



Universidade Federal do Pampa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS URUGUAIANA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEMENTE DE *Linum usitatissimum* L.
EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Cocco Pilar

Uruguaiana, RS, Brasil

2014

BRUNA COCCO PILAR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEMENTE DE *Linum usitatissimum* L. EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini

Uruguaiiana

2014

BRUNA COCCO PILAR

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEMENTE DE *Linum usitatissimum* L. EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção molecular

Dissertação defendida e aprovada em 21 de janeiro de 2014.

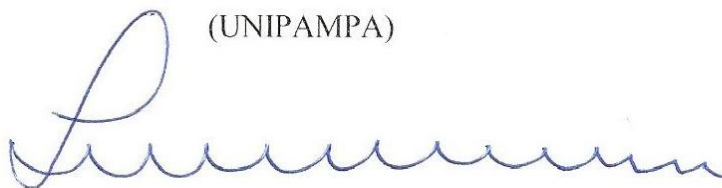
Banca examinadora:



Prof. Dr.ª Vanusa Manfredini

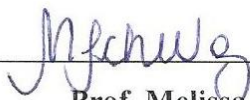
Orientadora

(UNIPAMPA)



Prof. Irina Lubeck

(UNIPAMPA)



Prof. Melissa Shwanz

(UCS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela sabedoria e por me permitir estudar e evoluir intelectualmente!

Aos meus pais, Vera e Vanderlei, pelo alicerce, incentivo, amor e amparo em todos os momentos. Obrigada por sempre me incentivarem a estudar!

Ao meu eterno namorado, Tiago, pelo amor, carinho e apoio. Obrigada pela compreensão nos momentos em que priorizei o trabalho e pelo incentivo para seguir em frente. Te amo!

Ao meu irmão e minha cunhada que, mesmo de longe, sempre me apoiaram.

Aos amigos que, fora do laboratório, me acompanharam neste percurso. Obrigada pelas palavras de incentivo e pelos momentos de descontração.

Agradeço imensamente à UNIPAMPA e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade de estudar sem estar longe de meus familiares queridos.

Um agradecimento mais que especial à minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini que me proporcionou o gosto pela pesquisa e a vontade de seguir estudando. Sem ela eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por todo o apoio, ensinamentos e amizade!

Aos colegas do grupo GESTOX, que me acolheram e colaboraram em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

À Juliana Mezzomo pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório da Santa Casa e pela colaboração na realização dos testes bioquímicos.

À querida Prof^a. Dr^a. Débora Faoro pela revisão do inglês e colaborações para os artigos científicos, muitíssimo obrigada!

À querida Prof^a. Dr^a. Jacqueline Piccoli pela co-orientação e todo o apoio no desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores do PPG-Bioquímica que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A todos os voluntários que se disponibilizaram a contribuir com minha pesquisa, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

À Cerélus Alimentos Integrais por disponibilizar as amostras de linhaça a preços acessíveis e pelas informações pertinentes.

Ao Laboratório de Análise de Metabólitos do HCPA pela disponibilidade na análise das enzimas antioxidantes.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica da UFSM pela realização dos testes fitoquímicos.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Fundação Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEMENTE DE *Linum usitatissimum* L. EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Autora: Bruna Cocco Pilar

Orientadora: Vanusa Manfredini

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 21 de janeiro de 2014

As pessoas tem buscado cada vez mais alimentos funcionais para obtenção de uma dieta mais saudável e equilibrada. Entre esses alimentos, a semente de linhaça tem sido muito estudada devido a sua capacidade de melhorar parâmetros antropométricos, bioquímicos e de estresse oxidativo. Estudos com humanos e animais indicam que o aumento da ingestão de linhaça está inversamente relacionado com os sintomas da Síndrome Metabólica (SM), um distúrbio metabólico multifatorial que vem crescendo rapidamente, tornando-se motivo de grande preocupação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com semente de linhaça dourada durante 28 dias sobre parâmetros pressóricos, antropométricos, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com SM. Para isso, foram selecionados 20 pacientes com SM e 24 voluntários saudáveis (controle), os quais receberam alíquotas de 40g de linhaça dourada para consumo diário durante 28 dias. Coletas de sangue em jejum e medidas antropométricas e pressóricas foram realizadas antes e após o período de suplementação. As análises bioquímicas incluíram perfil lipídico e glicêmico, marcadores cardíacos, renais e parâmetros de estresse oxidativo. Além disso, foi realizada análise fitoquímica da semente de linhaça dourada e análise *in vitro* de sua atividade antioxidante. A análise fitoquímica demonstrou altas concentrações de compostos polifenólicos, além de um alto poder antioxidante *in vitro* da semente de linhaça dourada. As análises séricas demonstraram reduções significativas ($p < 0.05$) no perfil lipídico e glicêmico, nos marcadores cardíacos e renais, bem como no dano oxidativo a lipídios e proteínas. Além disso, foi observada uma melhora significativa ($p < 0.05$) nas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros antropométricos, pressóricos e no dano oxidativo ao DNA. Assim, os resultados sugerem que

a semente de linhaça dourada pode ser utilizada como adjuvante no tratamento de pacientes com SM, uma vez que melhora parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Linhaça, síndrome metabólica, perfil fitoquímico, parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF SEED OF *Linum usitatissimum* L. IN
PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME**

Author: Bruna Cocco Pilar

Advisor: Vanusa Manfredini

Date and Place of Defense : Uruguaiiana, January 21, 2014

People have increasingly sought to obtain functional foods in a more healthy and balanced diet. Among these foods, linseed has been widely studied due to its ability to improve anthropometric, biochemical and oxidative stress parameters. Studies in humans and animals indicate that increased intake of linseed is inversely related to the symptoms of metabolic syndrome (MS), a multifactorial metabolic disorder that is growing rapidly, becoming of great concern. The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation with golden linseed for 28 days on blood pressure, anthropometric, biochemical and oxidative stress parameters in patients with MS. For this, we selected 20 patients with MS and 24 healthy volunteers (control) , which received aliquots of 40g of golden linseed for daily consumption for 28 days. Fasting blood samples and anthropometric and blood pressure parameters were measured before and after the supplementation period . Biochemical analyzes included lipids and glucose, cardiac and renal markers and oxidative stress parameters. Moreover, phytochemical analysis of golden linseed and analysis of its antioxidant activity was evaluated *in vitro*. The results showed high concentrations of polyphenolic compounds, and a high antioxidant capacity *in vitro* of the golden linseed. Serum analyzes showed significant reductions ($p < 0.05$) in lipid and glycemic profiles, in heart and kidney markers and in oxidative damage to lipids and proteins. Furthermore, a significant improvement ($p < 0.05$) in the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses was observed. No significant differences were found in anthropometric parameters, blood pressure and oxidative DNA damage. Thus, the results suggest that the golden linseed can be used as an adjunct in the treatment of patients with MS, as it improves biochemical and oxidative stress parameters.

Keywords: Linseed, metabolic syndrome, phytochemical profile, biochemical parameters, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – <i>Linum usitatissimum</i> L. (linho).	20
Figura 2 – Sementes de linhaça dourada e marrom.	21
Figura 3 – Fontes e respostas celulares a espécies reativas de oxigênio (ERO).	31
Figura 4 – Reações do sistema de defesa antioxidante enzimático.	32

Manuscrito I

Figure 1 – Lipid profile and fasting glucose levels in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed.	57
Figure 2 – Cardiac markers in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed.	58
Figure 3 – Renal function markers in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed.	58

Manuscrito II

Figure 1 – Biomarkers of oxidative damage in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed.	82
Figure 2 – Non-enzymatic antioxidant levels in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed.	82
Figure 3 – Enzymatic antioxidant defenses in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed.	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Componentes da Síndrome Metabólica segundo o NCEP-ATP III.	26

Manuscrito I

Table 1 – Nutritional information of golden linseed used in this protocol.	60
Table 2 – Phytochemical analysis of golden linseed used in this protocol.	61
Table 3 – Anthropometric and pressure parameters of controls and patients before and after supplementation.	62

Manuscrito II

Table 1 – Phytochemical analysis of golden linseed used in this protocol.	85
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AL** – Ácido linoléico
ALA – Ácido α -linolênico
AGL – Ácidos graxos livres
AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados
Asc \cdot - Radical ascorbato tricarbonil
CA – Circunferência abdominal
CAT - Catalase
CCl $_4$ – Tetracloroeto de carbono
CK-MB – Creatino-quinase MB
DCV – Doenças cardiovasculares
DHA – Ácido docohexaenóico
DM – Diabete Mellitus
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DNPH - Dinitrofenilhidrazina
ECA – Enzima conversora de angiotensina
ED – Enterodiol
EL – Enterolactona
EPA – Ácido eicosapentanóico
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FID – Federação Internacional de Diabetes
GLUT 4 – Transportador de glicose tipo 4
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada
GST – Glutaciona-S-transferase
HDL – Lipoproteína de alta densidade
H $_2$ O – Água
H $_2$ O $_2$ – Peróxido de hidrogênio

- HOCl** – Ácido hipocloroso
- I-DBSM** – I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica
- IMC** – Índice de massa corporal
- LDH** – Lactato desidrogenase
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- MDA** – Malondialdeído
- NCEP-ATP III** – *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*
- NO[·]** - Óxido nítrico
- ¹O₂** – Oxigênio singleto
- O₂** – Oxigênio molecular
- O₂^{·-}** - Radical superóxido
- O₃** – Ozônio
- OH[·]** - Radical hidroxila
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- ONOO⁻** - Peroxinitrito
- PAI-1** – Inibidor da ativador de plasminogênio
- PhOH** – Antioxidantes fenólicos
- PhO[·]** - Radical intermediário fenóxi
- RO₂[·]** - Radical peroxil
- ROOH** – Peróxido orgânico
- SDG** – Secoisolariciresinol diglicosídeo
- SECO** – Secoisolariciresinol
- SM** – Síndrome metabólica
- SOD** – Superóxido dismutase
- TBARS** – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- VI-DBH** – VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Alimentos Funcionais.....	19
2.2 Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	19
2.2.1 Origem.....	19
2.2.2 Caracterização.....	20
2.2.3 Composição Nutricional.....	21
2.2.4 Atividades biológicas descritas.....	22
2.3 Síndrome metabólica.....	24
2.3.1 Histórico.....	24
2.3.2 Patogênese.....	24
2.3.3 Critérios para o diagnóstico.....	26
2.3.4 Principais conseqüências clínicas.....	27
2.3.5 Implicações Terapêuticas.....	28
2.4 Radicais Livres.....	29
2.5 Defesas antioxidantes.....	31
2.5.1 Sistema enzimático.....	31
2.5.2 Sistema não-enzimático.....	33
2.6 Dano Oxidativo a Biomoléculas.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Geral.....	36
3.2 Específicos.....	36
4. MANUSCRITO I.....	38
4.1 Abstract.....	41
4.2 Introduction.....	42
4.3 Materials and Methods.....	43
4.4 Results.....	48
4.5 Discussion.....	49
4.6 Conclusions.....	52
4.7 References.....	52
5. MANUSCRITO II.....	63
5.1 Abstract.....	66

