,39)	11,36 ^b ($\pm$ 2,22)
DDOS 50	10,92 ^c ($\pm$ 2,59)	0,50 ^b ($\pm$ 0,31)	1,44 ^a ($\pm$ 1,15)	0,48 ^a ($\pm$ 0,40)	13,34 ^b ($\pm$ 3,20)
60 dias					
Depletado	0,93 ^a ($\pm$ 0,09)	0,07 ^a ($\pm$ 0,06)	0,26 ^a ($\pm$ 0,10)	nd ^a	1,26 ^a ($\pm$ 0,18)
Soja	1,65 ^a ($\pm$ 0,40)	0,06 ^a ($\pm$ 0,03)	0,30 ^a ($\pm$ 0,10)	0,02 ^a ($\pm$ 0,04)	2,04 ^a ($\pm$ 0,48)
Ephynal®	25,07 ^c ($\pm$ 4,56)	0,05 ^a ($\pm$ 0,07)	0,29 ^a ($\pm$ 0,23)	0,46 ^a ($\pm$ 0,92)	25,88 ^c ($\pm$ 4,61)
DDOS	12,18 ^b ($\pm$ 4,99)	0,40 ^{ab} ($\pm$ 0,32)	2,39 ^{bc} ($\pm$ 1,47)	0,55 ^{ab} ($\pm$ 0,37)	15,52 ^b ($\pm$ 5,86)
DDOS 25	11,63 ^b ($\pm$ 3,69)	0,34 ^{ab} ($\pm$ 0,26)	1,50 ^{ab} ($\pm$ 0,76)	0,35 ^a ($\pm$ 0,13)	13,82 ^b ($\pm$ 4,77)
DDOS 50	13,52 ^b ($\pm$ 3,46)	0,71 ^b ($\pm$ 0,17)	4,00 ^c ($\pm$ 0,58)	1,76 ^b ($\pm$ 0,97)	19,99 ^{bc} ($\pm$ 2,71)

* letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa no mesmo período ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.
nd = não detectado

O teor de tocoferóis hepáticos dos animais suplementados com DDOS teve desempenho intermediário com 30 e 60 dias de suplementação, assim como o perfil dos tocoferóis séricos. Na figura 32 evidencia-se este mesmo comportamento, mas em relação ao teor de α -TE, inclusive com diferença estatística, formando 3 blocos: Depletado e Soja (menor teor de α -TE); grupos com DDOS (valores intermediários) e Ephynal[®] (maior teor de α -TE).

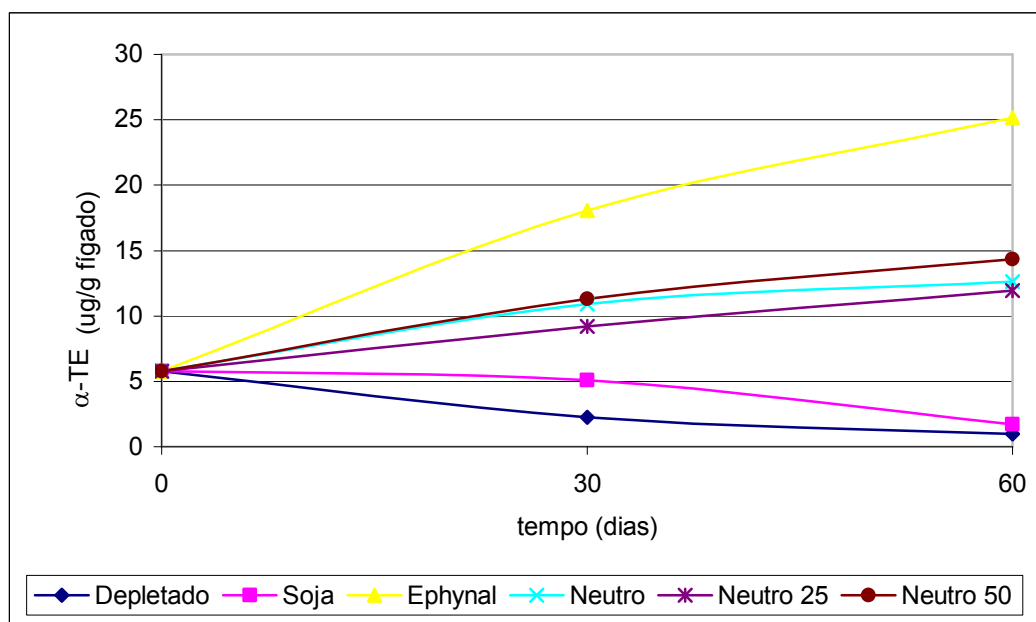


Figura 32. Teor de α -TE hepático ($\mu\text{g/g}$) ao longo do período experimental

Assim como em OLIVEIRA *et al.* (2003), também existe uma correlação forte para o teor de α -TE aos 30 dias (figura 33) e aos 60 dias (figura 34). Entretanto, de acordo com os mesmos autores, e corroborado por MITSUMOTO *et al.* (1998), o teor de vitamina E no fígado é mais elevado do que no músculo e plasma, em virtude do desempenho do fígado no armazenamento dos tocoferóis, mas isto não se refletiu neste trabalho, onde os teores de vitamina E no músculo foram mais elevados do que no fígado e soro. Para BORHER (2002) os valores mais elevados na suplementação de bovinos com DDOS, em dose única pré-abate, foram para os tecidos adiposo ($12,96 \mu\text{g/g}$) e fígado ($11,74 \mu\text{g/g}$), sendo que plasma e músculo obtiveram valores respectivamente de $4,18 \mu\text{g/g}$ e $4,24 \mu\text{g/g}$.

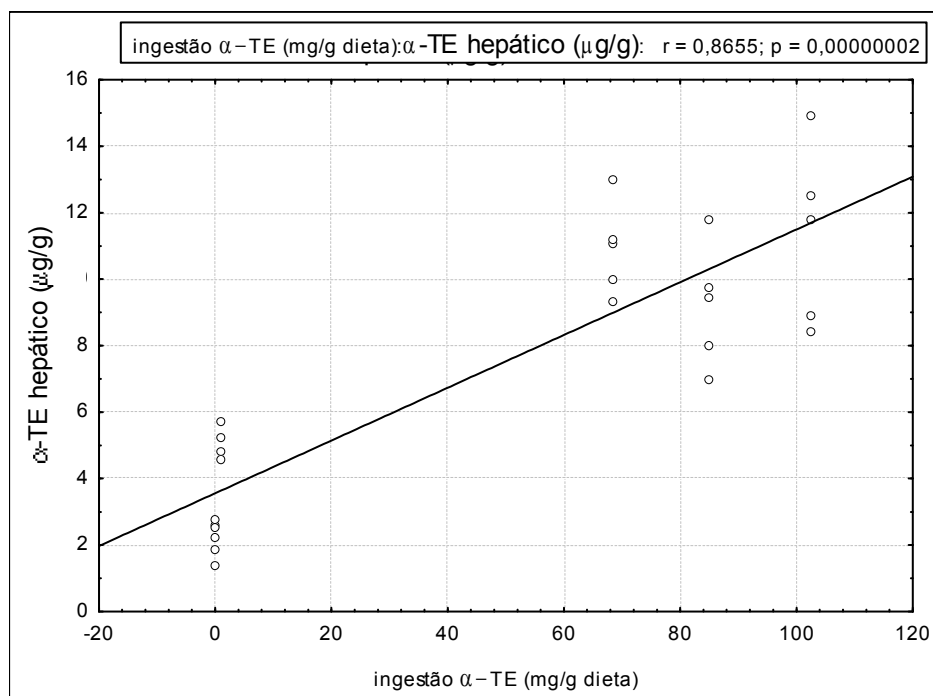


Figura 33. Correlação entre o teor de α -TE hepático (μ g/g) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias

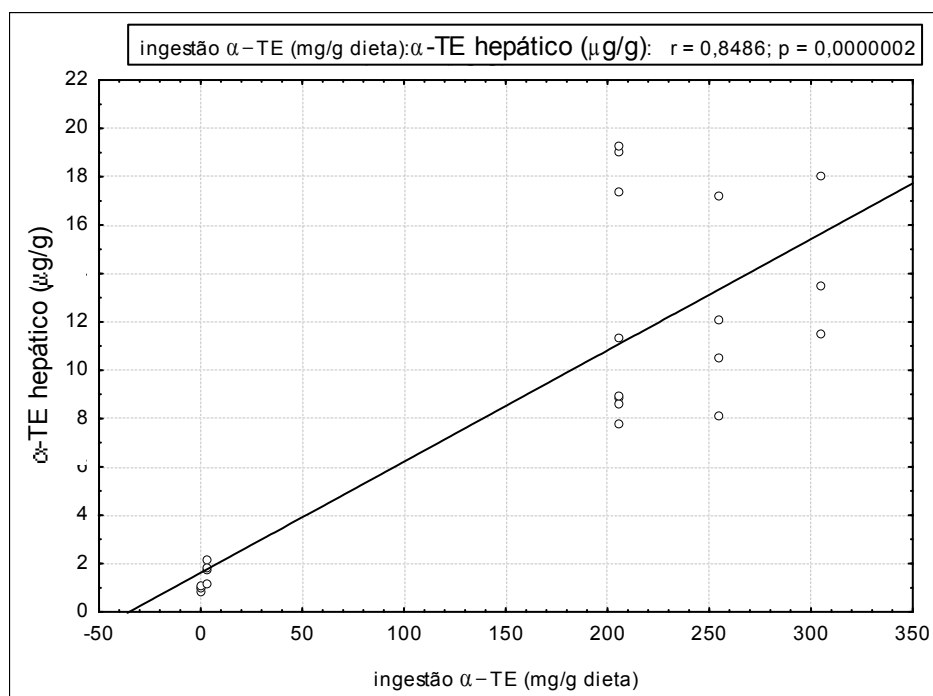


Figura 34. Correlação entre o teor de α -TE hepático (μ g/g) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias

Tabela 35. Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais no tecido adiposo (n=60, 5 ratos/grupo)

Tratamentos	α -T (μ g/g)	β -T (μ g/g)	γ -T (μ g/g)	δ -T (μ g/g)	Tocoferóis Totais (μ g/g)
30 dias					
Depletado	8,07 ^a ($\pm$ 2,12)	0,22 ^a ($\pm$ 0,21)	2,86 ^{ab} ($\pm$ 1,27)	0,82 ^{ab} ($\pm$ 0,90)	11,97 ^a ($\pm$ 4,43)
Soja	18,31 ^a ($\pm$ 5,40)	0,16 ^a ($\pm$ 0,13)	3,87 ^{ab} ($\pm$ 0,92)	1,62 ^{ab} ($\pm$ 0,56)	23,96 ^a ($\pm$ 6,31)
Ephynal®	49,64 ^b ($\pm$ 14,42)	nd ^a	1,56 ^a ($\pm$ 0,52)	0,72 ^a ($\pm$ 0,53)	51,92 ^c ($\pm$ 14,65)
DDOS	16,12 ^a ($\pm$ 4,52)	0,32 ^a ($\pm$ 0,31)	5,12 ^b ($\pm$ 1,77)	3,38 ^b ($\pm$ 1,28)	24,94 ^{ab} ($\pm$ 7,50)
DDOS 25	18,89 ^a ($\pm$ 5,44)	0,25 ^a ($\pm$ 0,17)	5,44 ^b ($\pm$ 1,61)	3,62 ^b ($\pm$ 1,98)	28,19 ^{ab} ($\pm$ 7,00)
DDOS 50	23,38 ^a ($\pm$ 3,71)	0,20 ^a ($\pm$ 0,15)	9,49 ^c ($\pm$ 0,82)	7,19 ^c ($\pm$ 0,54)	40,25 ^{bc} ($\pm$ 4,38)
60 dias					
Depletado	12,35 ^a ($\pm$ 3,75)	0,12 ^a ($\pm$ 0,06)	3,76 ^a ($\pm$ 1,92)	0,58 ^a ($\pm$ 0,39)	16,81 ^a ($\pm$ 5,03)
Soja	14,03 ^a ($\pm$ 3,08)	0,15 ^{ab} ($\pm$ 0,12)	3,98 ^a ($\pm$ 0,88)	1,25 ^a ($\pm$ 0,20)	19,41 ^a ($\pm$ 4,10)
Ephynal®	79,48 ^b ($\pm$ 24,43)	0,04 ^a ($\pm$ 0,05)	1,67 ^a ($\pm$ 0,59)	1,12 ^a ($\pm$ 0,47)	82,30 ^c ($\pm$ 24,99)
DDOS	27,88 ^a ($\pm$ 6,69)	0,69 ^{bc} ($\pm$ 0,48)	8,63 ^b ($\pm$ 1,83)	7,02 ^b ($\pm$ 2,05)	44,23 ^{ab} ($\pm$ 9,67)
DDOS 25	23,75 ^a ($\pm$ 1,24)	0,84 ^c ($\pm$ 0,21)	10,02 ^b ($\pm$ 0,96)	8,95 ^{bc} ($\pm$ 1,33)	43,54 ^{ab} ($\pm$ 3,50)
DDOS 50	36,56 ^a ($\pm$ 9,36)	0,26 ^{abc} ($\pm$ 0,29)	13,77 ^c ($\pm$ 0,97)	11,12 ^c ($\pm$ 1,03)	61,70 ^{bc} ($\pm$ 10,91)

* letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa no mesmo período (p<0,05) pelo teste de Tukey.
nd = não detectado

No teor de tocoferóis hepáticos os grupos com DDOS apresentaram desempenho regular, pois se assemelharam aos animais depletados e suplementados com óleo de soja, havendo diminuição do teor de vitamina E do T0 até os 30 dias, mas com o decorrer do tempo, houve uma pequena recuperação. Mesmo assim, estatisticamente não se diferenciaram das demais, apenas o grupo Ephynal[®] teve um bom desempenho.