5.2 Introduction	67
5.3 Materials and Methods	68
5.4 Results	72
5.5 Discussion.....	73
5.6 Conclusion.....	76
5.7 References	76
6. CONCLUSÕES	86
7. PERSPECTIVAS	87
8. REFERÊNCIAS	88
9. ANEXOS	94
9.1 Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAMPA.....	94
9.2 Trabalhos apresentados referentes a esta dissertação	98

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, o **REFERENCIAL TEÓRICO** e os **OBJETIVOS**. As seções **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** e as respectivas **REFERÊNCIAS** estão apresentadas sob a forma de manuscritos, os quais encontram-se nos itens **MANUSCRITO I** e **MANUSCRITO II**, compondo a **parte II** deste trabalho e representando a íntegra deste estudo. As seções **CONCLUSÃO**, **PERSPECTIVAS** e **REFERÊNCIAS** encontram-se na **parte III** desta dissertação, sendo que as referências referem-se somente às citações utilizadas na introdução e referencial teórico desta dissertação. As perspectivas correspondem aos possíveis estudos que podem ser realizados para dar continuidade a este trabalho.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

A população mundial vem demonstrando uma crescente preocupação com a alimentação e seus constituintes (LIMA, 2008), assim como rotineiramente surgem pesquisas demonstrando que o consumo de determinados alimentos podem prevenir ou tratar patologias (MARQUES, 2008). Estes alimentos são denominados alimentos funcionais e, em sua maioria, apresentam compostos como ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), fibras dietéticas, vitamina C e polifenóis, os quais são bastante conhecidos por reduzir lipídios e açúcares sanguíneos além de apresentarem atividade antioxidante (ANWAR & PRZYBYLSKI, 2012).

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é um alimento funcional que tem sido muito estudado devido a sua capacidade de reduzir os lipídios sanguíneos e produzir efeitos antioxidantes, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (DCV) (PAN et al., 2009; ZANWAR et al., 2011). Entre os constituintes nutricionais deste alimento, podemos destacar seu elevado teor de AGPI (principalmente ácido α -linolênico - ALA), proteína vegetal, fibras solúveis, ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas (LIMA, 2008; TAYLOR et al., 2010; PACHECO et al., 2011). Dentre estes compostos ativos, muitos estudos tem destacado o uso do ALA para prevenir obstruções arteriais, causadoras de doenças cardíacas, além de reduzir o estresse oxidativo (MONEGO, 2009). As lignanas vegetais, que estão altamente concentradas na linhaça, especialmente o secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG), também tem sido muito estudadas, demonstrando efeitos na redução do colesterol sanguíneo e nos marcadores cardíacos (ZHANG et al., 2008; ZANWAR et al., 2011). Já as fibras solúveis tem demonstrado auxiliar na manutenção dos níveis de glicose e na redução dos níveis de colesterol sérico (MONEGO, 2009).

Um dos principais efeitos da semente de linhaça é sua capacidade de reduzir o dano oxidativo a biomoléculas (MONIEM et al., 2010; RHEE & BRUNT, 2011). Este dano oxidativo é consequência de uma perturbação na homeostase celular, resultando no aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), o que acaba por conduzir à morte celular. Os sistemas de defesa antioxidantes endógenos da célula neutralizam competitivamente o dano oxidativo. No entanto, se as espécies reativas de oxigênio (ERO) superam o mecanismo de defesa celular endógeno, é necessária a

suplementação com antioxidantes externos, presentes nos alimentos funcionais, como a linhaça (SISODIA et al, 2012).

Estas ERO tem fortes associações com muitos distúrbios, como síndrome metabólica (SM), Diabete Mellitus (DM) e DCV. Dentre estes distúrbios, a SM é um transtorno multifatorial que vem crescendo rapidamente, tornando-se motivo de grande preocupação (AMIR et al., 2012). Esta síndrome é caracterizada por indivíduos que atendam a pelo menos três dos seguintes critérios: circunferência abdominal (CA) aumentada, hipertensão arterial sistêmica, glicemia de jejum e triglicerídeos elevados e redução nos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) (BARRE, 2007). O tratamento da SM é complexo e inclui tanto mudanças no estilo de vida quanto tratamento medicamentoso (GRUNDY et al., 2004). No entanto, estudos com humanos e animais indicam que o aumento da ingestão dietética de linhaça ou de suas lignanas isoladas está inversamente relacionado com a presença dos sintomas da SM (ZHANG et al., 2008; MOLENA-FERNANDES et al., 2010; MONIEM et al., 2010; RHEE & BRUNT, 2011; ZANWAR et al., 2011).

Assim, considerando que a linhaça é um alimento funcional e traz benefícios à saúde humana, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com semente de linhaça dourada em pacientes com SM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos Funcionais

Nas últimas décadas, as exigências dos consumidores em relação aos alimentos mudaram consideravelmente. A população acredita cada vez mais que os alimentos contribuam diretamente para a sua saúde. E hoje, realmente, os alimentos não são destinados apenas para saciar a fome e fornecer os nutrientes necessários para os seres humanos, mas também para prevenir doenças relacionadas com a nutrição e melhorar o bem-estar físico e mental dos consumidores (SIRÓ et al., 2008). Estes alimentos que, além de proporcionarem nutrientes essenciais à vida e à manutenção do estado nutricional, possuem benefícios funcionais e de saúde são chamados de alimentos funcionais (CASÉ, 2005).

O termo "alimento funcional" em si foi usado pela primeira vez no Japão, na década de 1980, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (MORAES & COLLA, 2006). A partir de então, tem-se observado uma crescente busca por tais alimentos, o que pode ser explicado pelo aumento do custo dos cuidados de saúde, o aumento constante da expectativa de vida e o desejo das pessoas mais velhas para a melhoria da qualidade de seus últimos anos (SIRÓ et al., 2008).

Os principais alimentos incluídos neste grupo são os de origem vegetal, como frutas, vegetais e grãos integrais, assim como os alimentos marinhos e seus ácidos graxos de cadeia longa (SHAHIDI, 2009).

2.2 Linhaça (*Linum usitatissimum* L.)

2.2.1 Origem

Os relatos mais antigos da semente de linhaça são datados de 5000 anos antes de Cristo, na Mesopotâmia. Mesmo sendo originária da Ásia, seus benefícios foram difundidos pelo mundo todo, sendo seu consumo muito comum na América do Norte e em países europeus (MONEGO, 2009). Atualmente, o maior produtor mundial é o Canadá. Na América do Sul, a maior produção ocorre na Argentina e no Brasil. Neste, o destaque está no estado do Rio Grande do Sul, onde o grão é cultivado em Ijuí, Tupanciretã, São Miguel das Missões, São

Luiz Gonzaga, Giruá, Santa Rosa, Guarani das Missões, Três de Maio, Panambi, Santa Bárbara do Sul, Santo Augusto e proximidades (MARQUES, 2008).

2.2.2 Caracterização

O linho é uma planta pertencente à família Linaceae (MORRIS, 2007), caracterizada por apresentar uma altura de 30 a 130 cm, talos eretos, folhas estreitas lineares ou lanceoladas, alternando entre verde e verde claro, além de flores com pétalas azuis (MARQUES, 2008) (Figura 1). Da casca da planta é retirada a fibra do linho, matéria-prima para a fabricação de tecidos, e da cápsula se obtém a semente, chamada de linhaça (GILL e YERMANOS, 1967).



Figura 1 – *Linum usitatissimum* L. (linho). Disponível em <http://floresdoareal.blogspot.com.br/2011/10/linum-usitatissimum-subsp-angustifolium.html>, acessado em 10/12/2013.

A semente de linhaça é plana e oval com uma extremidade afunilada. É um pouco maior do que a semente de gergelim, tendo entre 4 e 6 mm. A cor das sementes pode variar do marrom escuro para o dourado, sendo esta cor determinada pela quantidade de pigmento na camada exterior da semente (Figura 2). A cor da semente pode ser facilmente modificada através de técnicas simples de cultivo (MORRIS, 2007). A linhaça dourada desenvolve-se em climas muito frios, como no Canadá e norte dos Estados Unidos, e a linhaça marrom pode desenvolver-se em regiões de clima quente e úmido, como é o caso do Brasil (MOLENA-

FERNANDES, 2010). Até 2005, o Brasil produzia somente a variedade marrom, mas, no final de 2006, ocorreu a primeira colheita da variedade dourada (TRUCOM, 2006).



Figura 2 – Sementes de linhaça dourada e marrom. Disponível em <http://querosaude.com.br/linhaça-dourada-ou-marrom/>, acessado em 10/12/2013.

2.2.3 Composição Nutricional

A semente de linhaça é reconhecidamente um alimento funcional, pois além de conter nutrientes também apresenta substâncias bioativas capazes de prevenir problemas de saúde e tratar distúrbios já existentes (TRUCOM, 2006). A composição da linhaça é caracterizada por um alto teor de proteína vegetal, fibras solúveis, AGPI, ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas (LIMA, 2008; TAYLOR et al., 2010; PACHECO et al., 2011).