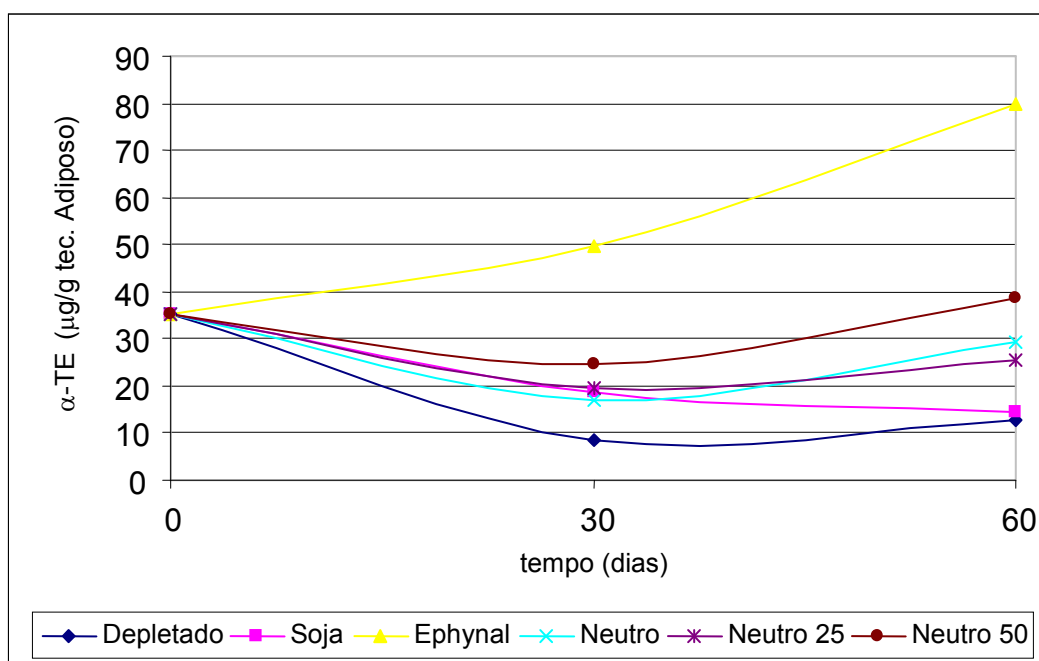


Figura 35. Teor de α -TE no tecido adiposo ($\mu\text{g/g}$) ao longo do período experimental

Com as figuras 36 e 37 percebe-se que no tecido adiposo abdominal a incorporação de α -T parece ser mais lenta ou o α -T é incorporado primeiramente no tecido muscular e depois no tecido adiposo. Com 30 dias a correlação está no limite entre uma associação moderada e fraca. Portanto, se o objetivo é a obtenção de gordura animal (por exemplo, bacon e banha), então para se obter um produto com maior teor de α -T, e conseqüente resistência a peroxidação lipídica, são necessários 60 dias de suplementação.

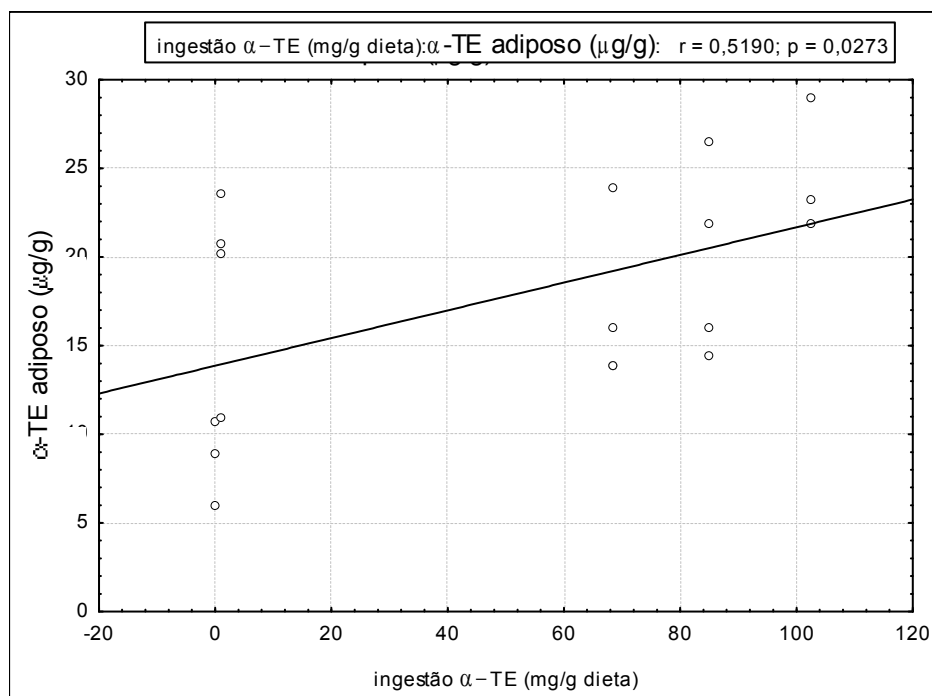


Figura 36. Correlação entre o teor de α -TE adiposo abdominal (μ g/g) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias

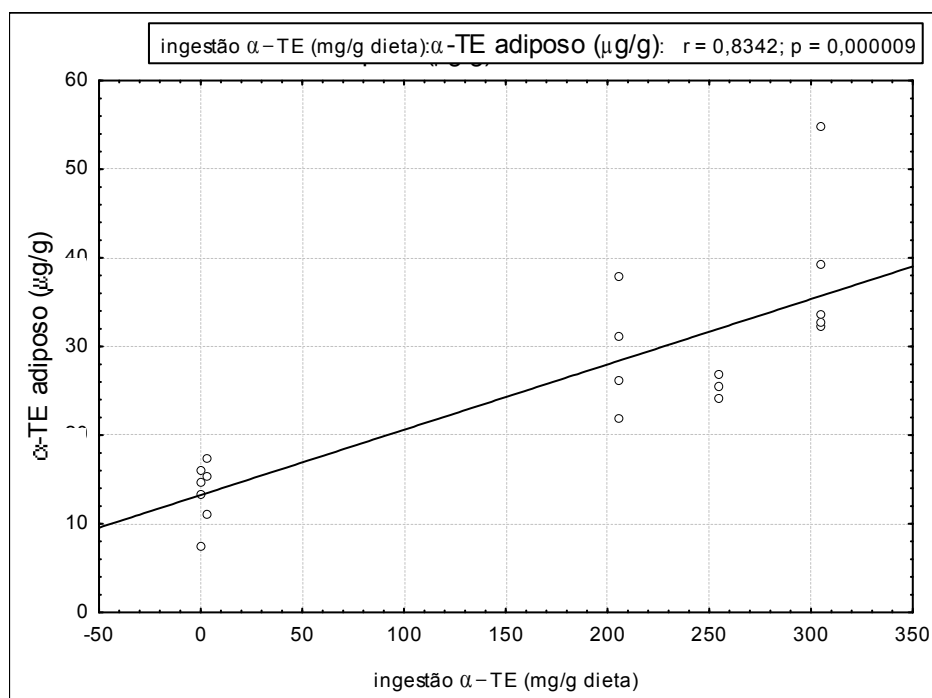


Figura 37. Correlação entre o teor de α -TE adiposo abdominal (μ g/g) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias

Tabela 36. Médias ($\pm$ DP) dos teores dos isômeros de tocoferóis e dos tocoferóis totais no tecido muscular (n=60, 5 ratos/grupo)

Tratamentos	α -T (μ g/g)	β -T (μ g/g)	γ -T (μ g/g)	δ -T (μ g/g)	Tocoferóis Totais (μ g/g)
30 dias					
Depletado	6,09 ^a ($\pm$ 1,40)	0,25 ^b ($\pm$ 0,15)	2,18 ^{bc} ($\pm$ 0,53)	0,29 ^a ($\pm$ 0,07)	8,81 ^{ab} ($\pm$ 1,98)
Soja	5,60 ^a ($\pm$ 1,09)	0,15 ^{ab} ($\pm$ 0,02)	0,97 ^{ab} ($\pm$ 0,25)	0,13 ^a ($\pm$ 0,01)	6,84 ^a ($\pm$ 1,37)
Ephynal®	13,76 ^a ($\pm$ 3,39)	0,02 ^a ($\pm$ 0,01)	0,23 ^a ($\pm$ 0,09)	0,09 ^a ($\pm$ 0,07)	14,09 ^{ab} ($\pm$ 3,52)
DDOS	17,88 ^a ($\pm$ 0,12)	0,25 ^{ab} ($\pm$ 0,00)	2,73 ^c ($\pm$ 0,11)	1,03 ^b ($\pm$ 0,05)	21,90 ^b ($\pm$ 0,29)
DDOS 25	16,58 ^a ($\pm$ 7,73)	0,41 ^b ($\pm$ 0,03)	3,40 ^c ($\pm$ 1,10)	1,44 ^b ($\pm$ 0,34)	21,83 ^b ($\pm$ 9,15)
DDOS 50	14,04 ^a ($\pm$ 3,02)	0,30 ^b ($\pm$ 0,09)	2,63 ^{bc} ($\pm$ 0,34)	1,16 ^b ($\pm$ 0,24)	18,12 ^{ab} ($\pm$ 3,51)
60 dias					
Depletado	9,84 ^a ($\pm$ 0,65)	0,18 ^{ab} ($\pm$ 0,03)	2,21 ^{ab} ($\pm$ 0,30)	0,21 ^{ab} ($\pm$ 0,00)	12,43 ^a ($\pm$ 0,98)
Soja	13,56 ^a ($\pm$ 1,60)	0,29 ^b ($\pm$ 0,10)	2,58 ^b ($\pm$ 0,04)	0,24 ^{ab} ($\pm$ 0,00)	16,68 ^{ab} ($\pm$ 1,47)
Ephynal®	21,10 ^{ab} ($\pm$ 3,39)	0,33 ^b ($\pm$ 0,09)	3,14 ^b ($\pm$ 0,57)	1,13 ^{bc} ($\pm$ 0,21)	25,71 ^{ab} ($\pm$ 4,08)
DDOS	30,49 ^b ($\pm$ 6,80)	0,02 ^a ($\pm$ 0,00)	0,32 ^a ($\pm$ 0,09)	0,16 ^a ($\pm$ 0,05)	30,99 ^b ($\pm$ 6,94)
DDOS 25	17,80 ^{ab} ($\pm$ 1,29)	0,22 ^{ab} ($\pm$ 0,03)	2,66 ^b ($\pm$ 0,45)	1,04 ^{abc} ($\pm$ 0,21)	21,72 ^{ab} ($\pm$ 1,97)
DDOS 50	15,72 ^a ($\pm$ 2,07)	0,24 ^{ab} ($\pm$ 0,06)	2,97 ^b ($\pm$ 1,06)	1,44 ^c ($\pm$ 0,49)	20,37 ^{ab} ($\pm$ 3,56)

* letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa no mesmo período ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.
nd = não detectado

O teor de tocoferóis no músculo dos ratos não diferiu muito entre os tratamentos, como observado na tabela 36. Os grupos suplementados com DDOS tiveram um desempenho muito semelhante ao grupo com vitamina E sintética (Ephynal®), com uma ligeira queda aos 30 dias e posterior elevação aos 60 dias, conforme pode ser visualizado na figura 38.

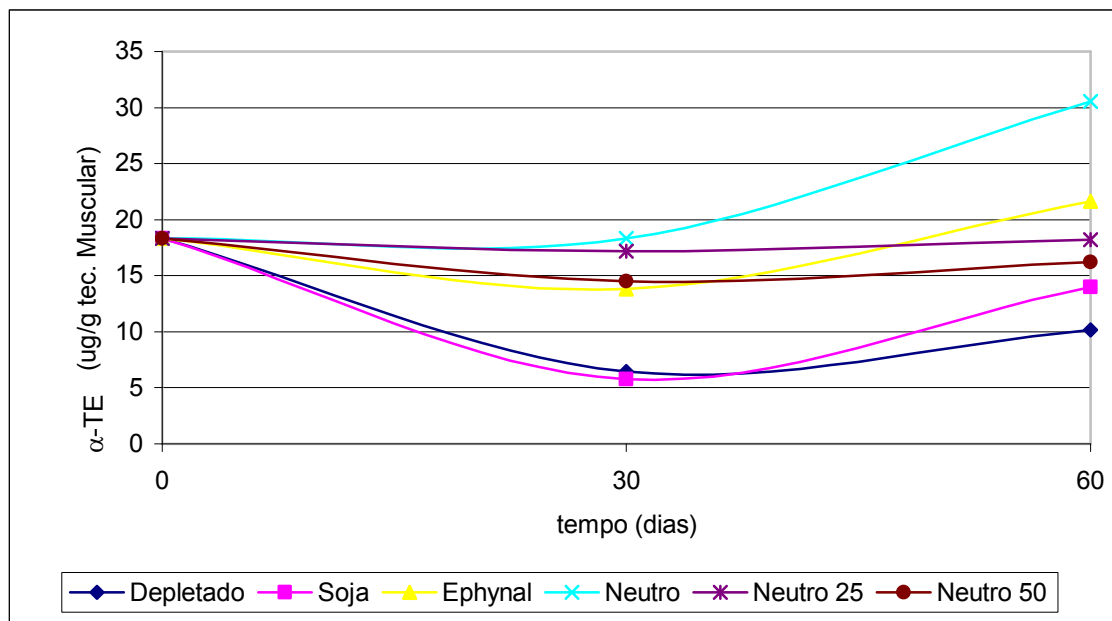


Figura 38. Teor de α -TE no tecido muscular ($\mu\text{g/g}$) ao longo do período experimental.

A média dos valores obtidos do teor de α -T aos 30 dias ($16,17 \mu\text{g/g}$) e aos 60 dias ($21,33 \mu\text{g/g}$) foi superior ao obtido por LAGE *et al.* (2003), que variou entre $8,5$ e $12 \mu\text{g/g}$, em bovinos suplementados com 1 mg de acetato de α -T/cabeça/dia, durante 98 dias. Destaca-se que o trabalho foi em diferentes músculos, mas de acordo com MITSUMOTO *et al.* (1998), este teor não difere estatisticamente entre os diferentes músculos, desde que com a mesma classificação quanto à proporção de fibras brancas e vermelhas. As fibras vermelhas são mais ricas em organelas subcelulares, principalmente mitocôndrias, possibilitando maior concentração de α -T, devido a sua localização nas membranas (LAGE *et al.*, 2003).

ARNOLD *et al.* (*apud* FACCO, 2002) estabeleceram uma concentração intramuscular de α -tocoferol ótima, para a estabilidade lipídica (3,1 $\mu\text{g/g}$), já LIU *et al.* (1995) encontraram os valores de 3,0 a 5,7 $\mu\text{g/g}$ para retardar substancialmente os processos oxidativos. Para produção de charque, bovinos Nelore, com idade de 30 meses, foram suplementados com acetato de α -T (1000mg/cabeça/dia) durante 98 dias, os resultados mostraram que a concentração de α -T utilizada não foi suficiente para retardar os efeitos da oxidação lipídica no charque. O autor relata ainda, que o experimento foi conduzido com animais jovens em fase de crescimento e, portanto, o tocoferol pode ter sido consumido durante o metabolismo de crescimento (FACCO, 2002).

Observando as correlações apresentadas nas figuras 39 e 40, percebe-se que no tecido muscular existe uma forte correlação entre o teor de α -TE no tecido e o ingerido aos 30 dias e esta passa a fraca aos 60 dias, indicando que a incorporação do α -T é mais eficiente com 30 dias, no restante do período (aos 60 dias) a associação diminui, ou seja, a eficiência da incorporação do α -T no músculo diminui. Na prática, para repletar um animal com α -T, deve-se usar um período até 30 dias, pois um período mais longo não se torna vantajoso. Isto é um aspecto positivo na utilização de DDOS para incrementar o teor de α -T no músculo dos animais, principalmente bovinos, com vistas a elevar o tempo de vida de prateleira das carnes.

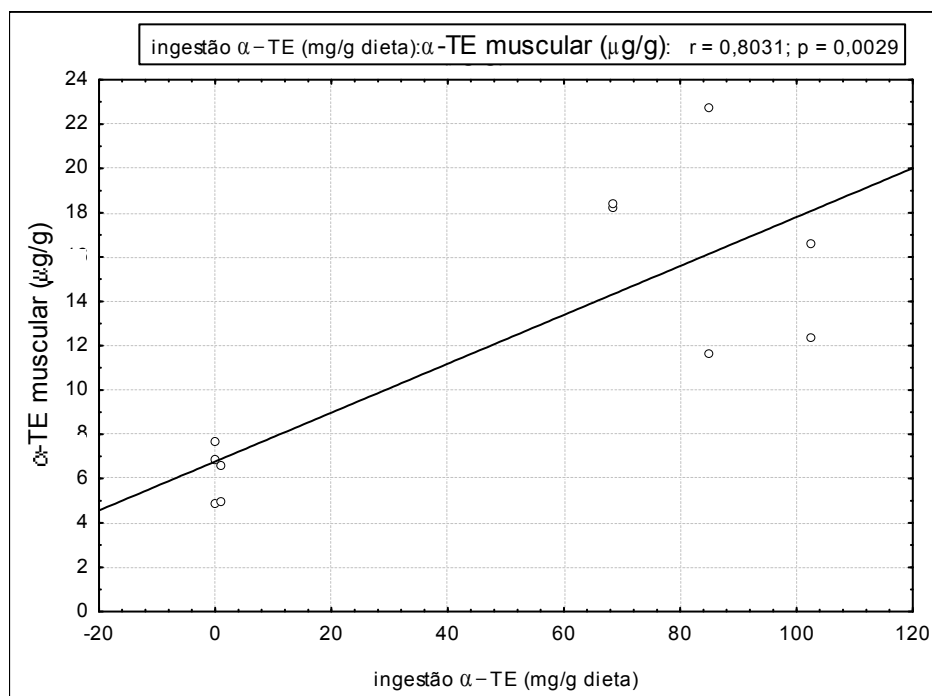


Figura 39. Correlação entre o teor de α -TE muscular (μ g/g) e a ingestão de α -TE ao longo dos 30 dias

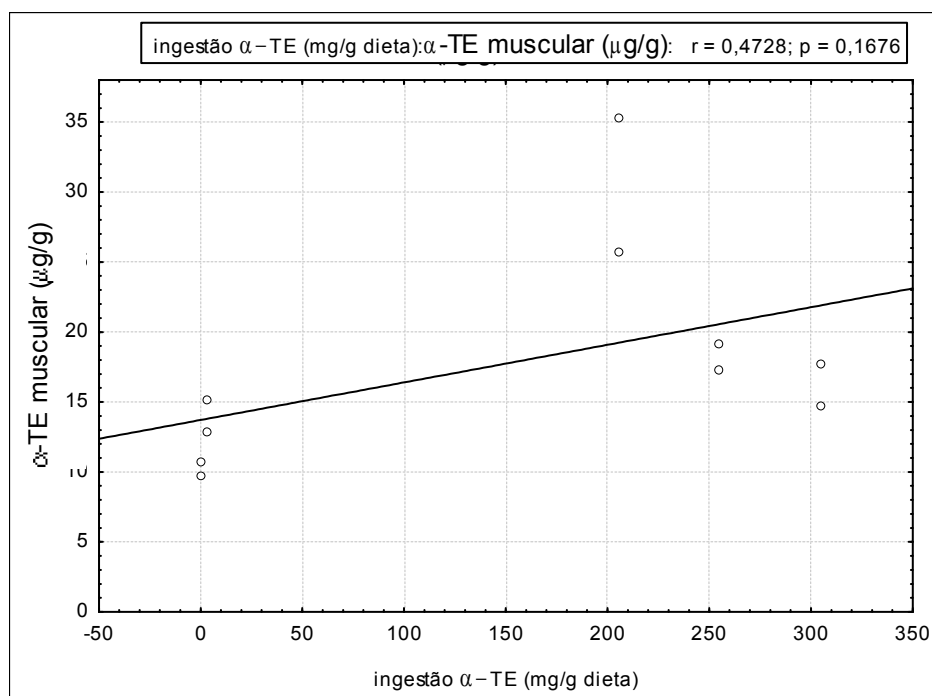


Figura 40. Correlação entre o teor de α -TE muscular (μ g/g) e a ingestão de α -TE ao longo dos 60 dias

Avaliando-se o comportamento da vitamina E sintética nos diferentes tecidos, observa-se que as correlações entre o teor de α -TE nos tecidos estudados e o teor de α -TE ingerido pelos animais ao longo do experimento vão desde moderada à forte (figura 41). Sugere-se que cada tecido tem um mecanismo de retenção do α -T e o único mecanismo conhecido é a presença de TTP. A relativa biodisponibilidade do tocoferol sintético e natural não é constante em humanos ou animais, porque suas concentrações relativas variam entre tecidos e variam com o tempo após a administração, além da duração e da quantidade de cada dose (BLATT *et al.*, 2004).

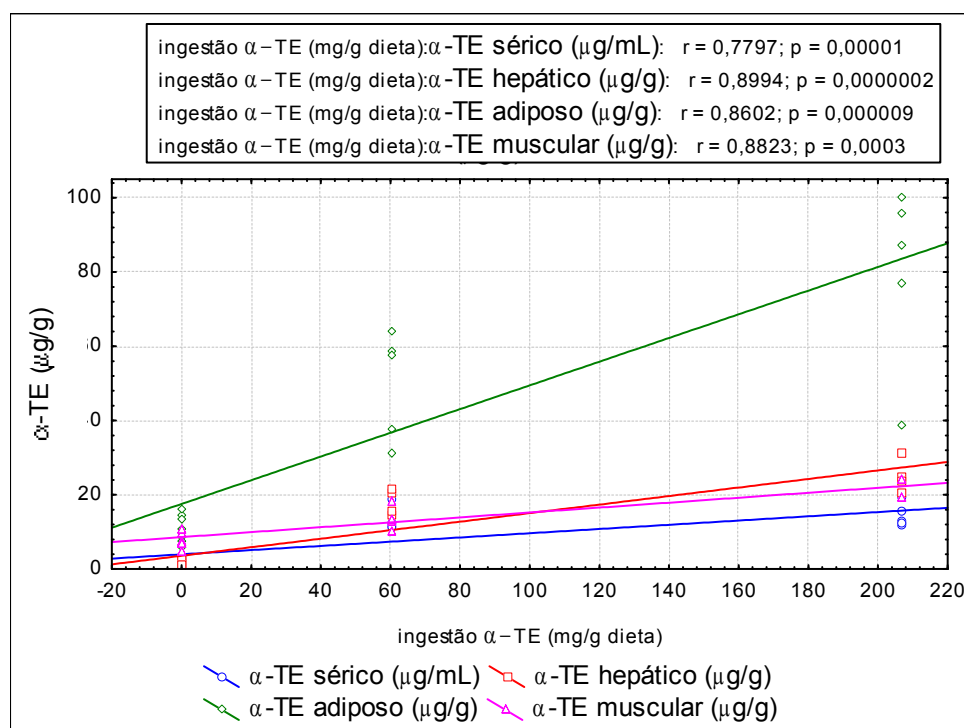


Figura 41. Correlação entre o teor de α -TE nos tecidos (μ g/g) e a ingestão de α -TE sintético

A modificação da dieta habitual dos animais por uma dieta rica em constituintes que melhorem sua qualidade é uma das tendências do mercado atual, visto que a população procura alimentos que promovam saúde. Uma maneira de minimizar a perda de substâncias nutricionalmente importantes e a produção de compostos nocivos a saúde é através do uso de antioxidantes,

principalmente os naturais (FACCO, 2002). Por sua vez, os suplementos são altamente biodisponíveis, entretanto existem importantes fatores que podem influenciar a biodisponibilidade dos nutrientes, a interação entre eles e o alimento é complexa e existem muitos fatores como a matriz a qual esta inserida, a quantidade e o tipo de processamento tecnológico, a competição entre os componentes com estrutura similar no intestino e a presença de outros componentes na dieta, que afetam tanto a biodisponibilidade quanto a bioatividade dos nutrientes (LICHTENSTEIN & RUSSEL, 2005).