O conteúdo de proteínas oscila na semente seca, entre 21 e 26%, se destacando não só pela quantidade, mas pela qualidade, pois a linhaça é rica e equilibrada em três aminoácidos diretamente ligados ao desempenho físico e atlético: valina, leucina e isoleucina. As principais proteínas encontradas são a albumina e a globulina, correspondendo a cerca de 20 a 42% do teor protéico total da linhaça (TRUCOM, 2006). Além da qualidade nutricional, essas proteínas apresentam boa absorção de água e óleo, atividade emulsionante e estabilidade (MONEGO, 2009).

As fibras alimentares presentes da linhaça correspondem a 28% do seu peso seco, sendo que um terço (6 a 11% da semente seca) é fibra solúvel, que está ligada à melhoria da sensibilidade à insulina, redução do colesterol e do risco de DCV (BLOEDON et al., 2008).

Além disso, tanto as fibras solúveis quanto as insolúveis retardam o tempo de trânsito intestinal e aumentam o volume das evacuações, auxiliando no tratamento da obesidade (TRUCOM, 2006).

A semente de linhaça também é rica em ácidos graxos essenciais, apresentando elevado teor de lipídios (32 a 38%), sendo que 50 a 55% destes lipídios correspondem ao conteúdo do ácido graxo insaturado ALA, pertencente à família ômega-3. Contém também ácido linoléico (AL) (família ômega-6) e ácidos graxos monoinsaturados e saturados (GALVÃO et al., 2008). O ALA, entre suas diversas funções biológicas, é usado como fonte energética e matéria-prima do tecido nervoso e de substâncias que regulam a pressão arterial / frequência cardíaca, a coagulação, a dilatação vascular e a lipólise. Tanto o ALA quanto o AL podem ser metabolizados a ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), os quais são transformados em prostaglandinas e leucotrienos, apresentando atividades imunomoduladoras (MARQUES, 2008).

Além disso, a semente de linhaça é rica em compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas. Os principais ácidos fenólicos presentes na linhaça são os ácidos cafeico, gálico e clorogênico (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000), os quais apresentam atividade antisséptica, anticarcinogênica e antioxidante (VIZZOTTO et al., 2010). Os flavonoides são um grupo amplamente distribuído de metabólitos secundários de plantas que tem atraído interesse como potenciais antioxidantes naturais, tanto por inibir a deterioração oxidativa de alimentos quanto por provocar efeitos metabólicos benéficos em animais (OOMAH et al., 1996). A linhaça contém cerca de 35-70 mg de flavonoides / 100g de semente (TRUCOM, 2006).

Apesar da alta quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides, os principais compostos fenólicos presentes na linhaça são as lignanas, em especial o SDG. O SDG é uma lignana vegetal que se converte nas lignanas mamíferas secoisolariciresinol (SECO), enterodiol (ED) e enterolactona (EL) através das bactérias do cólon de humanos e outros animais (CUPERSMID, 2012). Tem sido sugerido que o SDG apresenta atividade antioxidante, antitumoral, antiviral, bactericida, inseticida, fungistática, estrogênica e antiestrogênica, além de proteger contra doenças coronárias (SMEDS et al., 2007).

2.2.4 Atividades biológicas

Nos últimos anos, a linhaça e seus componentes isolados tem sido amplamente estudados com o objetivo de elucidar suas principais atividades biológicas e os mecanismos

envolvidos. A fim de avaliar o efeito antioxidante da semente de linhaça, Rajesha e colaboradores, em 2006, avaliaram o efeito do pré-tratamento com 0,75 e 1,5 g / kg de linhaça, durante 14 dias, sobre a toxicidade do tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos. A linhaça foi capaz de prevenir a redução na atividade das enzimas antioxidantes provocada pela toxina.

Em 2008, Zhang e colaboradores demonstraram que o tratamento com 600 mg / dia de SDG, durante 8 semanas, reduziu os níveis de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e glicemia de jejum em indivíduos hipercolesterolêmicos. Este estudo também demonstrou um aumento nos níveis de SECO, ED e EL, constatando uma correlação negativa entre esses metabólitos e os níveis de colesterol plasmático.

Em 2010, Molena-Fernandes e colaboradores avaliaram o efeito das farinhas de linhaça marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar, demonstrando que ambas as variedades promoveram redução significativa nos níveis de triglicerídeos séricos e na razão colesterol total / colesterol HDL após 35 dias de suplementação.

No mesmo ano, Moniem e colaboradores avaliaram o efeito do óleo de linhaça na proteção contra o estresse oxidativo induzido por chumbo em ratos albinos, demonstrando proteção contra a peroxidação lipídica e o dano ao DNA, além de promover aumento nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase (GR), glutathiona-S-transferase (GST) e glutathiona peroxidase (GPx).

Em 2011, Couto e Wichmann demonstraram que a suplementação com 20 g de linhaça triturada durante 60 dias foi eficaz na redução do índice de massa corporal (IMC) e da CA de mulheres com IMC superior a 25 mg / kg², além de reduzir os níveis de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos.

Zanwar e colaboradores, também em 2011, avaliaram a atividade cardioprotetora de um complexo de lignanas isolado da linhaça em um modelo de cardiotoxicidade induzida pela isoprenalina em ratos. Os resultados demonstraram efeito cardioprotetor do complexo através da redução dos níveis de marcadores cardíacos séricos, o que foi confirmado pelos achados histológicos.

Ainda em 2011, Abdel-Moneim e colaboradores demonstraram que o óleo de linhaça foi eficiente na proteção contra o dano renal induzido por acetato de chumbo em ratos albinos. Tal proteção foi demonstrada pela melhora na estrutura histológica do rim, assim como pela redução nos níveis de creatinina, uréia, ácido úrico, peroxidação lipídica e produção de óxido

nítrico, com concomitante elevação na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GR, GST e GPx.

No mesmo ano, Rhee & Brunt demonstraram que a suplementação com 40 g diárias de semente de linhaça, durante 12 semanas, reduziu a peroxidação lipídica e a resistência à insulina de indivíduos obesos intolerantes à glicose.

2.3 Síndrome metabólica

2.3.1 Histórico

A síndrome metabólica (SM), já conhecida como síndrome da resistência à insulina, síndrome X, síndrome plurimetabólica ou quarteto mortal, corresponde a um distúrbio metabólico complexo conhecido a pelo menos 90 anos (SANTOS et al., 2006). Este conjunto de distúrbios metabólicos foi descrito pela primeira vez em 1923 por Kylin, um médico sueco, como o agrupamento de hipertensão, hiperglicemia e gota (KYLIN, 1923). Em 1947, Vague chamou a atenção para a adiposidade corporal superior como o fenótipo de obesidade que era comumente associada a alterações metabólicas associadas com DM e DCV. Em 1988, Reaven observou que vários fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia comumente se agrupavam. A este agrupamento ele chamou de síndrome X e a reconheceu como um fator de risco para DCV.

Posteriormente, várias outras anormalidades metabólicas foram associadas a essa síndrome, incluindo obesidade, microalbuminúria e anormalidades na fibrinólise e coagulação, passando a ser chamada predominantemente de síndrome metabólica (BJÖRNTORP, 1992; MYKKÄNEN et al., 1998; YUDKIN, 1999). Desde que a SM foi descrita por Reaven em 1988, uma série de definições foram publicadas por organizações, incluindo o *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), a Federação Internacional de Diabetes (FID) e a Organização Mundial da Saúde (OMS).

2.3.2 Patogênese

A SM parece ter três possíveis categorias etiológicas: obesidade e distúrbios do tecido adiposo, resistência à insulina e uma série de fatores independentes, como moléculas hepáticas, vasculares e de origem imunológica, que medeiam componentes específicos da

SM. Outros fatores como envelhecimento, estado pró-inflamatório e alterações hormonais também têm sido implicados como contribuintes (GRUNDY et al., 2004).

O NCEP-ATP III considera a obesidade como a principal responsável pelo aumento da prevalência de SM. A obesidade contribui para a hipertensão, níveis elevados de colesterol sérico, níveis baixos de colesterol HDL e hiperglicemia, estando, dessa forma, associada com maior risco de DCV. A obesidade abdominal, especialmente, se correlaciona com fatores de risco metabólicos (NCEP-ATP III, 2001). Depósitos viscerais de gordura possuem *turnover* mais acelerado que em outras regiões, elevando as concentrações do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), citocinas inflamatórias e ácidos graxos livres (AGL) no sistema porta. A maior liberação de AGL do tecido adiposo estimula a gliconeogênese, inibe a depuração hepática de insulina e provoca acúmulo de triglicerídeos no fígado e músculo, resultando em hiperglicemia e consequente hiperinsulinemia. Assim, o acúmulo de gordura no músculo leva à resistência insulínica, enquanto no fígado, promove a dislipidemia aterogênica (SANTOS et al., 2006). Níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) que acompanham a obesidade podem significar excesso de citocinas e um estado pró-inflamatório. Um elevado PAI-1 contribui para um estado pró-trombótico, enquanto que baixos níveis de adiponectina estão relacionados com a piora dos fatores de risco metabólicos (GRUNDY et al., 2004).

Uma segunda categoria etiológica é a resistência à insulina, que está intimamente ligada à obesidade. Quando o músculo insulino-resistente já está sobrecarregado com níveis elevados de lipídeos devido aos altos níveis de AGL plasmáticos, algum excesso de AGL será desviado para o fígado, levando ao desenvolvimento de fígado graxo e dislipidemia aterogênica. A resistência à insulina no músculo predispõe a intolerância à glicose, que pode ser agravada pelo aumento da gliconeogênese no fígado insulino-resistente, como já mencionado. Finalmente, a resistência à insulina pode aumentar a pressão sanguínea através de uma variedade de mecanismos (GRUNDY et al., 2004). Esta resistência insulínica pode decorrer de diversos fatores, como defeitos na secreção e/ou ação da insulina por menor número de receptores ou menor afinidade desses, redução na quantidade do transportador de glicose tipo 4 (GLUT 4) ou na translocação do GLUT 4 para a membrana, sendo este último considerado como o fator mais importante (SANTOS et al., 2006).