Os valores médios do teor de α -T para os ratos suplementados com DDOS, neste Trabalho, foram: soro 7,27 $\mu\text{g/g}$ (30 dias) e 6,73 $\mu\text{g/g}$ (60 dias); fígado 10,13 $\mu\text{g/g}$ (30 dias) e 12,44 $\mu\text{g/g}$ (60 dias); gordura abdominal 19,46 $\mu\text{g/g}$ (30 dias) e 29,39 $\mu\text{g/g}$ (60 dias) e músculo 16,17 $\mu\text{g/g}$ (30 dias) e 21,33 $\mu\text{g/g}$ (60 dias). Os resultados obtidos neste experimento foram provenientes de modelo experimental, dose e aplicação de tocoferóis de forma diferente da literatura, mas ao se comparar observou-se que as concentrações de α -T obtidas foram maiores.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho, pode-se concluir que:

- a implementação do processo de neutralização do DDOS foi vantajosa, diminuindo o teor de AGL cerca de 52% do DDOS bruto, o que fez com que o teor no DDOS neutro ficasse 1,8%, aumentando o teor de tocoferóis totais para 11%. Por outro lado a neutralização não afetou a composição físico-química do DDOS, sendo que os AG em destaque foram palmítico, oléico e linoléico;
- o DDOS neutro, nas 3 doses estudadas, não influenciou negativamente no desempenho biológico dos ratos Wistar, obtendo-se crescimento corporal e hemograma normais, eficiência alimentar de 0,38 aos 30 dias e 0,24 aos 60 dias, e perfil lipídico sem alteração significativa (triacilgliceróis 119,8 mg/dL e 92,2 mg/dL; colesterol 72,5 mg/dL e 67,2 mg/dL respectivamente, aos 30 e 60 dias);
- com relação à autooxidação lipídica, os resultados encontrados para os índices analisados, malondialdeído e isoprostanos e, não forneceram uma resposta adequada para as condições deste experimento. O teor de malonaldeído apresentou-se dentro de um aspecto discutível, encontrando teores médios de MDA no: fígado de 2,3 µg MDA/g aos 30 dias e 3,1 µg MDA/g aos 60 dias; tecido adiposo de 1,9 µg MDA/g aos 30 dias e 2,7 µg MDA/g aos 60 dias; músculo de 1,6 µg MDA/g aos 30 dias e 0,5 µg MDA/g aos 60 dias. Já a dosagem de isoprostanos não apresentou sensibilidade para mostrar o estado de oxidação que se pretendia neste trabalho.

- quanto aos danos hepáticos e genotóxicos, não foram verificadas alterações significativas nas transaminases (GOT e GPT), bilirrubinas séricas e na frequência de micronúcleos em medula óssea;
- a distribuição dos tocoferóis totais no soro, músculo, gordura abdominal e fígado dos animais suplementados com DDOS neutro mostrou teores, na maioria, acima da literatura, mas inferiores àqueles ratos suplementados com vitamina E sintética.

Tendo em vista o propósito de estudar um subproduto industrial como fonte de tocoferóis naturais (vitamina E), o DDOS neutro apresentou potencial de utilização, baixo custo e método de obtenção simples, sem acarretar alterações biológicas aos animais consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. CUNNIFF, P. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1.

A.O.C.S. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**, 5th ed. Champaign: AOCS, 1998.

ABIOVE. **Estatística Mensal - Soja e Derivados 2006/2007**. São Paulo: Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais, 2007. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Acesso em 11 abr. 2007.

ALMEIDA, F. Q. A. **Ação antioxidante da vitamina E sobre a oxidação lipídica sérica e hepática de ratos Wistar suplementados com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3**. 2003. 137p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ALMEIDA, M. E. M.; RUSIG, O.; GUZMÁN, E. C. Emprego da saponificação com hidróxido de cálcio na extração dos tocoferóis de destilados da desodorização. In: 5^o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: SBCTA e UNICAMP, 2003. p. 1623.

ANGELUCCI, E.; CARVALHO, C. R. L.; CARVALHO, P. R. N.; FIGUEIREDO, I. B.; MANTOVANI, D. M. B.; MORAES, R. M. **Manual técnico de análises de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p.52-53.

AUGUSTO, M. M. M. **Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja**. 1988. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

AZZI, A. The role of α -tocopherol in preventing disease. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 43, supplement 1, p. 18-25, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 401p.

BHATTACHARYYA, A. C.; BHATTACHARYYA, D. K. Deacidification of high FFA rice oil by reesterification and alkali neutralization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 64, n. 1, p. 128-131, jan, 1987.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina E. In: PENTEADO, M. V. C. P. ed. **Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003, p. 121-164.

BIESALSKI, H. K.; GRIMM, P. **Nutrição – texto e atlas**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 400p.

BLATT, D. H.; PRYOR, W. A.; MATA, J. E.; RODRIGUEZ-PROTEAU, R. Re-evaluation of the relative potency of synthetic and natural α -tocopherol: experimental and clinical observations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 15, p. 380-395. 2004.

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

BLOCK, G.; LANGSETH, L. Antioxidant vitamins and disease prevention. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 80-84, jul, 1994.

BORHER, J. R. Z. **Prolongamento da vida-de-prateleira da carne bovina pelo tratamento pré-abate com destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS)**. 2002. 144p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BORHER, J. R. Z.; GONÇALVES, L. A. G.; FELÍCIO, P. E. α - and γ -tocopherol levels in Nelore steer blood plasma after a single oral treatment of soybean oil deodorizer distillate (SODD). **Meat Science**, Oxford, v. 61, p. 301-306, 2002.

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 561-565, jul/ago, 2005.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. E HUNTER, J. S. **Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley & Sons, 1978, 653p.

BUCKLEY, D. J.; MORISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, p. 3122-3130, 1995.

CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. 7ª ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1999. 340p.

DE GREYT, W.; KELLENS, M. Refining practice. In: **Edible Oil Processing**. HAMM, W.; HAMILTON, R. J. ed. Danvers: Blackwell. 2000. 281p.

EITENMILLER, R. R. Vitamin E content of fats and oils – nutritional implications. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 5, p. 78-81. May, 1997.

EITENMILLER, R. R.; LANDEN Jr, W. O. **Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 518p.

EITENMILLER, R.; LEE, J. **Vitamin E: food chemistry, composition and analysis**. New York: Marcel Dekker. 2004. 530p.

ERICKSON, D. R. Neutralization. In: ERICKSON, D. R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Champaign: AOCS Press. 1995. p. 184-185.

ESKIN, N. A. M.; SNAIT, T. **Dictionary of nutraceuticals and functional foods**. Functional foods and nutraceuticals series, n° 8. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis. 2006. p. 479-482.

FACCO, E. M. P. **Parâmetros de qualidade do charque relacionados ao efeito da suplementação da vitamina E na dieta de bovinos da raça Nelore em confinamento**. 2002. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FACIOLI, N. L. **Otimização da esterificação da matéria saponificável do destilado de desodorização do óleo de soja**. 2001. 209p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

FERNÁNDEZ, J, PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 345-353, 1997.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Intakes for Individuals, Vitamins**. Washington DC: National Academy of Sciences Press, 2002. 936p.

GALLO-TORRES, H. E. Biochemistry: Blood transport and metabolism. In: MACHLIN, L. J. **Vitamin E – a comprehensive treatise**. New York: Marcel Dekker, 1980. v. 1, p. 193-267.

GAST K., JUNGFER, M., SAURE, C., BRUNNER, G. Purification of tocopherols from edible oil. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v.34, p. 17-25, 2005.

GHOSH S., BHATTACHARYYA, D.K. Isolation of tocopherol and sterol concentrate from sunflower oil deodorizer distillate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 73, p.1271-1274, 1996.

GOENA, M.; MARZO, F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, L.; TOSAR, A.; FRÜHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiología**, Pamplona, n. 45, p. 55-60, 1989. Supplement.

GRAZIANO, J. M.; MANSON, J. E.; BURING, J. E. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 669, p. 249-259, 1992.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 268S-276S, 2005.

HIROTA, Y.; NAGAO, T.; WATANABE, Y.; SUENAGA, M.; NAKAI, S.; KITANO, M.; SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y. Purification of steryl esters from soybean oil deodorizer distillate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 80, n. 4, p. 341-346, 2003.

JENSEN, C.; LAURIDSEN, C.; BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 9, p. 62-72, 1998.

JUNG, M. Y.; YOON, S. H.; MIN, D. B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 66, p. 118-120, 1989.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 155-166, 2000.

LAGE, M. E.; GODOY, H. T.; FACCO, E. M. P. Effect of dietary vitamin E on the lipid oxidation and α -tocopherol levels in Nelore steers muscle. In: 49th International Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, 2003, v. 3, p. 89-90.

LAMPI, A. M.; KAMAL-ELDIN; PIIRONEN. Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains, LLC. In: SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M.L. ed. **Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects**. Boca Raton: CRC Press, Chapter 1, 2002. 432p.

LIU, Q.; LARANI, M. C.; SCHAEFER, D. M. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, p. 3131-3140, 1995.

LICHTENSTEIN, A. H.; RUSSEL, R. M. Essential nutrients: food or supplements? Where should the emphasis be? **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 294, n. 3, p. 351-358, jul, 2005.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In: MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 99-145.

MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, n. 1/2, p. 27 – 35, 1993.

MARTINS, P. F.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL-FILHO, R.; WOLF-MACIEL, M. R. Comparison of two different strategies for tocopherols enrichment using a molecular distillation process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 45, p. 753 – 758, 2006a.

MARTINS, P. F.; ITO, V. M.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL, M. R. W. Free fatty acid separation from vegetable oil deodorizer distillate using molecular distillation process. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 78 – 84, 2006b.

MITSUMOTO, F. J.; ARNOLD, R. N.; SCHAEFER, D. M.; CASSENS, R. G. Dietary versus *postmortem* supplementation of vitamina E on pigment and lipid stability in ground beef. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 71, p. 1812-1816, 1993.

MITSUMOTO, M.; OZAWA, S.; MITSUHASHI, T.; KOIDE, K. Effect of dietary vitamin E supplementation for one week before slaughter on drip, colour and lipid stability during display in Japanese black steer beef. **Meat Science**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 165-174, 1998.

MORAES, C. M. B.; OLIVEIRA, A. C.; RIOS, K. R. Vitamina E do destilado da desodorização do óleo de soja e sob forma de fármaco na prevenção à oxidação dos lipídeos e da necrose hepática decorrente de dieta deficiente em cistina para ratos. In: XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ASBRAN, 2004. p. 198.

MORAIS, M., M.; PINTO, L. A. A.; ORTIZ, S. C. A.; CREXI, V. T.; SILVA, R. L.; SILVA, J. D. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 23 – 33, 2001.

NAGESHA, G. K.; MANOHAR, B.; SANKAR, K.U. Enrichment of tocopherols in modified soy deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide extraction. **European Food Research and Technology**, New York, v. 217, n. 5, p. 427 – 433, 2003.

NANJI, A. A.; KHWAJA, S.; TAHAN, S. R.; SADRZADEH, H. Plasma levels of a novel noncyclooxygenase-derived prostanoid (8-isoprostane) correlate with severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 269, n. 3, p. 1280 – 1285, 1994.

NEVES, M. A. **Efeito da suplementação de vitamina E na ração sobre a estabilidade da cor em apresuntado de sobrecoxas de peru**. 2001. 59p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

OECD Environment, Health and Safety Publications. **Drafts detailed review paper on transgenic rodent mutation assays**. Paris: OECD, 2005. p. 21-33. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/39/27/34446502.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2007.

OKOSHI, K.; GUIMARÃES, J. F. C.; DI MUZIO, B. P.; FERNANDES, A. A. H.; OKOSHI, M. P. Miocardiopatia Diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 160 – 167, mar, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; REIS, S. M. P. M.; MORAES, C. M. B.; CUNHA, J. S. T.; HAIDAMUS, L. L.; FELICIANO, L. M. F.; SIMÕES M. G. O uso do destilado da desodorização do óleo de soja como fonte alternativa de vitamina E reduziu a evolução ponderal em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 5, p. 693 – 697, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; REIS, S. M. P. M.; BENITES, C. I.; CAVALHEIRO, L.; SOUZA, M. B.; FARIA, M. Suplementação com DDOS não causa toxicidade aguda em ratos Wistar. In: 14º Congresso Latinoamericano de Nutrición, Florianópolis. **Anales...** Florianópolis: SLAN, 2006. NE 118.

OLIVEIRA, S. L.; DINIZ, D. B.; AMAYA-FARFÁN, J. Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, n. 89, p. 89 – 96, 2003.

OLIVEIRA LIMA, A.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZI, J.; CANÇADO, J. P. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 669p.

PASS, D.; FREETH, G. **ANZCCART Facts Sheet**. Wellington: Anzccart News, 1993. v. 6, n. 4, 1993. p. 1-4. Disponível em: <https://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/publications/FS_TheRat.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2007.

PELLET, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutritional Evaluation of Protein Foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154p.