Outros fatores incluem os fatores genéticos, que alteram a resposta à obesidade, resistência à insulina e hipertensão arterial, o avanço da idade, que afeta provavelmente todos os níveis da patogênese, o estado pró-inflamatório, que tem sido diretamente implicado na causa da resistência à insulina e da aterogênese, além de vários fatores endócrinos que têm

sido associados à alteração na distribuição de gordura corporal e, portanto, indiretamente, na SM (GRUNDY et al., 2004).

2.3.3 Critérios para o diagnóstico

Conforme o conhecimento acerca da SM foi crescendo, vários grupos de especialistas tentaram criar critérios diagnósticos. A primeira tentativa foi realizada por um grupo de diabetes da OMS, em 2000, que propôs uma definição que foi modificada à medida que mais informações se tornaram disponíveis (ALBERTI et al., 2005). Este critério teve a resistência à insulina e a intolerância à glicose como componentes essenciais, juntamente com, pelo menos, outros dois fatores: aumento da pressão arterial, hipertrigliceridemia e / ou HDL reduzido, obesidade (medida pela relação cintura-quadril e IMC) e microalbuminúria (WHO, 2000).

Uma nova abordagem veio do NCEP-ATP III em 2001, com foco no risco de DCV. O objetivo específico era facilitar o diagnóstico clínico de indivíduos de alto risco. Essa definição é menos glicocêntrica que a da OMS e requer a presença de três dos cinco componentes: obesidade central, hipertensão arterial, triglicerídeos elevados, colesterol HDL reduzido e hiperglicemia de jejum (Tabela 1). Segundo Lorenzo e colaboradores (2003), a definição do NCEP detecta maior número de indivíduos em risco de DM que a definição da OMS.

Tabela 1 - Componentes da Síndrome Metabólica segundo o NCEP-ATP III.

Componentes	Níveis
Obesidade abdominal por meio da CA	
Homens	> 102cm
Mulheres	> 88cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
HDL colesterol	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130mmHg ou ≥ 85mmHg
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL

Adaptado de I-DBSM, 2005.

Em 2004, um grupo de especialistas foi convocado pela FID para tentar estabelecer uma definição unificada para a SM e para destacar as áreas onde é necessária mais investigação sobre a síndrome. Uma questão importante abordada pela FID foi o fato de que os critérios utilizados para a obesidade em populações asiáticas, por exemplo, podem ser diferentes daqueles usados no ocidente, devido a diferenças étnicas (ECKEL et al., 2005).

A I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM) recomenda o uso da definição NCEP-ATP III no Brasil, devido à sua simplicidade e praticidade (I-DBSM, 2005).

2.3.4 Principais consequências clínicas

Apesar das diferentes definições discordarem em alguns aspectos relacionados à SM, todas concordam que a mesma está associada a um maior risco de desenvolvimento de DM e DCV (ECKEL et al., 2005).

Um estudo realizado por Isomaa e colaboradores, em 2001, demonstrou que 78-84% dos indivíduos estudados que tinham DM, apresentavam SM de acordo com os critérios da OMS. Este mesmo estudo demonstrou que o risco para doença coronariana e acidente vascular cerebral foi aumentado três vezes em indivíduos com a síndrome. Além disso, a mortalidade cardiovascular foi significativamente aumentada nestes indivíduos.

Em 2002, Hanson e colaboradores avaliaram a associação entre os fatores da SM, diagnosticada de acordo com os critérios da OMS, e a incidência de DM. O estudo avaliou a relação do DM com quatro fatores individuais da SM: insulinemia, IMC, pressão arterial e metabolismo lipídico. A insulinemia foi o fator mais fortemente associado ao desenvolvimento de DM, seguido pelo IMC e metabolismo lipídico. No entanto, estes quatro fatores demonstraram diferentes associações com a incidência de DM, sugerindo que as correlações entre essas variáveis refletem processos metabólicos distintos, sendo difícil tentar combiná-los em um único fator.

Em 2010, Mottillo e colaboradores realizaram uma revisão sistemática e uma meta-análise do risco cardiovascular associado à SM, conforme definida pelo NCEP. Este estudo demonstrou que a SM está associada com um aumento de 2 vezes nas DCV e um aumento de 1,5 vezes em todas as causas de mortalidade.

Além de DCV e DM, os indivíduos com SM parecem ser suscetíveis a outras condições, como síndrome dos ovários policísticos, fígado graxo, cálculos biliares, asma, distúrbios do sono e algumas formas de câncer (GRUNDY et al., 2004).

2.3.5 Implicações Terapêuticas

O tratamento da SM inclui tanto mudanças no estilo de vida quanto tratamento medicamentoso. Mesmo que a SM pareça ser mais comum em pessoas geneticamente suscetíveis, fatores de risco subjacentes adquiridos, como sedentarismo, obesidade e dieta aterogênica, comumente provocam manifestações clínicas. Assim, o tratamento clínico deve primeiro focar na gestão destes fatores de risco subjacentes, independente do risco genético de cada indivíduo (ECKEL et al., 2005).

O NCEP-ATP III recomenda que a obesidade seja o principal alvo de intervenção para a SM (NCEP-ATP III, 2001). A terapia de primeira linha deve ser a redução de peso, através de uma alimentação saudável reforçada com o aumento da atividade física. A perda de peso reduz o colesterol e os triglicérides séricos, aumenta o colesterol HDL, reduz a pressão arterial, a glicemia e a resistência à insulina. Dados recentes mostram ainda que a redução de peso pode diminuir também os níveis séricos de PCR e PAI-1 (GRUNDY et al., 2004).

Se as mudanças no estilo de vida não forem suficientes, os alvos terapêuticos passam a ser os fatores de risco metabólicos específicos. A obesidade pode ser tratada com medicamentos como dietilpropiona, femproporex, mazindol, sibutramina e orlistat para pacientes com $IMC \geq 30 \text{ kg / m}^2$ ou através de procedimento cirúrgico no caso de pacientes com obesidade mórbida ($IMC > 40 \text{ kg / m}^2$) (I-DBSM, 2005). O tratamento da dislipidemia aterogênica pode ser realizado com o uso de estatinas ou fibratos, sendo que ambos são capazes de reduzir o risco de DCV. A hipertensão arterial deve ser controlada com o uso dos medicamentos anti-hipertensivos recomendados pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (VI-DBH) (GRUNDY et al., 2004), tais como os diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), antagonistas do receptor AT1 da angiotensina II e antagonistas do canal de cálcio, sendo que o recomendado é a utilização da associação de fármacos (VI-DBH, 2010). Em relação ao estado pró-trombótico não há medicamentos disponíveis que tenham como alvo o PAI-1 e o fibrinogênio, porém uma abordagem alternativa é a terapia antiplaquetária, como, por exemplo, uma baixa dose de ácido acetilsalicílico. Quando o DM está presente deve ser feita terapia com hipoglicemiantes, tais como metformina e tiazolidinedionas (GRUNDY et al., 2004).

Além das mudanças no estilo de vida e do tratamento medicamentoso, alguns estudos demonstram efeitos benéficos de alimentos funcionais como adjuvantes no tratamento da SM (WU et al., 2010; BLAND, 2011; KHAN et al., 2013). De acordo com Bland (2011), os principais componentes responsáveis por esses efeitos benéficos são os compostos fitoquímicos presentes nestes alimentos. Especificamente, alguns compostos podem diferencialmente modular o perfil da expressão gênica pós-prandial em pessoas com SM e ajudar a normalizar as funções metabólicas perturbadas associadas a esta condição. Além disso, estudos tem demonstrado que a ingestão dietética de ácidos graxos ômega-3 presentes em muitos destes alimentos também diminui o risco de doenças cardíacas. Os dados obtidos a partir de vários ensaios indicam que a suplementação dietética com esses ácidos graxos reduz significativamente o risco de síndromes como doenças cardíacas coronárias e insuficiência cardíaca súbita (KHAN et al., 2013). Por fim, a presença de compostos com atividade antioxidante nestes alimentos funcionais tem demonstrado ter relação direta com a redução dos fatores de risco associados à SM, visto que o estresse oxidativo é um fator de destaque na fisiopatologia desta patologia (SANTOS et al., 2006).

2.4 Radicais Livres

No final de 1950, os radicais livres eram praticamente inéditos nas ciências clínicas e biológicas. Em um trabalho pioneiro, em 1954, os efeitos tóxicos de níveis elevados de oxigênio em aeróbios foram relacionados aos da radiação ionizante, e foi proposto que a toxicidade do oxigênio era devido à formação de radicais livres. No entanto, este conceito não despertou o interesse da maioria dos cientistas, até a descoberta da enzima SOD em 1968. A partir daí iniciaram-se uma série de estudos para compreender melhor o papel dessas substâncias (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Por definição, os radicais livres são espécies químicas oxidantes caracterizadas por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados e geralmente apresentam alta instabilidade, embora as suas reatividades possam variar (ARUOMA, 1998). Os radicais livres incluem as ERO e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), sendo que as ERO são as mais importantes (VALKO et al., 2006).

Os radicais livres de importância nos organismos vivos incluem a hidroxila (OH^\bullet), o superóxido (O_2^\bullet), o óxido nítrico (NO^\bullet) e o peroxil (RO_2^\bullet). O peroxinitrito (ONOO^\bullet), o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o ozônio

(O₃) não são radicais, mas podem facilmente levar a reações de radicais livres nos organismos vivos. Assim, o termo "ERO" é frequentemente usado para incluir não só os radicais OH[•], O₂^{•-}, NO[•] e RO₂[•], mas também os não radicais HOCl, H₂O₂, ¹O₂ e O₃ (ARUOMA, 1998).