PIKE, R. L.; BROWN, M. L. **Nutrition – An integrated approach**. 3rd ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1984. p. 151.

POKORNÝ, J.; KORCZAK, J. Chapter 13: Preparation of natural antioxidants. In: **Antioxidants in foods – Practical applications**, Edited by POKORNÝ J.; YANISHLIEVA N.; GORDON M., CIDADE: Woodhead Publishing Ltda, 2001.

POKORNÝ, J.; TROJÁKOVÁ, L.; TACÁCSOVÁ, M. Chapter 15: The use of natural antioxidants in food product of plant origin. In: **Antioxidants in foods – Practical applications**, Edited by POKORNÝ J.; YANISHLIEVA N.; GORDON M., CIDADE: Woodhead Publishing Ltda, 2001.

QUEIROZ-MONICI, K. S.; COSTA, G. E. A.; SILVA, N.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. **Nutrition**, New York, v. 21, p. 602–608, 2005.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 246p.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N. e SCHIMIDT, G. R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 2182 – 2185, 1992.

RAPAPORT, S. I. **Introdução à Hematologia**. São Paulo: Roca, 1990. p. 8 – 29.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939 – 51, 1993.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; TAKAHASHI, C. S.; GRISÓLIA, C. C. **Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo**. São Paulo: SBMCTA, série de documentos, n. 1, 2004. Disponível em: <<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>. Acesso em: 20 mar. 2007.

SANTOS, C. R. B.; PORTELLA, E. S.; AVILA, S. S.; SOARES, E. A. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 389 – 401, 2006.

SCHRIJVERS, B. F.; DE VRIESE, A. S.; VAN DE VOORDE, J.; RASCH, R.; LAMEIRE, N. H.; FLYVBJERG, A. Long-term renal changes in the goto-kakizaki rat, a model of lean type 2 diabetes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 1092 – 1097, 2004.

SILVEIRA, J. M. **Soja**. Brasília: Ministério das Relações Exteriores. 2007. Disponível em: <<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/economia/agroind/soja/index.htm>>. Acesso em 11 jan. 2007.

SINNHUBER, R. O.; YU, T. C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. **Food Technology**, Chicago, v. 12, p. 9-12, 1958.

SONNTAG, N.O.V. Growth potential for soybean oil products as industrial materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 62, n. 5, p. 928 – 933, 1985.

STATSOFT, Inc. **STATISTICA**. (data analysis software system), version 7. Tulsa, USA, WEB: <http://www.statsoft.com>. 2004.

TACONIC FARMS, Inc. **Control Data of Br/Han: Wist@tac (GALAS) Rat**. New York: TACONIC, 18p. 2005. Disponível em: <http://www.taconic.com/user-assets/Documents/Products%20and%20Services/Animal%20Models/Wistar_Hannover_data.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2007.

UEDA, T.; IGARASHI, O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC – pretreatment of samples and extraction of tocopherols. **Journal of Micronutrient Analysis**, Barking, v. 7, p. 79 – 96, 1990.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e

marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323 – 1338, 2007.

VERLEYEN, T.; VERHE, R.; GARCIA, L.; DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A.; DE GREYT, W. Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 921, p. 277 – 285, 2001.

WOERFEL, J. B. Processing and utilization of by-products from soy oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 58, n. 3, p. 188 – 191, mar, 1981.

APÊNDICE A

O gráfico de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes. Os efeitos cujos retângulos estiverem a direita da linha divisória ($p=0,05$) devem ser considerados no modelo matemático. Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do teste t , obtidos na tabela dos efeitos principais.

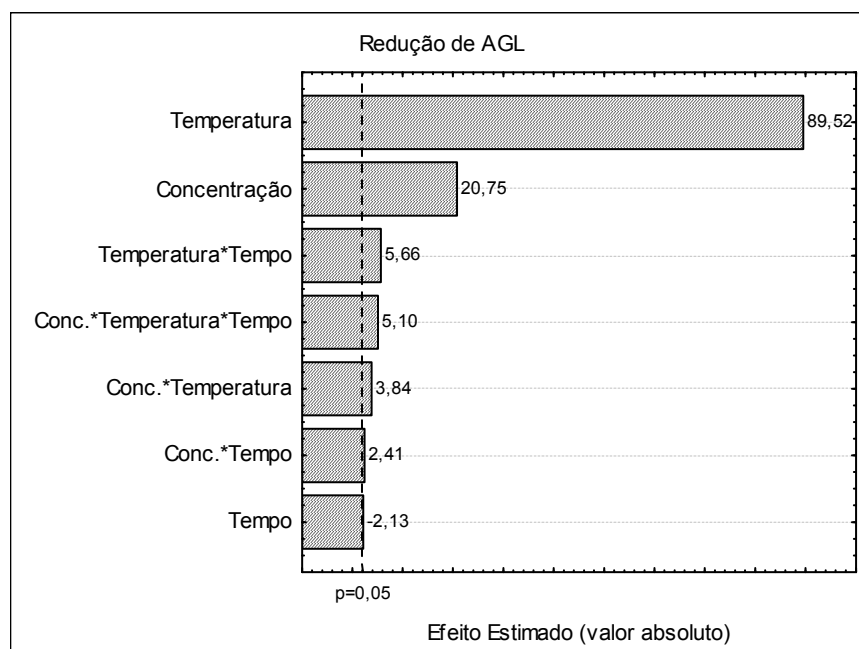


Figura A1. Gráfico de Pareto para a resposta redução de AGL do DDOS no 1º experimento

Modelo matemático empírico para a redução de AGL (%) no DDOS neutro em função do efeito das variáveis: Concentração (N), Temperatura (°C) e Tempo (min).

$$\begin{aligned} \text{Red AGL} = & 37,58 + (0,91 \times \text{Conc.}) + (3,93 \times \text{Temperatura}) - (0,09 \times \text{Tempo}) + \\ & (0,16 \times \text{Conc.} \times \text{Temperatura}) + (0,10 \times \text{Conc.} \times \text{Tempo}) + (0,24 \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo}) + \\ & (0,22 \times \text{Conc.} \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo}) \end{aligned}$$

Tabela A1. Análise de variância para a redução de AGL após a neutralização

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	396,323	7	56,618	25,45097
Resíduo	44,492	20	2,225	
Falta de ajuste	43,609	1	43,609	
Erro puro	0,883	19	0,046	
Total	440,815	27		
Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro		$R^2 = 0,8991$		$F_{0,95;7;20} = 2,5140$

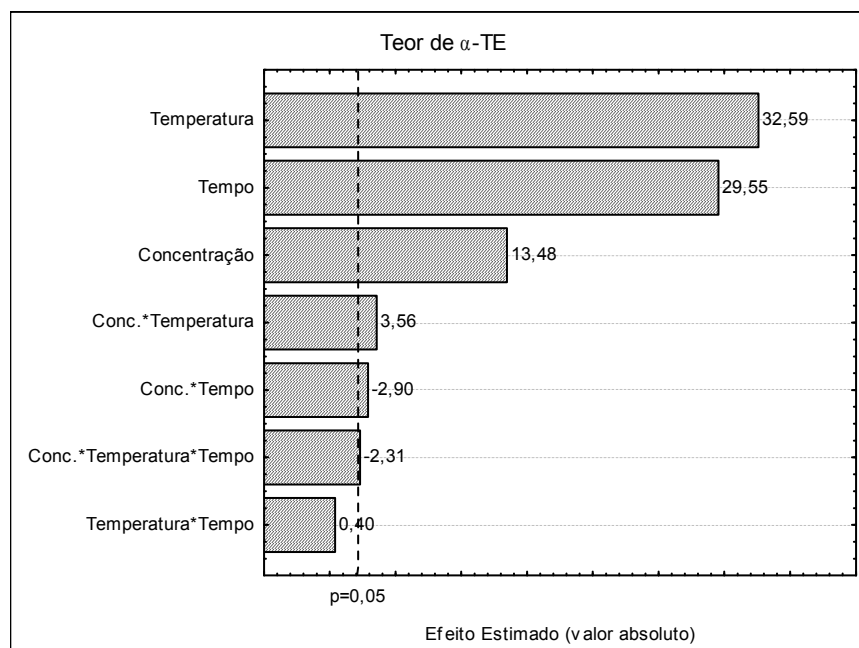


Figura A2. Gráfico de Pareto para a resposta teor de α -TE do DDOS no 1º experimento

Modelo matemático empírico para o teor de α -TE (%) no DDOS neutro em função do efeito das variáveis: Concentração (N), Temperatura (°C) e Tempo (min).

$$\begin{aligned} \text{Teor } \alpha\text{-TE} = & 12,51 + (0,85 \times \text{Conc.}) + (2,12 \times \text{Temperatura}) + (1,92 \times \text{Tempo}) + \\ & (0,23 \times \text{Conc.} \times \text{Temperatura}) - (0,19 \times \text{Conc.} \times \text{Tempo}) + (0,03 \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo}) - \\ & (0,15 \times \text{Conc.} \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo}) \end{aligned}$$

Tabela A2. Análise de variância para o teor de α -TE após a neutralização

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	217,543	7	31,078	22,4529
Resíduo	27,680	20	1,384	
Falta de ajuste	25,752	1	25,752	
Erro puro	1,928	19	0,101	
Total	245,223	27		
Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro		R ² = 0,8871		F _{0,95;7;20} = 2,5140

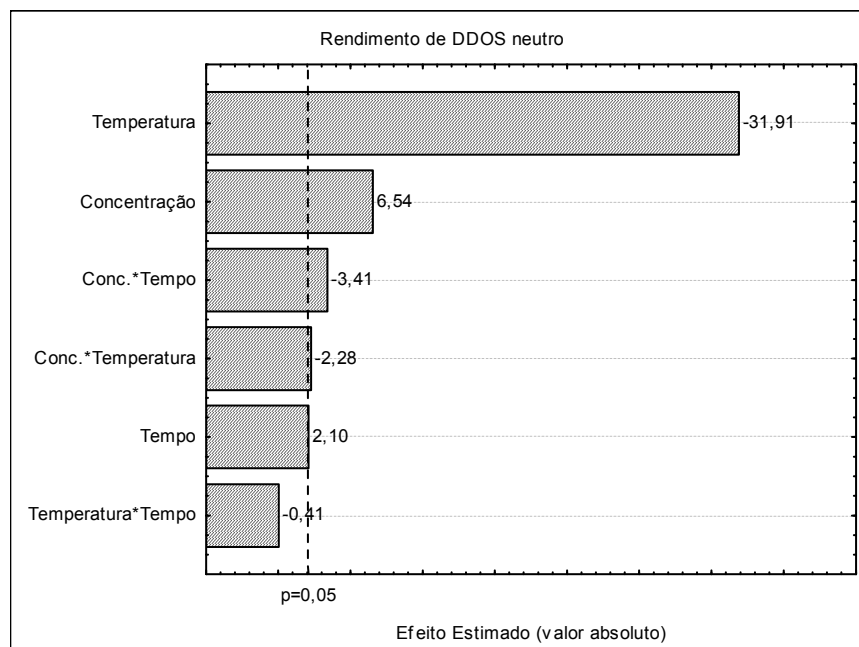


Figura A3. Gráfico de Pareto para a resposta rendimento de DDOS neutro no 1º experimento

Modelo matemático empírico para o rendimento de DDOS neutro (%) em função do efeito das variáveis: Concentração (N), Temperatura (°C) e Tempo (min).

$$\text{Rendimento} = 24,10 + (2,73 \times \text{Conc.}) - (13,33 \times \text{Temperatura}) + (0,88 \times \text{Tempo}) - (0,95 \times \text{Conc.} \times \text{Temperatura}) - (1,43 \times \text{Conc.} \times \text{Tempo}) - (0,02 \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo})$$

Tabela A3. Análise de variância para o rendimento de DDOS neutro

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	4529,953	6	754,992	48,5422
Resíduo	326,620	21	15,553	
Falta de ajuste	247,106	2	123,553	
Erro puro	79,514	19	4,185	
Total	4856,573	27		
Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro		$R^2 = 0,9327$		$F_{0,95;6;21} = 2,5727$

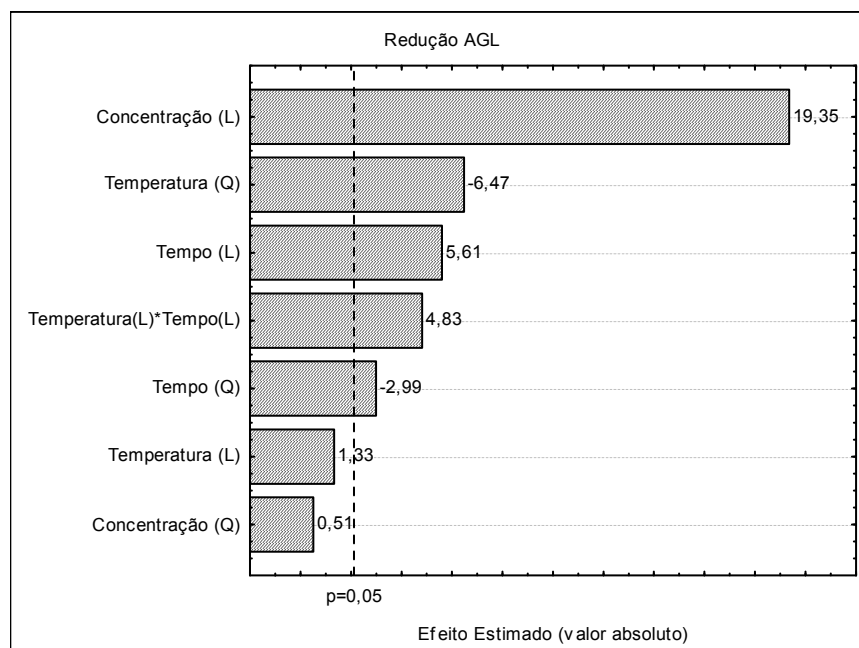


Figura A4. Gráfico de Pareto para a resposta redução de AGL do DDOS no 2º experimento

Modelo matemático empírico para a redução de AGL (%) no DDOS neutro em função do efeito das variáveis: Concentração (N), Temperatura (°C) e Tempo (min).

$$\text{Red AGL} = 50,15 + (0,42 \times \text{Conc.}) + (0,03 \times \text{Temperatura}) + (0,12 \times \text{Tempo}) + (0,01 \times \text{Conc.}^2) - (0,19 \times \text{Temperatura}^2) - (0,09 \times \text{Tempo}^2) + (0,14 \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo})$$

Tabela A4. Análise de variância para a redução de AGL após a neutralização

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	6,404	7	0,915	32,8265
Resíduo	0,641	23	0,028	
Falta de ajuste	0,433	7	0,062	
Erro puro	0,208	16	0,013	
Total	7,045	30		
Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro		$R^2 = 0,9090$		$F_{0,95;7;23} = 2,4422$

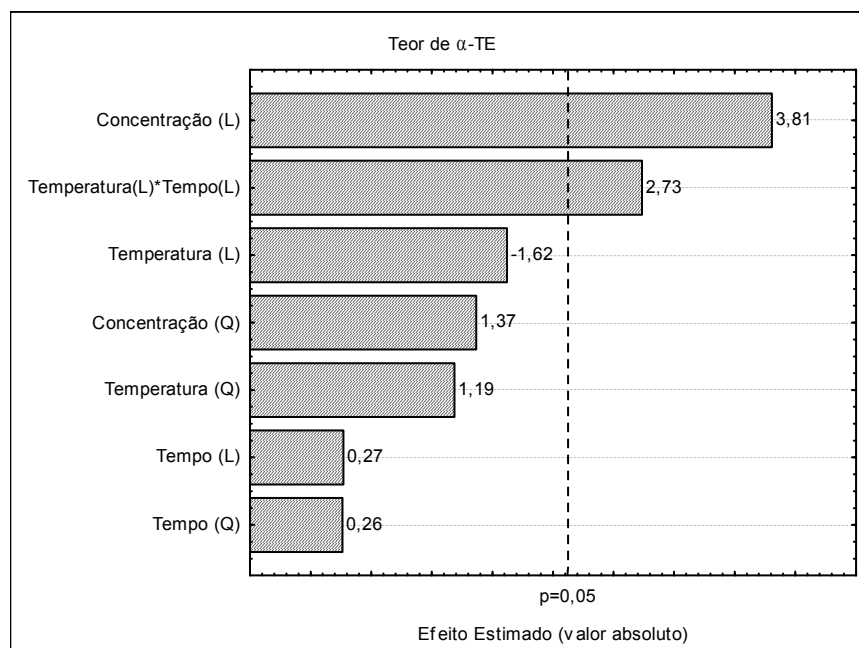


Figura A5. Gráfico de Pareto para a resposta teor de α -TE do DDOS no 2º experimento

Modelo matemático empírico para o teor de α -TE (%) no DDOS neutro em função do efeito das variáveis: Concentração (N), Temperatura (°C) e Tempo (min).

$$\text{Teor } \alpha\text{-TE} = 2,30 + (0,14 \times \text{Conc.}) - (0,06 \times \text{Temperatura}) + (0,01 \times \text{Tempo}) + (0,06 \times \text{Conc.}^2) - (0,06 \times \text{Temperatura}^2) + (0,01 \times \text{Tempo}^2) + (0,13 \times \text{TemperaturaxTempo})$$

Tabela A5. Análise de variância para o teor de α -TE após a neutralização

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,960	7	0,137	5,2655
Resíduo	0,599	23	0,026	
Falta de ajuste	0,039	7	0,006	
Erro puro	0,561	16	0,035	
Total	1,560	30		
Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro		$R^2 = 61,58\%$		$F_{0,95;7;23} = 2,4422$

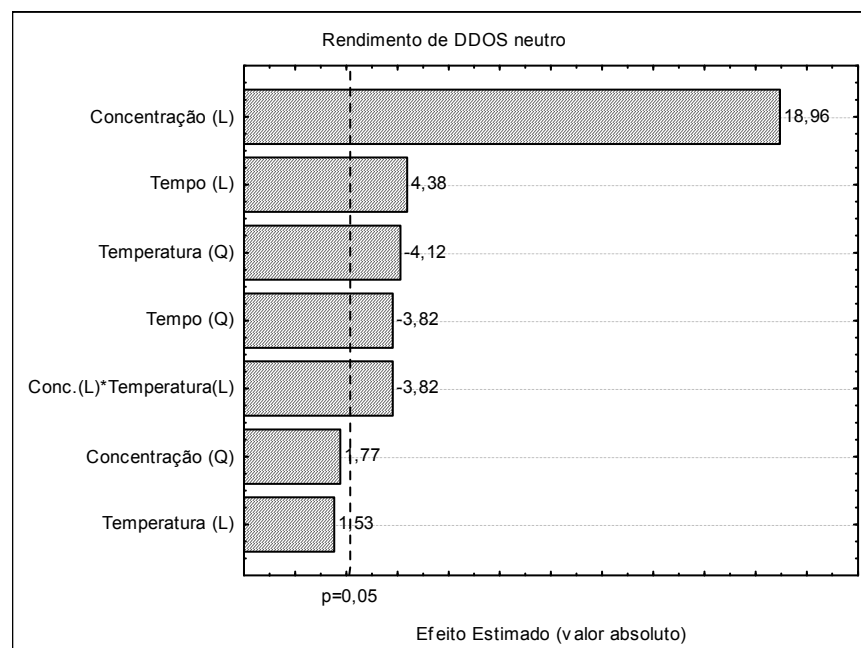


Figura A6. Gráfico de Pareto para a resposta rendimento de DDOS neutro no 2º experimento

Modelo matemático empírico para o rendimento de DDOS neutro (%) em função do efeito das variáveis: Concentração (N), Temperatura (°C) e Tempo (min).

$$\text{Rendimento} = 13,18 + (4,11 \times \text{Conc.}) + (0,33 \times \text{Temperatura}) + (0,95 \times \text{Tempo}) + (0,51 \times \text{Conc.}^2) - (1,18 \times \text{Temperatura}^2) - (1,09 \times \text{Tempo}) - (1,08 \times \text{Conc.} \times \text{Temperatura})$$

Tabela A6. Análise de variância para o rendimento de DDOS neutro após a neutralização

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	373,734	7	53,391	4,2962
Resíduo	285,831	23	12,427	
Falta de ajuste	65,269	7	9,324	
Erro puro	220,562	16	13,785	
Total	659,565	30		
Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro		R ² = 0,5666%		F _{0,95;7;23} = 2,4422

APÊNDICE B

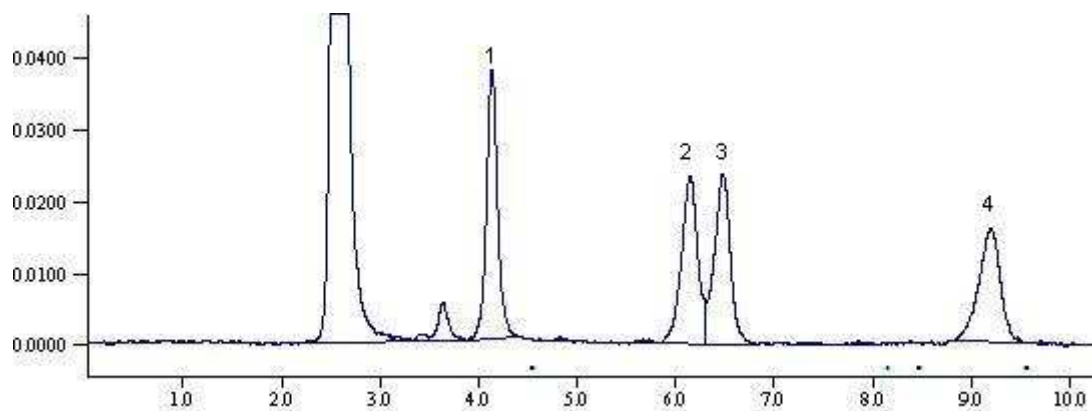


Figura B1. Cromatograma dos tocoferóis (1= α -Tocoferol; 2= β -Tocoferol; 3= γ -Tocoferol; 4= δ -Tocoferol)

ANEXO A



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 562-1 sobre "DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA (DDOS) COMO SUPLEMENTO DE VITAMINA E", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira/Ciberlem Iribarrem Benites está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 09 de Maio 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 562-1, entitled "SOYBEAN OIL DEODORIZER DISTILLATE (SODD) AS A VITAMIN E SUPPLEMENT", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 09, 2003

Campinas, 09 de Maio de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
Caixa Postal 6109
CEP - 13063-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEPHONE: (19) 3788-6359
FAX: 55 19 32893124

ANEXO B

Tabela B1. Composição da mistura mineral (AIN-93G)

Elementos Minerais	g/kg
<i>Essenciais</i>	
Carbonato de cálcio	357,00
Fosfato de potássio monobásico	196,00
Citrato de potássio tribásico	70,78
Cloreto de sódio	74,00
Sulfato de potássio	46,60
Óxido de magnésio	24,00
Citrato de férrico	6,06
Carbonato de zinco	1,65
Carbonato de manganês	0,63
Carbonato de cobre	0,30
Iodeto de potássio	0,01
Selenato de sódio	0,01025
Paramolibdato de amônio	0,00795
<i>Potencialmente Benéficos</i>	
Metassilicato de sódio	1,45
Sulfato de cromo e potássio	0,275
Cloreto de lítio	0,0174
Ácido bórico	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066
Sacarose em pó	221,026

ANEXO C

Tabela C1. Composição da mistura vitamínica (AIN-93G) depletada em vitamina E

VITAMINAS	g/kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina – HCl	0,700
Tiamina – HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Cianocobalamina (B12)	2,500
Palmitato de all-trans-retinol (A)	0,800
Colicalciferol (D3)	0,250
Filoquinona (K)	0,075
Sacarose em pó	989,655

MIX CASSAB UNI 5234

Trabalho Completo Apresentado no II SIMPÓSIO INTERNACIONAL
TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES EM TECNOLOGIA DE ÓLEOS E GORDURAS
SBOG – Florianópolis/SC, Setembro de 2005.

AValiação de Métodos de Neutralização do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS)

Cibelem Iribarrem BENITES¹; Soely Maria P. M. REIS²; Admar Costa de OLIVEIRA³

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),

¹cbenites@fea.unicamp.br, ²soely@fea.unicamp.br, ³admarco@fea.unicamp.br

RESUMO

A utilização de subprodutos vem crescendo devido à necessidade de adequação das empresas às normas ambientais. Por outro lado, a substituição de insumos artificiais por produtos de origem natural, vem ganhando forte destaque mundial. Estes fatos fomentam o estudo da utilização do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) como suplemento de tocoferóis - compostos com atividade vitamínica E e ação antioxidante natural. O DDOS é um subproduto oriundo do processo de refino do óleo de soja, que também é rico em ácidos graxos livres, esteróis e hidrocarbonetos, com potencialidade para extração de vitamina E; entretanto tem sido demonstrado que esta prática não é viável economicamente. Devido ao excesso de ácidos graxos livres presentes no DDOS acarretarem efeitos nocivos às células, torna-se necessário uma etapa de neutralização deste subproduto, afim de que o DDOS neutro possa ser uma alternativa para o enriquecimento de dietas animais e possivelmente humanas. Com vistas a atingir tais objetivos, foram realizados ensaios de neutralização do DDOS bruto, sob diferentes condições: quanto ao tipo de álcali, concentração do mesmo, tempo de homogeneização e temperatura da reação. Tendo como respostas de interesse a redução de ácidos graxos livres, teor de tocoferóis (expressos em equivalentes de α -tocoferol) e rendimento em peso de DDOS neutro obtido. Através do planejamento experimental, estabeleceu-se as condições de neutralização ideais com Na_2CO_3 4,34N, temperatura de 45,8°C e tempo de 3'20". Tais parâmetros serão empregados em futuras neutralizações de DDOS, que serão testados em ensaios biológicos. **Palavras-chave:** Óleo de soja; subprodutos industriais; neutralização; destilado da desodorização de óleo de soja.