Os oxidantes podem ser gerados como resultado do metabolismo intracelular normal nas mitocôndrias e nos peroxissomas, a partir de uma variedade de sistemas de enzimas citosólicas ou a partir da ação de alguns agentes externos. A diminuição dos níveis de ERO abaixo do ponto de ajuste homeostático pode interromper o papel fisiológico dos oxidantes na proliferação celular e na defesa do hospedeiro (FINKEL & HOLBROOK, 2000). Por outro lado, o aumento de ERO também pode ser prejudicial, causando dano em estruturas celulares, tais como lipídios de membranas, proteínas e ácidos nucleicos, o que pode conduzir à morte celular, aceleração do envelhecimento e desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (VALKO, 2006). Além destes efeitos, um aumento nos níveis de ERO também pode constituir um sinal que ativa as vias de sinalização redox específicas, que podem ter tanto funções prejudiciais quanto protetoras no organismo (Figura 3) (FINKEL & HOLBROOK, 2000).

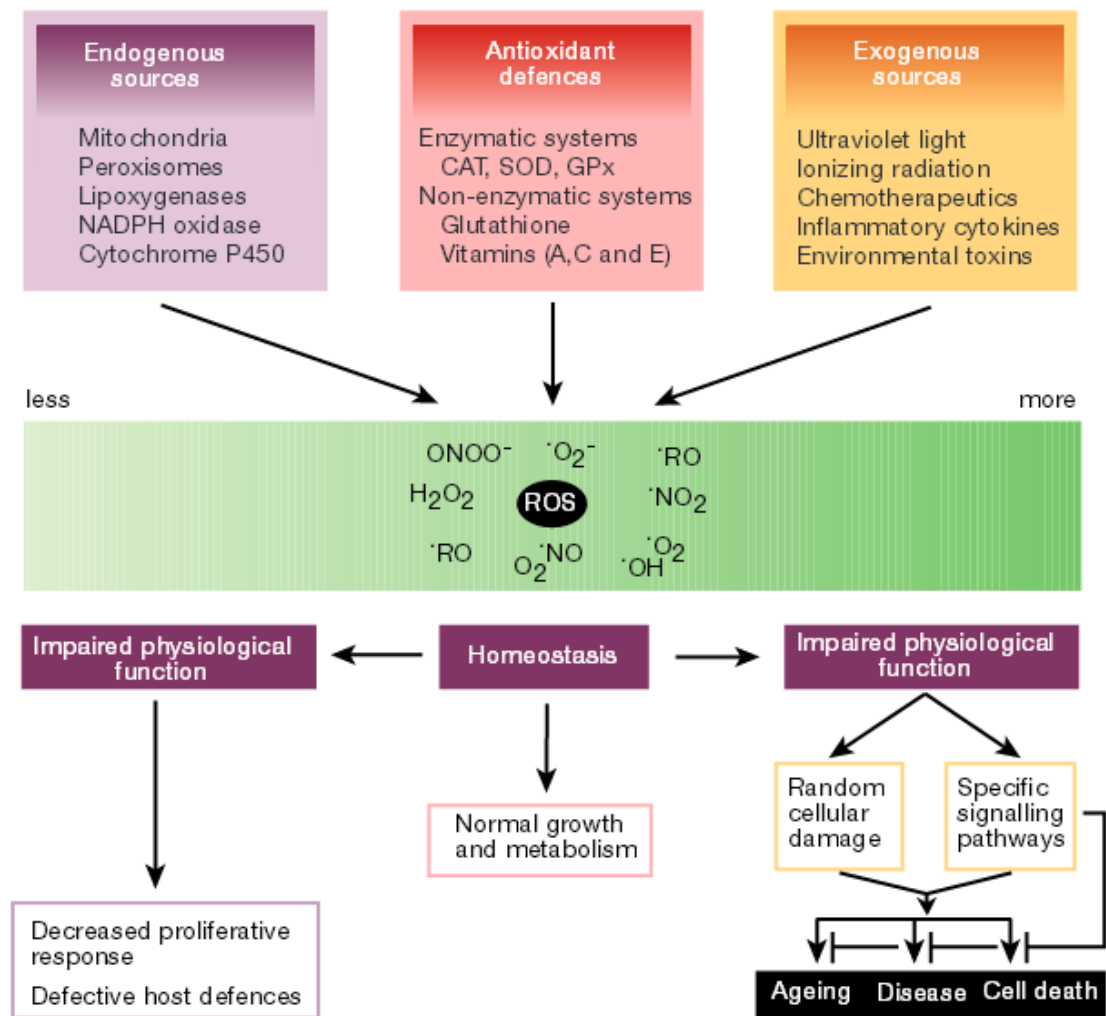


Figura 3 - Fontes e respostas celulares a espécies reativas de oxigênio (ERO). Adaptado de Finkel e Holbrook, 2000.

2.5 Defesas antioxidantes

Nosso organismo possui sistemas de defesa antioxidante endógenos, que neutralizam competitivamente o dano oxidativo. Segundo Halliwell & Gutteridge (2007), um antioxidante é qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações em comparação com a de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação do referido substrato. Esta definição inclui tanto compostos de caráter enzimático quanto não-enzimático.

2.5.1 Sistema enzimático

Todas as células do organismo humano contêm enzimas antioxidantes eficientes. As três principais enzimas antioxidantes são a SOD, a CAT e a GPx. Além disso, há inúmeras

outras enzimas antioxidantes especializadas que reagem e, em geral, desintoxicam compostos oxidantes (SIES, 1997).

A SOD tem um papel central na desintoxicação das ERO, representando a primeira linha de defesa na eliminação do ânion $O_2^{\cdot-}$ através da catalização de sua dismutação a H_2O_2 e O_2 (Figura 4) (BATINIC-HABERLE et al., 2010; TANNO et al., 2010). Existem três tipos distintos de SOD encontradas em células humanas: duas citosólicas (Cu/Zn-SOD) e uma mitocondrial (Mn-SOD) (MONTAGNER et al., 2010).

A CAT é uma heme proteína citoplasmática bem conhecida por catalisar a eliminação do H_2O_2 formado após a dismutação do ânion $O_2^{\cdot-}$ pela SOD (Figura 4). Essa enzima é capaz de transformar milhões de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 a cada segundo, sem formar radicais livres. A atividade da CAT é bastante alta no fígado e nos eritrócitos, relativamente alta nos rins e no tecido adiposo, intermediária nos pulmões e no pâncreas e muito baixa no coração e no cérebro (GOYAL & BASAK, 2010).

A GPx é uma selenoenzima capaz de reduzir uma grande variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos a H_2O e álcool, utilizando-se de GSH que atua como doadora de elétrons e é convertida a glutatona oxidada (GSSG) (Figura 4) (MASELLA et al., 2005; VANCINI et al., 2012).

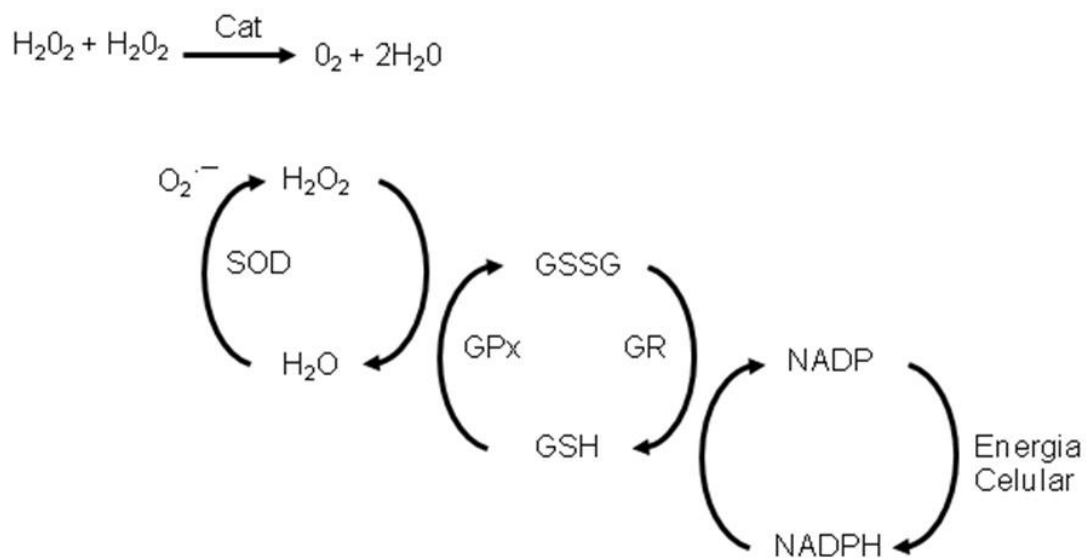


Figura 4 - Reações do sistema de defesa antioxidante enzimático. Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.

2.5.2 Sistema não-enzimático

Os antioxidantes não-enzimáticos envolvem um grupo de compostos que podem ser produzidos *in vivo*, como é o caso da GSH, e outro grupo obtidos diretamente da dieta, tais como a vitamina C, a Vitamina E e os compostos polifenólicos (VASCONCELOS et al., 2007).

A GSH é um tripeptídeo amplamente distribuído em células de mamíferos e é o maior contribuinte para o estado redox da célula. Ela é o principal tiol não proteico em células humanas, sendo particularmente importante por sua capacidade de reagir com ERO, direta ou indiretamente, através de reações catalisadas enzimaticamente. Tipicamente, o produto das reações da GSH com ERO é a GSSG, que é reduzida a GSH pela enzima glutathione redutase NADPH-dependente (Figura 4). Além disso, a GSH desempenha várias funções celulares, incluindo o transporte de aminoácidos, a síntese de DNA e de proteínas e a redução de ligações dissulfeto (MOSKAUG et al., 2005; WU et al., 2010; GADEA et al., 2011).

Dentre as vitaminas antioxidante, a mais importante é a vitamina C (ácido ascórbico), que tem um poderoso poder antioxidante e funciona em ambientes aquosos do corpo. Ela é um antioxidante doador e reage para produzir a estabilização do radical livre ascorbato tricarbonil ($\text{Asc}\bullet$). Além disso, o ácido ascórbico colabora com a vitamina E para regenerar o α -tocoferol nas membranas e lipoproteínas (VALKO et al., 2006) e pode eliminar diretamente radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$. Atualmente, o ácido ascórbico é o suplemento vitamínico mais amplamente usado em todo o mundo (KLIMCZAK et al., 2006).

Os polifenóis constituem o grupo de metabólitos de plantas mais comum e são parte integrante da dieta humana. O recente interesse nesses compostos tem aumentado consideravelmente devido à sua capacidade antioxidante e suas possíveis implicações benéficas na saúde humana. Antioxidantes fenólicos (PhOH) podem agir diretamente como terminadores de cadeias de radicais livres, interferindo com a oxidação de lipídios e outras moléculas pela rápida doação de um átomo de hidrogênio para os radicais $\text{ROO}\cdot$, formando radicais intermediários fenoxi ($\text{PhO}\cdot$), que são relativamente estáveis ($\text{ROO}\cdot + \text{PhOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{PhO}\cdot$) (VALKO et al., 2006). Além disso, os polifenóis podem agir indiretamente, aumentando as defesas antioxidantes endógenas, modulando a atividade de proteína-quinases, servindo como ligantes para fatores de transcrição e modulando a atividade de proteases (MOSKAUG et al., 2005).

2.6 Dano Oxidativo a Biomoléculas

Um distúrbio no balanço entre as ERO e as defesas antioxidantes produz estresse oxidativo, o qual causa dano tecidual pela liberação de formas pró-oxidativas de ferro reativo que são capazes de conduzir a danos a lipídios, proteínas e DNA (GUTTERIDGE, 1995). A extensão da depleção de antioxidantes é um fator-chave: pequenas perturbações nos antioxidantes são prontamente corrigidas pela célula, mas uma grande depleção de antioxidantes pode causar a morte das células (SIES, 1997).

A evidência mais frequentemente citada para apoiar o envolvimento de reações de radicais livres em toxicologia e doenças é a medida da peroxidação lipídica. Esse processo representa a interação de ERO com AGPI de membranas biológicas, resultando em uma variedade de adeídos eletrofílicos altamente reativos, sendo o malondialdeído (MDA) o principal produto. O resultado da peroxidação lipídica é perda da fluidez, redução do potencial de membrana, aumento da permeabilidade e eventual ruptura que conduz à liberação das organelas citoplasmáticas (GUTTERIDGE, 1995; LEFRÈVE, 1998; TSANG & CHUNG, 2009). Muitas técnicas estão disponíveis para medir o progresso da peroxidação lipídica, sendo que o método mais amplamente utilizado é a medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que envolve o uso do ácido tiobarbitúrico para medir a concentração de MDA (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010).

Além da peroxidação lipídica, o dano oxidativo a proteínas também é bastante comum. A oxidação de proteínas leva à formação de diversos produtos que podem servir como marcadores de dano oxidativo, sendo que o marcador mais comum é a medida da concentração de grupamentos carbonila (aldeídos e cetonas), os quais são produzidos quando as cadeias laterais das proteínas são oxidadas. Estas frações são quimicamente estáveis, o que é útil tanto para a sua detecção quanto para o seu armazenamento, sendo, assim, um marcador amplamente aceito como medida de dano oxidativo em situações de envelhecimento e doenças (LEVINE, 1990; STADTMAN & LEVINE, 2000; DALLE-DONNE et al., 2003). O ensaio convencional para a medida da concentração de proteínas carboniladas é um processo colorimétrico que mede a ligação desses grupamentos à dinitrofenilhidrazina (DNPH) (BUSS et al., 1997).

Outro alvo chave dos danos oxidativos é o DNA. Estes danos incluem modificações e fragmentações das bases nitrogenadas do DNA e, se não forem reparados, podem causar mutações cromossômicas que perturbam a expressão do gene normal ou criam proteínas anormais que são prejudiciais para a função e viabilidade celular (FURNESS et al., 2011). A

principal ERO envolvida nos danos ao DNA é o radical OH^\bullet , que reage com o DNA por adição de ligações duplas às bases nitrogenadas do DNA e por abstração de um átomo de hidrogênio do grupamento metila da timina e de cada uma das ligações carbono-hidrogênio da 2'-desoxirribose (COOKE et al., 2003). Várias técnicas estão disponíveis para avaliação do nível de dano ao DNA, sendo que o ensaio cometa e a frequência de micronúcleos são as mais utilizadas por serem rápidas e relativamente simples. O ensaio cometa, que é amplamente aceito como um método padrão para avaliar danos ao DNA, é baseado na migração eletroforética de fragmentos do DNA (FIKROVÁ, 2011). Já a frequência de micronúcleos é baseada na porcentagem de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não conseguem se envolver com o fuso mitótico e ficam para trás quando a célula se divide, sendo avaliada em linfócitos do sangue periférico humano (EL-ZEIN et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da suplementação com semente de linhaça dourada em pacientes com síndrome metabólica (SM).

3.2 Específicos

- Aferir a pressão arterial sistólica e diastólica em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada.
- Determinar o IMC e a CA em controles e nos pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Obter a glicemia de jejum em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Determinar o perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicéridos) em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Avaliar os marcadores cardíacos creatino-quinase-MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e homocisteína em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Avaliar os marcadores de dano renal creatinina, uréia e ácido úrico em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Determinar o dano oxidativo em proteínas, lipídeos e material nuclear em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Obter o conteúdo plasmático de GSH, polifenóis e vitamina C em controles e pacientes com SM antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;

- Realizar análise fitoquímica da semente de linhaça dourada;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da semente de linhaça dourada pelo ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

PARTE II

4. MANUSCRITO I

Effects of golden linseed supplementation on biochemical parameters in patients with metabolic syndrome.

Bruna Cocco Pilar, Angélica Aparecida da Costa Güllich, Deise Jaqueline Ströher, Ritiele Pinto Coelho, Débora Faoro, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Vanusa Manfredini

Submetido a Journal of Functional Foods



CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

Em Quinta-feira, 14 de Novembro de 2013 16:06, Journal of Functional Foods <fshahidi@mun.ca> escreveu:

Ms. Ref. No.: JFF-D-13-01048

Title: Effects of golden linseed supplementation on biochemical parameters in patients with metabolic syndrome

Journal of Functional Foods

Dear Dr. VANUSA MANFREDINI,

Your submission "Effects of golden linseed supplementation on biochemical parameters in patients with metabolic syndrome" has been assigned manuscript number JFF-D-13-01048.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jff/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Journal of Functional Foods.

Kind regards,

Fereidoon Shahidi
Editor in Chief
Journal of Functional Foods

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/160

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Effects of golden linseed supplementation on biochemical parameters in patients with metabolic syndrome

Bruna Cocco Pilar^a, Angélica Aparecida da Costa Güllich^a, Deise Jaqueline Ströher^a, Ritiele Pinto Coelho^c, Débora Faoro^c, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^{b,c}, Vanusa Manfredini^{a,c*}

^aPostgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cCourse of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

***Corresponding author:**

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Uruguaiana

Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica

BR 472, Km 585

Uruguaiana, RS, Brazil, 97500-970

Telephone: +55 55 3413 4321

E-mail: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

Abbreviations: BMI, body mass index; CVD, cardiovascular disease; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl; MS, metabolic syndrome; NCEP ATP III, National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; SDG, secoisolariciresinol diglucoside.

Abstract

We evaluate the effects of supplementation with golden linseed for 28 days on biochemical, anthropometric and blood pressure parameters in patients with metabolic syndrome (MS). 20 patients with MS and 24 healthy volunteers consumed 40 g of golden linseed daily for 28 days. Anthropometric and blood pressure measurements and fasting blood samples were taken before and after supplementation. We also performed phytochemical analysis and *in vitro* antioxidant activity of golden linseed. We found high polyphenol content in linseed and high *in vitro* antioxidant activity. Biochemical assays demonstrated significant reductions in lipid and glucose levels and cardiac and kidney markers. There were no significant differences in anthropometric parameters and blood pressure. Our results demonstrate that daily supplementation with golden linseed for 28 days produces an improvement in lipid and glycemic profiles, as well as provides protection against heart and kidney damage in both healthy subjects and patients with MS.

Keywords: linseed, *Linum usitatissimum*, metabolic syndrome, phytochemical analysis, anthropometric parameters, blood pressure, biochemical parameters.

1 Introduction

Studies have shown a growing demand for food that has health benefits beyond simply supplying essential nutrients to maintain nutritional status. Due to growth in consumer demand for more balanced diets, the food industry is investing in the development of functional foods (Galvão, Silva, Silva, Moreira, & Sousa, 2008).

Linseed (*Linum usitatissimum* L.) is a functional food that has been extensively studied because of its ability to lower blood lipid levels, antioxidant properties, and potential effects on cardiovascular disease (CVD) risk reduction (Molena-Fernandes, Schimidt, Neto-Oliveira, Bersani-Amado, & Cuman, 2010; Zanwar, Hegde, & Bodhankar, 2011). Linseed contains high concentration of polyunsaturated fatty acids (mainly alpha-linolenic acid), vegetable protein, soluble fiber, phenolic acids, flavonoids and lignans (Taylor, Noto, Stringer, Froese, & Malcolmson, 2010). Among these active compounds, α -linolenic acid (ALA) has been shown to prevent blockage of arteries, which can cause heart disease, and to reduce oxidative stress (Psota, Gebauer, & Kris-Etherton, 2006). Plant lignans, which are highly concentrated in linseed, especially secoisolariciresinol diglucoside (SDG), have also been studied showing that they can lower blood cholesterol levels (Zhang et al., 2008). Soluble fibers have been shown to help maintain normal blood glucose levels and to reduce cholesterol levels (Morris, 2007). Thus, the use of linseed in the prevention and as an adjuvant in treatment of chronic diseases is increasing, with some studies demonstrating beneficial effects of linseed on hypercholesterolemia, diabetes mellitus and metabolic syndrome (MS) (Molena-Fernandes et al., 2010; Pan et al., 2007; Wu et al., 2010).

MS is a multifactorial disorder and, with the prevalence increasing rapidly, it is becoming a major concern (Amir, Watanabe, Yokotsuka, & Kobayashi, 2012). People must have at least three of the following traits to be diagnosed with this disease: elevated waist circumference, high blood pressure, high level of triglycerides, elevated fasting blood glucose levels and reduced high density lipoprotein (HDL) levels (Barre, 2007).