ABSTRACT

Recovery and use of by-products by industry have increased substantially to conform with ever stringent environmental concerns. As well, replacement of synthetic material by natural products has deserved great attention. Both facts motivated this work, which regarded the use of soybean oil deodorizer distillate (SODD) as a tocopherols supplement - compounds with vitamin E activity and natural antioxidant action. SODD is a by-product

from the soybean oil refining process. It is rich in free fatty acids, sterols and hydrocarbons, and a source of vitamin E, although this extraction has been proved not economical. To be used to enrich animal or even humane food, SODD must get rid of the excess of free fatty acids, which are harmful to cells. This work carried out neutralization assays under different conditions, considering different alkaline compounds and concentrations, homogenization time and reaction temperature. The measured outputs were the reduction on free fatty acids concentration, the content of tocopherols (expressed as α -tocopherol equivalent), and the mass yield of neutral SODD. The ideal neutralization conditions, obtained carrying out analyses suggested by an experimental planning, were: Na_2CO_3 4.34 N, 45.8 Celsius, 3 min 20 s. Such conditions will be employed in further biological tests.

Keywords: Soybean oil; industrial by-products; neutralization; soybean oil deodorizer distillate.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Durante as etapas do refino do óleo de soja, são gerados diversos subprodutos: borra de neutralização, gomas e destilado da desodorização, contendo tocoferóis e fitosteróis. Estes possuem baixo valor econômico (Woerfel, 1981), mas, são matérias-primas muito interessantes devido ao seu conteúdo de tocoferóis e esteróis (Augusto, 1988), podendo ser recuperados e concentrados, tornando-se produtos de alto valor comercial. Entretanto, a produção de compostos com propriedades tecnológicas, nutricionais e/ou terapêuticas na forma de concentrados, exige muitas técnicas de separação e purificação (Facioli, 2001), encarecendo os produtos. Almeida (2000) salienta que os métodos utilizados no país para a extração não apresentam boa eficiência na remoção dos tocoferóis, concentrando os mesmos em quantidade insuficiente, indicando que ainda existe carência de tecnologia aplicável economicamente, pelo menos no Brasil, para a elaboração de concentrados de tocoferóis a partir do subproduto.

O DDOS é um produto heterogêneo, rico em ácidos graxos (principalmente palmítico e linoléico), β -sitosterol (9,13%), esteróis (20%) tocoferóis totais (10%) (Augusto, 1988). Este subproduto representa de 0,15 a 0,45% em peso do óleo a ser desodorizado (Augusto, 1988). Estima-se que se obtenha entre 0,1 a 0,3 kg de tocoferóis a cada tonelada de óleo de soja produzido (Barata & Contreras, 1984 *apud* Augusto, 1988), mas o processamento exige técnicas altamente sofisticadas para a separação dos componentes (Woerfel, 1981). Assim sendo, com uma média de 465 mil ton de óleo produzido (safra 2004/2005), podemos obter no mercado uma média de 93 ton de DDOS mensalmente.

Portanto, dada a importância dos tocoferóis, a utilização do DDOS sob a forma mais bruta possível é uma solução para a elaboração de um suplemento vitamínico viável. O aproveitamento deste subproduto como nutriente na alimentação corrobora ainda, com o aumento na tendência mundial de utilização de compostos e ingredientes naturais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é implantar uma etapa de neutralização do DDOS, visando principalmente a redução no teor de AGL, sem perdas de α -tocopherol, a fim de se verificar o potencial de utilização do DDOS como suplemento de vitamina E.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Na etapa de neutralização, os parâmetros importantes ao processo são: temperatura, concentração e tempo de contato entre o produto e o álcali, além do tipo de álcali empregado. Baseado nestes preceitos, o procedimento de neutralização do DDOS foi testado e adaptado de acordo com as necessidades do produto, ou seja, teor de AGL.

Ensaio Preliminar: Foram testados diferentes tipos de álcalis [NaOH, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂, KOH, NaHCO₃, Na₂CO₃ e EtOH 70% mais adição de álcali], nas concentrações 2N e 4N; e excessos [0,12%, 10% e 20%].

Planejamentos Experimentais: utilizou-se o *software* STATISTICA[®] 7.0, para obter as condições ótimas do processo, ou seja, melhor neutralização dos ácidos graxos livres com menor arraste dos tocoferóis e obtenção de maior quantidade de DDOS neutro.

No 1º experimento, o teor de AGL do DDOS bruto foi medido e em seguida a matéria-prima foi neutralizada, com soluções alcalinas sob diferentes condições, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^k (2³ com 4 pontos centrais e todos ensaios em triplicata). As variáveis e níveis utilizados foram embasados nos melhores resultados obtidos no Ensaio Preliminar: Concentração: 2 e 4N; Temperatura: 25 e 50°C; Tempo: 2 e 6 minutos, respectivamente níveis mínimos e máximos.

O 2º experimento foi realizado de acordo com o 1º, entretanto o planejamento foi do tipo estrela (2³ com 4 pontos centrais, 6 pontos axiais e todos ensaios em triplicata). As variáveis e níveis de operação diferiram um ponto a fim de buscar a região de ótimo para as respostas analisadas: Concentração: 3 e 4N; Temperatura: 30 e 44°C; Tempo: 2 e 3 minutos, respectivamente, níveis mínimos e máximos.

As respostas analisadas nos experimentos foram: redução no teor de AGL (%), teor de equivalentes de α -tocoferol (%) e rendimento em peso de DDOS neutro (%). O método para a quantificação do teor de AGL foi o 940.28 (AOAC, 1995); e para o teor de tocoferóis foi por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Ce 8-86 (AOCS, 1998). Sendo que as análises foram realizadas em triplicatas e as médias confrontadas pelo teste de Tukey, considerando diferença significativa $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio preliminar: O álcali que melhor neutralizou o DDOS, com maior liberação de DDOS neutro foi o Na₂CO₃, com excesso de 20%, sendo que em relação à concentração, não houve diferença entre 2 e 4N.

Planejamentos Experimentais: A tabela 1 apresenta os resultados do 1º experimento, onde os melhores resultados para a redução de AGL e teor de equivalentes de α -tocoferol foram para os ensaios 3, 4, 7, 8 e PC, entretanto nestes ensaios o rendimento foi muito inferior aos demais.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no 1º experimento e as respostas estudadas

Ensaio	Concen- tração (N)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Redução de AGL (%)	Equivalentes de α -tocoferol (%)	Rendimento (%)
1	2	25	2	32,6 ^a	1,724 ^a	33,0 ^c
2	4	25	2	34,3 ^c	1,797 ^a	42,5 ^d
3	2	50	2	40,1 ^{de}	2,346 ^{bc}	7,5 ^a
4	4	50	2	41,6 ^f	2,750 ^d	14,7 ^b
5	2	25	6	32,5 ^a	1,685 ^a	36,9 ^{cd}
6	4	25	6	33,4 ^b	1,691 ^a	42,2 ^d
7	2	50	6	39,8 ^{de}	2,416 ^c	12,9 ^{ab}
8	4	50	6	42,6 ^g	2,585 ^{cd}	12,8 ^{ab}
PC	3	37,5	4	40,6 ^e	2,710 ^d	16,9 ^b

* letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Baseado nestes dados elaborou-se o 2º experimento, cujos resultados estão representados na tabela 2. Através dos pontos axiais, foi possível definir melhor a região de ótimo para as respostas, sendo esta região a de valores máximos para todas as variáveis estudadas. Percebeu-se que quanto maior a concentração do álcali, o tempo de agitação e uma temperatura intermediária, melhores foram os resultados obtidos para a redução de AGL e teor de equivalentes de α -tocoferol, variando dentro de uma faixa entre valores máximos e mínimos para rendimento, já que esta resposta em comparação com as demais não apresentava tanto interesse.

Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no 2º experimento e as respostas estudadas

Ensaio	Concen- tração (N)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Redução de AGL (%)	Equivalentes de α -tocoferol (%)	Rendimento (%)
1	3	30	2	49,3 ^a	2,489 ^a	5,2 ^a
2	4	30	2	50,5 ^{bcd}	2,738 ^a	13,4 ^{cde}
3	3	44	2	49,3 ^a	2,151 ^a	7,7 ^{ab}
4	4	44	2	50,2 ^{bc}	2,365 ^a	13,0 ^{cde}
5	3	30	3	49,5 ^a	2,214 ^a	5,5 ^a
6	4	30	3	50,1 ^b	2,515 ^a	14,9 ^e
7	3	44	3	49,7 ^{ab}	2,304 ^a	10,6 ^{bcde}
8	4	44	3	50,8 ^d	2,737 ^a	14,3 ^{de}
9	2,66	37	2' 30"	49,6 ^a	2,285 ^a	7,0 ^a
10	4,34	37	2' 30"	50,8 ^d	2,681 ^a	24,5 ^f
11	3,5	25	2' 30"	49,6 ^a	2,576 ^a	11,6 ^{bcde}
12	3,5	49	2' 30"	49,6 ^a	2,342 ^a	10,4 ^{bcd}
13	3,5	37	1' 40"	49,6 ^a	2,304 ^a	9,2 ^{abc}
14	3,5	37	3' 20"	50,2 ^{bc}	2,367 ^a	13,3 ^{cde}
PC	3,5	37	2' 30"	50,2 ^{bc}	2,304 ^a	12,9 ^{cde}

* letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Através dos experimentos descritos, estabeleceu-se que as melhores condições de neutralização do DDOS são: concentração do Na_2CO_3 de 4,34N, temperatura de 45,8°C e

tempo de homogeneização de 3'20", sendo estas as condições para maior neutralização, com menor arraste de tocoferóis e obtenção de maior quantidade de DDOS neutro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. E. M. **Obtenção de concentrado de tocoferóis à partir do destilado da desodorização do óleo de soja**. Campinas, 2000. 152p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

A.O.A.C. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Edited by P. Cunnif. Virgínia: AOAC International, 1995. v. 1.

A.O.C.S. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**, 5th ed. Champaign: AOCS, 1998.

AUGUSTO, M. M. M. **Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja**. Campinas, 1988. 125p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

FACIOLI, N. L. **Otimização da esterificação da matéria saponificável do destilado de desodorização do óleo de soja**. Campinas, 2001. 209p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

WOERFEL, J. B. Processing and utilization of by-products from soy oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Chicago, v. 58, n. 3, p. 188-191. Mar, 1981.

* Os autores agradecem ao Laboratório de Óleos e Gorduras (DTA/FEA) pela utilização do CLAE

Trabalho Completo Apresentado no XX CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE
ÓLEOS E GORDURAS
SBOG – Florianópolis/SC, Novembro de 2007.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA NEUTRO

Cibelem Iribarrem Benites¹; Francisco Carraro¹; Rosana Nogueira Cavaletti Moreira²;
Soely Maria Pissini Machado Reis¹; Admar Costa de Oliveira¹

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA),
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

² Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA, UNICAMP.

FEA – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, n° 80, C.P. 6121, Campinas/SP, Brasil.

e-mail: bele_benites@yahoo.com.br

RESUMO

A utilização de resíduos e subprodutos da indústria vem crescendo devido à necessidade de adequação das empresas às normas ambientais. Por outro lado, a substituição de insumos artificiais por produtos naturais nas áreas alimentícias e farmacêuticas, vem ganhando forte destaque mundial. Estes fatos fomentam o estudo da utilização do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) como suplemento de tocoferóis, que são compostos extremamente importantes na nutrição humana e animal, por apresentarem atividade vitamínica E e ação antioxidante natural. O DDOS é um subproduto oriundo do processo de refino do óleo de soja, com potencialidade para extração de tocoferóis; entretanto tem sido demonstrado que esta prática não é viável economicamente. Com vistas a atingir tais objetivos, foi realizado um estudo do processo de neutralização e o DDOS neutro foi caracterizado de forma físico-química. Os resultados obtidos foram: teor de tocoferóis totais 10,9% ($\pm 3,0$), com palmítico (14,7%), oléico (24,3%) e linoléico (48,2%) como ácidos graxos predominantes e 1,8% de ácidos graxos livres. Em relação à qualidade lipídica, o índice de peróxido foi 4,8mEq/kg e valor de TBA 11,04 mg MDA/kg. O índice de iodo e de saponificação foram, respectivamente, 114,8 mEq Iodo/g e 130,2 mg KOH/g. O teor de água encontrado foi de 0,81% e de

matéria insaponificável de 35,4%, apresentando densidade igual a 0,9062, cor (CIELAB L*a*b*) 18,65, 33,94, 29,67 e valor calórico de 9,68 Kcal/g. Sendo assim, a utilização do DDOS na forma semi-refinada (neutra) torna-se uma alternativa para o enriquecimento de dietas animais e possivelmente humana.