The treatment of this syndrome is complex and includes both changes in lifestyle as drug treatment (Grundy et al., 2005). However, human and animal models studies indicate that an increased intake of linseed or its isolated lignans is inversely related to the presence of MS characteristics. Zhang et al. (2008) demonstrated that treatment with 600 mg/day of lignan-rich linseed extract can lower blood cholesterol and fasting glucose levels in hypercholesterolaemic subjects. Likewise, Molena-Fernandes et al. (2010) evaluated the effect of linseed flour on lipid profile and weight gain in Wistar rats with promising results. In

another study, Couto and Wichmann (2011) demonstrated that daily intake of 20 g of triturated linseed is effective for reducing anthropometric measures in women with body mass index (BMI) greater than 25 kg/m². Regarding the cardioprotective effect of linseed, Zanwar et al. (2011) reported a reduction in serum cardiac markers in rats after supplementation with linseed lignin extract. Moreover, Abdel-Moneim, Dkhil, and Al-Quraishy (2011) showed that treatment with linseed oil decreased the levels of the markers of renal function in rats.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of golden linseed supplementation for 28 days on biochemical, anthropometric and blood pressure parameters in patients with MS.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

All the chemicals used were of analytical grade. HPLC solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All the others reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2 Plant material

Golden linseed was obtained from Cerélus Company (Ijuí, RS, Brazil) in October of 2012. Table 1 shows the nutritional information in 10 g of golden linseed. For the phytochemical analysis, the seeds were triturated in a blender, macerated and extracted with ethanol (70%) for 7 days, at *room temperature* and *dark* conditions, with daily agitation. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure at 45°C to remove the solvents.

2.3 Determination of total polyphenolic contents

The total polyphenolic concentration in the extract was measured spectrophotometrically using a Folin-Ciocalteu method adapted from Chandra & de Meija, 2004. Sample preparation: 0.5 g of the extract was dissolved in 10 mL of ethanol and the volume adjusted to 100 mL with water. An aliquot of 3 mL was dissolved in 100 mL of water to yield a final concentration of 0.15 mg/mL. Briefly, 0.5 mL of 2 N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 1 mL of the sample, and this mixture was allowed to stand at room temperature for 5 min before the addition of 2 mL of 20% Na₂CO₃ solution. The mixture was then allowed to stand for 10 minutes before reading at 730 nm in a Shimadzu-UV-1201

(Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. The estimation of phenolic compounds in the extract was carried out in triplicate. The standard curve of gallic acid was prepared in the same manner and total polyphenolic content was expressed as microgram equivalents of gallic acid per gram of linseed. The equation obtained for standard curve of gallic acid in the range of 0.001 – 0.020 mg/mL was $y = 40.112x + 0.0581$ ($R^2 = 0.9994$).

2.4 Determination of flavonoids

The analysis was made according to the procedure reported by Woisky and Salatino (1998). To 2 mL of the reference solution, 20 mL of methanol and 1 mL of 5% $AlCl_3$ solution (w/v) were added and the volume was made up to 50 mL with methanol at 20 °C. After 30 minutes, the absorbance was measured at 425 nm in a Shimadzu-UV-1201 spectrophotometer. The same procedure was made to the extract analysis. The blank was the 5% $AlCl_3$ solution (w/v) alone. The estimation of flavonoids was carried out in triplicate. The total flavonoid content was calculated on the basis of the standard curve for quercetin and was expressed as microgram equivalents of quercetin per gram of linseed. The equation obtained for standard curve of quercetin in the range of 0.02 – 0.60 mg/mL was $y = 0.891x + 0.0149$ ($R^2 = 0.9723$).

2.5 Determination of ascorbic acid content

The procedure was performed as reported by Jacques-Silva, Nogueira, and Broch (2001). Sulphuric acid solution 1 M was used to solubilize and prepare the curve of ascorbic acid used as reference. The reference sample was mixed with trichloroacetic acid 13,3% and 2,4-dinitrophenylhydrazine. After an incubation period, the sample was measured at 520 nm in a Shimadzu-UV-1201 spectrophotometer. The equation obtained for standard curve of ascorbic acid in the range of 1.5 – 4.5 mg/mL was $y = 0.0534x + 0.0713$ ($R^2 = 0.9790$). The extract was measured using the same procedure. The estimation of ascorbic acid concentration was carried out in triplicate.

2.6 HPLC analysis

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software. Reverse phase chromatographic analysis was carried out under gradient conditions using C18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 μ m diameter particles; the mobile phase

was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 minutes and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 minutes, respectively (Laghari, Memon, Nelofar, Khan, & Yasmin, 2011). Six antioxidants compounds were quantified, namely, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, rutin and kaempferol. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume 40 μ L and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 327 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. The sample and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.200 mg/mL for quercetin, rutin and kaempferol and 0.050 – 0.250 mg/mL for gallic, caffeic and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 13260x + 1276.4$ ($r = 0.9998$); chlorogenic acid: $Y = 12158x + 1174.9$ ($r = 0.9996$); caffeic acid: $Y = 14034x + 1527.5$ ($r = 0.9995$); rutin: $Y = 13721x + 1068.4$ ($r = 0.9997$); quercetin: $Y = 13794x + 1392.1$ ($r = 0.9999$) and kaempferol: $Y = 12647x + 1178.3$ ($r = 0.9995$). All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.7 Radical - scavenging capacity - DPPH assay

The antioxidant capacity of the extract was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), according to a slightly modified method previously described by Choi et al. (2002). Spectrophotometric analysis (SHIMADZU-UV-1201) was used in order to determine the inhibition concentration (IC) and the inhibition percentage (IP %) of the extract. The DPPH quenching ability was expressed as IC₅₀ (concentration which gives 50% inhibition). Six different ethanol dilutions of the extract (2.5 mL), at 250; 125; 62.5; 31.25; 15.62; and 7.81 μ g/mL were mixed with 1.0 mL of a 0.3 mM DPPH ethanol solution. The absorbance was measured at 518 nm by spectrophotometer against a blank after 30 min of reaction at room temperature in the dark. DPPH solution (1.0 mL, 0.3mM) plus ethanol (2.5 mL) was used as a control. Relative activity was calculated from the calibration curve of *L*-ascorbic acid standard solution working in the same experimental conditions. Inhibition of free radical by DPPH in percent (IP %) was calculated in following way:

$$IP\% = 100 - [(ABS_{SAMPLE} - ABS_{BLANK}) / ABS_{CONTROL}] \times 100 \quad (1)$$

Where, ABS_{SAMPLE} is the absorbance of the test compound, ABS_{BLANK} is the absorbance of the blank (containing 1.0 mL of ethanol plus 2.5 mL of the plant extract solution) and $ABS_{CONTROL}$ is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound). IP% was plotted against sample concentration, and a linear regression curve was established in order to calculate the IC_{50} . Test was carried out in triplicate.

2.8 Selection of volunteers

Twenty-two volunteers between the ages of 45 and 55 years, of both sexes, who meet the criteria of MS recommended by the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) (2001), were recruited in Uruguaiana and enrolled in this study between November 2012 and December 2012. We selected twenty-five control subjects without MS in both sexes and aged-matched to the patients. We excluded from the study subjects who had cancer or lung and / or infectious disease, smokers and those using flaxseed routinely. All participants signed a consent form and lifestyle habits for each subject were assessed by a questionnaire. The volunteers received 40 grams aliquots (Rhee & Brunt, 2011) of golden linseed for daily use for a period of 28 days (Zhang et al., 2008). Twenty patients with MS and twenty-four healthy volunteers completed the study. This study was approved by the Ethics and Research of the Federal University of Pampa (Protocol n°. 140.593/2012).

2.9 Blood sample collection

Fasting morning blood samples were taken at the beginning and end of the 28 days of supplementation study. Blood was drawn from the antecubital vein into prechilled tubes containing EDTA and tubes without anticoagulant (Vacutainer - Becton, Dickinson and Company – New Jersey – USA). Blood in tubes without anticoagulant were allowed to clot at room temperature for 30 min. The plasma and serum were collected after centrifugation at $1500 \times g$ for 10 min and analyzed immediately.

2.10 Anthropometric and pressure parameters

Before blood sampling, weight and height of the volunteers were measured and BMI was calculated according to the equation:

$$\text{BMI (kg/m}^2\text{)} = \text{WEIGHT} / \text{HEIGHT}^2 \quad (2)$$

We also measured waist circumference, using anatomical landmarks recommended by World Health Organization (WHO) (2000): midpoint between the last rib and the iliac crest at the end of expiration. Blood pressure was measured in the left arm, in the sitting position and after five minutes of rest, according to the IV Brazilian Guidelines on Hypertension (2010).

2.11 Biochemical parameters

2.11.1 Lipid and glycemic profiles

Lipid profile was analyzed by measuring the total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides total levels. LDL cholesterol values were computed according to the Friedewald formula. Furthermore, the fasting glucose levels were measured. All assays were carried out in triplicate and using automatic analyzer A25 Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Spain) for *in vitro* diagnostics.

2.11.2 Cardiac Markers

The cardiac markers creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured using automatic analyzers A25 Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Spain) for *in vitro* diagnostics. Furthermore, homocystein levels were measured by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), according to Nelson, Pfeiffer, Sniegosky, and Satterfield (2003). Cardiac markers were also carried out in triplicate.

2.11.3 Markers of Renal Function

The creatinine, urea and uric acid levels were measured to evaluate renal function of the volunteers. These parameters were carried out in triplicate and using automatic analyzers A25 Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Spain) for *in vitro* diagnostics.

2.14 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between before and after supplementation were performed using a t test for paired samples. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Phytochemical analysis

The concentrations of the main phytochemicals constituents in the golden linseed sample used in this study are shown in Table 2. We found concentrations of 10560 ± 839 $\mu\text{g/g}$, 3740 ± 642 $\mu\text{g/g}$, 155.04 ± 28.14 $\mu\text{g/g}$, 416.08 ± 35.64 $\mu\text{g/g}$, 419.60 ± 19.39 $\mu\text{g/g}$, 371.18 ± 56.32 $\mu\text{g/g}$, 715.76 ± 64.19 $\mu\text{g/g}$, 574.22 ± 37.86 $\mu\text{g/g}$ e 695.80 ± 46.32 $\mu\text{g/g}$ for polyphenolic compounds, total flavonoids, ascorbic acid, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin and kampferol respectively.