Palavras-chave: Óleo de soja; subprodutos industriais; suplementação; tocoferóis.

INTRODUÇÃO

Na safra 2006/2007 (1) foram esmagados mensalmente em média 2,4 milhões ton de grãos, produzindo 1,84 milhões ton de farelo bruto e 459,5 mil ton de óleo bruto por mês. Este óleo possui compostos indesejáveis, por isto, para transformá-lo em um produto estável, nutritivo e com sabor agradável é necessário o refino (2-3).

A desodorização, etapa do refino químico, ocorre por arraste de vapor a alta temperatura e pressão. Neste processo, os tocoferóis são concentrados no destilado, tornando-o uma boa fonte de antioxidantes naturais, que podem ser recuperados e concentrados, agregando valor comercial. Entretanto, a produção de compostos com propriedades tecnológicas, nutricionais e/ou terapêuticas na forma de concentrados, exige muitas técnicas de separação e purificação (7), encarecendo os produtos.

A composição do DDOS, especialmente em relação aos tocoferóis, se deve à origem, cultivar, estágio de maturação da semente, qualidade e tipo de refino do óleo, assim como ao gás de arraste, condições de pressão, temperatura, vácuo e do aparelho utilizado na desodorização (8, 9). Conforme estas variações, o preço e a utilização do DDOS diferem, sendo que o interesse no DDOS vem crescendo com a exportação para países que obtêm concentrados destes nutrientes (7). Em geral, o DDOS representa de 0,15 a 0,5% (2, 6) em peso do óleo a ser desodorizado. Estima-se que se obtenha entre 0,1 a 0,3 kg de tocoferóis a cada tonelada de óleo de soja produzido (6), mas o processamento exige técnicas altamente sofisticadas para a separação dos componentes. Portanto, com o óleo produzido (safra 2006/2007), podemos obter no mercado uma média de 91,9 ton de DDOS mensalmente.

Além do aspecto econômico, pesquisas vêm demonstrando que o DDOS tem potencial de utilização e necessita de aprimoramento na sua aplicação. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar quimicamente o DDOS obtido através da neutralização do DDOS bruto.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Através da neutralização do DDOS bruto (10), obteve-se o DDOS neutro. Foram realizadas análises físico-químicas de caracterização:

- **Teor de Tocoferóis:** Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Ce 8-89 (11); Bomba isocrática Perkin Elmer 250; fluxo 1,1 ml/minuto, detector fluorescência: excitação 290nm; emissão 330nm, coluna analítica: MERCK 250X4mm Li Chrosorb Si 60. Fase móvel: 99:1 Hexano/Isopropanol. A identificação dos isômeros foi por comparação dos tempos de retenção dos padrões (α , β , γ e δ -tocoferol) e a quantificação por padronização externa.

- **Composição de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa:** extração de ésteres metílicos de acordo com Hartman & Lago, 1973 com modificações para condições de trabalho (12) e método de injeção Ce 1-62 (11). O cromatógrafo utilizado foi o Gasoso Capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, com coluna capilar: DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane, dimensões: 60m, diâmetro interno de 0,25 mm, 0,25 μ m filme). As condições foram: fluxo coluna 1 mL/min.; velocidade linear = 24 cm/seg; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; temperatura do forno: 110°C – 5 minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 minutos; Gás de arraste: Hélio; Volume injetado: 1 μ L. A identificação foi por comparação dos tempos de retenção dos padrões e a quantificação por padronização externa.

- **Índice de Peróxido:** 965.33 (13); **Valor de TBA** (14); **Ácidos Graxos Livres** – AGL: 940.28 (13); **Índice de Iodo:** Hanus - 920.158 (13); **Índice de Saponificação:** N° de Koettstorfer 920.160 (13); **Teor de água no DDOS:** Karl Fischer Tb 2-64 (11); **Teor de Matéria Insaponificável:** Ca 6a-40 (11); **Análise de Valor Calórico:** feita em calorímetro isoperibol automático (PARR 1261) com bomba de oxigênio (PARR 1108); **Cor:** por transmitância total, através do colorímetro Hunter Lab (modelo Color Quest), programa universal no método CIELAB L*a*b*, utilizando como parâmetros: ângulo de observação de 10°, iluminante D65, luminosidade (L*, 100-branco a 0-preto), índice de vermelho (a* - eixo vermelho/verde) e índice de amarelo (b* - eixo amarelo/azul); e **Densidade:** Cc 10c-95 (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DDOS bruto apresentou teor de AGL de 53,57% ($\pm$ 0,48) e após a neutralização caiu para 1,80% ($\pm$ 0,100), ou seja, foi reduzido em torno de 52%. O DDOS utilizado por Martins *et al.* (5), apresentou teor de AGL 57,8%, ou seja, um pouco mais elevado que os

obtidos neste trabalho. Já o teor de tocoferóis totais é inferior (8,97%), diferindo na proporção dos isômeros α -T (2,91%), β -T (0,14%), γ -T (4,66%) e δ -T (1,25%). Na Tabela 1 constam os teores de cada isômero de tocoferol, sua transformação em equivalentes em α -tocoferol (α -TE) e o teor de tocoferóis totais, sendo que os resultados encontrados não diferem de outros trabalhos (4, 6).

Nota-se na Tabela 2 que dentre os AG que constituem o DDOS bruto e neutro, destacam-se o palmítico, oléico e linoléico, assim como nas análises de Augusto (6), obtendo como AG com maiores teores no DDOS bruto: o palmítico 23,11%, o oléico 19,52% e o linoléico 48,51%. Almeida *et al.* (4), corrobora estes dados, pois o DDOS bruto continha 17,7% de palmítico, 25,2% de oléico e 42,2% de linoléico.

Tabela 1. Teor de dos isômeros de tocoferóis (%), seus equivalentes de α -tocoferol (%) e tocoferóis totais (%) no DDOS bruto e neutro

Amostra	Teor de isômeros (%)						Total (%)	
	α -T	β -T	α -TE	γ -T	α -TE	δ -T	isômeros	α -TE
Bruto	1,28	0,22	0,09	6,59	0,84	2,36	10,439	2,219
DP ($\pm$)	0,018	0,013		0,026		0,040		
Neutro	2,03	0,25	0,10	6,67	0,85	2,03	10,976	2,990
DP ($\pm$)	0,041	0,004		0,277		0,081		

α -T: alfa-tocoferol; β -T: beta-tocoferol; γ -T: gama-tocoferol; δ -T: delta-tocoferol; α -TE: equivalentes de alfa-tocoferol

Tabela 2. Teor de Ácidos Graxos (%) no DDOS bruto e neutro

AG	DDOS Bruto (%)	DDOS Neutro (%)
14:0	0,245	0,208
16:0	17,955	14,673
16:1	0,138	0,153
18:0	6,590	4,167
18:1 t	1,625	0,601
18:1 c	23,567	24,341
18:2 t	0,532	0,723
18:2 c	43,788	48,218
18:3	4,181	4,143
20:0	0,464	0,779
20:1	0,179	0,230
22:0	0,478	0,565
22:1	nd	nd
24:0	0,259	0,249
24:1	nd	nd

Em relação aos índices de oxidação do DDOS bruto e neutro, obteve-se respectivamente IP 7,49 e 4,80 mEq/kg. Os valores de TBA foram 15,98 mg MDA/kg para o DDOS bruto e 11,04 mg MDA/kg para o neutro. Foi evidenciada a diminuição dos produtos da oxidação no DDOS neutro, indicando que estes produtos foram parcialmente separados durante o processo de neutralização. Na literatura não foi encontrado valores de referência para estes índices, mas são dados bem característicos da qualidade no armazenamento do produto.

As principais características físicas e químicas das amostras de DDOS estão descritas na Tabela 3. Almeida *et al.* (4) realizou as análises de densidade, índice de saponificação e resíduo de evaporação, sendo que as 2 primeiras análises corroboram com as realizadas neste trabalho, mas o teor de água é maior, possivelmente devido à metodologia empregada. O valor calórico do DDOS é coerente com o de produtos oleosos (cerca de 9 kcal/g).

Tabela 3. Caracterização físico-química do DDOS bruto e neutro

Análises *	DDOS					
	Bruto			Neutro		
I. de Iodo (mEq Iodo/g)	109,572	(± 1,82)		114,831	(± 4,181)	
I. de Saponificação (mg KOH/g)	159,420	(± 3,70)		130,19	(± 4,620)	
Teor de água (%)	0,762	(± 0,14)		0,810	(± 0,046)	
Matéria Insaponificável (%)	20,064	(± 0,06)		35,415	(± 0,988)	
Valor calórico (Kcal/g)	9,524	(± 0,01)		9,684	(± 0,092)	
Densidade	0,9059	(± 0,002)		0,9062	(± 0,001)	
Cor	L*	a*	b*	L*	a*	b*
	52,46	31,10	77,43	18,65	33,94	29,67

* Médias (± DP)

Quanto ao teor de matéria insaponificável, alguns trabalhos são muito variáveis, de 3,5 a 27,1% (4). No DDOS utilizado neste trabalho, a matéria insaponificável foi 20,06%, o conteúdo de tocoferóis também deve ser maior, já que os tocoferóis são partes integrantes da matéria insaponificável. Este fato é confirmado, pois no DDOS deste trabalho, o teor de tocoferóis totais é de 10,44% e na amostra com maior teor de matéria insaponificável de Almeida *et al.* (4) este teor foi de 8,6%. De acordo com Augusto (6) a caracterização do DDOS bruto apresenta os seguintes resultados: peso específico de 0,9116; índice de peróxidos de 3,40; índice de acidez de 37,09; índice de saponificação

de 159,40; sólidos totais 95,26%, ácidos graxos totais variando entre 58,13 e 60,13%; AGL 37,09%; matéria insaponificável entre 26,1 e 36,46% e tocoferóis totais 8,50%.

Pelo exposto, conclui-se que o processo de neutralização reduziu os AGL (~52%), com leve aumento de tocoferóis totais (~0,5%), sugerindo que o produto possa ser estudado para suplementação alimentar de animais.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Cargill Agrícola S.A., ao Dr. Renato Grimaldi e Laboratórios: Central Analítico (DEPAN-FEA-UNICAMP) e de Óleos e Gorduras (DTA-FEA-UNICAMP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIOVE. Estatística Mensal - Soja e Derivados 2006/2007. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais, <http://www.abiove.com.br>, (accessed Apr. 2007).
2. Woerfel, J. B.; Soybean oil processing by-products and their utilization, in *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, edited by Erickson, AOAC Press, Champaign, 1995, pp. 297-313.
3. De Greyt, W. and Kellens, M. Refining practice, in: *Edible Oil Processing*, edited by Hamm, W. and Hamilton, R. J. Sheffield Academic Press, England, 2000. 281p.
4. Almeida, M. E. M.; Rusig, O. and Guzmán, E. C. Emprego da saponificação com hidróxido de cálcio na extração dos tocoferóis de destilados da desodorização, in: 5° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, 2003. pp. 1623.
5. Martins, P. F.; Batistella, C. B.; Maciel-Filho, R. and Wolf-Maciel, M. R. Comparison of two different strategies for tocopherols enrichment using a molecular distillation process, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45:753-758 (2006).
6. Augusto, M. M. M. Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja. 1988. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – FEA, UNICAMP, Campinas, 1988.
7. Facioli, N. L. Otimização da esterificação da matéria saponificável do destilado de desodorização do óleo de soja. 2001. 209p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – FEA, UNICAMP, Campinas, 2001.
8. Ghosh S. and Bhattacharyya, D.K., Isolation of tocopherol and sterol concentrate from sunflower oil deodorizer distillate, *JAOCS*, 73:1271-1274 (1996).
9. Sonntag, N. O. V., Growth potential for soybean oil products as industrial materials, *JAOCS*, 62:928-933 (1985).

10. Benites, C. I.; Reis, S. M. P. M. and Oliveira, A. C., Avaliação de métodos de neutralização do destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS), in: II Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, 2005. pp. 25-28.
11. A.O.C.S. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society, 5th ed. Champaign: AOCS, 1998.
12. Maia, E. L. Otimização de metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce. 1992. 263p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – FEA, UNICAMP, Campinas, 1992.
13. A.O.A.C. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Edited by P. Cunniff. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1.
14. Sinnhuber, R. O. and Yu, T. C., 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde, *Food Tech.*, 12:9-12, 1958.