3.2 DPPH assay

In the DPPH test, the linseed sample showed an IC₅₀ of 0.226 mg / ml.

3.3 Anthropometric and pressure parameters

Table 3 shows the anthropometric and blood pressure parameters of patients and controls in this study before and after the 28 days of supplementation. There were no significant differences ($p < 0.05$) in these parameters during the study period.

3.4 Biochemical parameters

Figure 1 shows the results for the lipid and glycemic profiles of the volunteers in this study. Supplementation with 40 g of linseed for 28 days significantly reduced ($p < 0.05$) fasting glucose, triglycerides, total cholesterol and LDL cholesterol levels (Figures 1A, 1B, 1C and 1D, respectively), and promoted a statistically significant increase ($p < 0.05$) in HDL cholesterol levels (Figure 1E), in both control subjects and patients with MS.

The results for the concentrations of cardiac markers are showed in Figures 2A, 2B and 2C, respectively. We found significant reductions ($p < 0.05$) in the levels of CK-MB and LDH after 28 days of supplementation with linseed in both patients with MS and healthy control subjects. Regarding the levels of homocysteine, the MS patients showed increased

levels compared to healthy subjects and, after the supplementation with linseed these levels were significantly changed ($p < 0.05$) in this patients, but not in control individuals.

Renal markers evaluated in this study are shown in Figure 3. It was possible to observe a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in the creatinine, urea and uric acid levels after supplementation with linseed in control subjects and in patients with MS (Figures 3A, 3B and 3C, respectively).

4. Discussion

Phytochemical analysis of golden linseed used in this study showed high concentration of polyphenolic compounds, mainly flavonoids and phenolic acids. Phenolic compounds are secondary metabolites that are widely distributed in nature and have been implicated as the active components of various medicinal plants (Ignat, Volf, & Popa, 2011). These compounds have several biological effects such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, cardio and neuroprotective (Ullah & Khan, 2008). Flavonoids comprise a major group of phenolic compounds and, due to their powerful antioxidant activity, they are associated with reduced incidence of diseases such as cancer and CVD (Ignat et al, 2011).

The DPPH assay is based on the capacity of the DPPH radical, a stable free radical, to discolor in the presence of antioxidants. It is a direct and reliable *in vitro* method for determination of antioxidant activity of several plant extracts (Hasan et al., 2009). According to Wojdylo, Oszmiansk, and Czmerys (2007), the inhibition of DPPH radical activity shows a correlation with the total phenolic content, therefore the high inhibition capacity found in this study confirms the high concentration of these compounds demonstrated in phytochemical analysis and its high antioxidant power.

Regarding anthropometrics and pressure parameters, we can observe that the mean of BMI, waist circumference and blood pressure of the control individuals are within the normal range for healthy people, according to Stahl et al. (2012). For patients with MS, the results are within the cutoff values for syndromic individuals, according to NCEP-ATPIII (2001). No significant differences were observed in these parameters during the study period. These results are consistent with studies of Stuglin and Prasad (2005), who found no significant differences in blood pressure during a four-week intervention using 32.7 g/day of linseed. On the other hand, Paschos, Magkos, Panagiotakos, Votteas, and Zampelas (2007) reported that 12 weeks of supplementation with 15 ml/day of linseed oil resulted in a significant decrease

in systolic and diastolic blood pressure in dyslipidemic patients. The lack of significant reductions in blood pressure may be due to the short duration of this protocol or the form of presentation of linseed used in this study. Regarding BMI and waist circumference, the results of this study corroborate the findings of Mandasescu et al. (2005), who evaluated the effect of supplementation with 20 g of linseed associated with a hypo-lipidic diet in hyperlipidemic individuals for 60 days and found no significant differences.

The reduction in fasting glucose levels demonstrated in this study were also reported by Rhee and Brunt (2011), who showed that 12 weeks of supplementation with 40 g of linseed significantly decreased fasting plasma glucose concentration in obese glucose intolerant people. In another study, Kaithwas and Majundar (2012) demonstrated significant reductions in glucose levels in diabetic albino rats after supplementation with 3 mL/kg of linseed oil for 3 weeks. The mechanism of reduction of blood glucose levels after supplementation with linseed has not been fully elucidated, but it has already been observed in a previous study that linseed lignans, due to its high antioxidant activity, increase glucose elimination via increased translocation of GLUT 4 on the cell membrane and increase the basal glucose uptake by redistribution of GLUT-1 (Rhee & Brunt, 2011). Although the GLUT expression or cellular uptake of glucose was not evaluated in this study, our results suggest that they can be involved in the mechanisms of reduction of blood glucose levels.

As previously mentioned, MS is characterized by a combination of risk factors that increase the chance of developing CVD, and dyslipidemia is one of the major factors associated with these complications (Adolphe, Whiting, Juurlink, Thorpe, & Alcorn, 2010). Previous studies suggest that linseed consumption improves lipid profile. Bloedon et al. (2008) evaluated the effect of supplementation with 40 g of linseed in hypercholesterolemic subjects and observed reductions in LDL cholesterol levels after five weeks. Likewise, Kaithwas and Majundar (2012) evaluated the effect of linseed oil in hyperlipidemic and diabetic rats, and the treated rats showed a significant decrease in the levels of triglycerides, total cholesterol and LDL cholesterol, and an increase in HDL cholesterol levels. Our study produced results which corroborate these findings, showing that linseed supplementation may help reduce the CVD risk.

There are still controversies regarding the linseed components that are responsible for the improvement in the lipid profile. The results reported by Molena-Fernandes et al. (2010) suggest that this improvement is due to the high content of polyunsaturated fatty acids and soluble fiber. On the other hand, Zhang et al. (2008) demonstrated the role of linseed SDG lignan extract on lipid profile. SDG is a lignan found in high concentrations in linseed (Pan et

al., 2007) and it is metabolized to secoisolariciresinol (SECO), enterodiol (ED) and enterolactone (EL) in the intestine and colon. Serum measurements of these metabolites were performed in individuals supplemented with SDG, and significant correlations were observed between their concentration and the decrease of plasma lipids, suggesting that these metabolites may play an important role in improving the lipid profile (Zhang et al., 2008).

Some studies in humans and animals have shown the cardioprotective effect of linseed or isolated linseed lignans (Bloedon et al., 2008; Zanwar et al., 2011). In this study, beside the dosage of serum lipids, the cardioprotective effect of linseed was assessed by measurements of the cardiac markers CK-MB, LDH and homocysteine. The CK-MB and LDH are intracellular enzymes present in cardiac tissue and they are released into the extracellular fluid after myocardial injury. CK-MB is a classical marker of cardiac damage (Henriques, Lélis, Jesus, & Araújo, 2006) and it leaks out from the myocardium due to disintegration of the contractile apparatus and increased to sarcoplasmic permeability (Zanwar et al., 2011). LDH is a less specific marker for diagnosing heart damage because it is found in many tissues, but measurements of both LDH and CK-MB or another more specific marker are valuable indicators of cardiac lesions (Henriques et al., 2006). We found significant reductions in the levels of these two enzymes after 28 days of supplementation with linseed, indicating the cardioprotective effect of this functional food in both patients with MS and healthy control subjects. The study by Zanwar et al. (2011), which evaluated the cardioprotective effect of a lignan complex isolated from linseed, suggests that the cardioprotection is due to the lignans present in linseed and the mechanism is related to their antioxidant properties.

Homocysteine is a sulfhydryl amino acid formed during the methionine metabolism (Hajer, van der Graaf, Olijhoek, Verhaar, & Visseren, 2007). It has been demonstrated that MS is associated with increased homocysteine levels (Veeranna et al., 2011), which is in agreement with the findings of this study. The role of this amino acid in cardiovascular damage is still controversial. However, elevated homocysteine levels can improve risk prediction of coronary heart disease events, especially in intermediated-risk individuals (Hajer et al., 2007).

Studies have shown that MS is closely related to chronic kidney disease (Chen et al., 2004) and the role of linseed in protecting against renal damage has been reported by Abdel-Monein et al. (2011). In this study, the renal function was assessed by measuring creatinine, urea and uric acid levels. We observed a significant reduction in these three biomarkers levels after supplementation, indicating a protective role of linseed against kidney damage. These biomarkers are widely used to assess renal function, though it is known that they have low

sensitivity and specificity, particularly in early kidney injury diagnosis (Urbschat, Obermüller, & Haferkamp, 2011). Thus, this study demonstrates that supplementation with linseed can protect against kidney damage, but further studies using more sensitive and specific markers are needed to predict the mechanism of protection.

4 Conclusions

In conclusion, the results of this study demonstrated that supplementation with golden linseed for 28 days produces an improvement in lipid and glycemic profiles, as well as provides protection against heart and kidney damage in both healthy subjects and patients with MS. Therefore, supplementation with golden linseed can help in the treatment of patients with MS, bringing benefits on biochemical parameters.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Abdel-Moneim, A. E., Dkhil, M. A., & Al-Quraishy, S. (2011). The potential role of flaxseed oil on lead acetate-induced kidney injury in adult male albino rats. *African Journal of Biotechnology*, *10* (8), 1436-1451.
- Adolphe, J. L., Whiting, S. J., Juurlink, B. H. J., Thorpe, L. U., & Alcorn, J. (2010). Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *British Journal of Nutrition*, *103*, 929-938.
- Amir, K., Watanabe, M., Yokotsuka, M., & Kobayashi, Y. (2012). Changes in serum fatty acids and effects of metabolic syndrome induced by intermittent flaxseed-oil supplementation. *Ningen Dock*, *26*, 927-934.
- Barre, D. E. (2007). Impact of dietary flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation on biochemical profile in healthy rats. *Journal of Oleo Science*, *56* (7), 319-325.
- Bloedon, L. T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S. C., Berlin, J. A., Rader, D. J., & Szapary, P. O. (2008). Flaxseed and cardiovascular risk factors: Results from a double

- blind, randomized, controlled clinical trial. *The Journal of the American College of Nutrition*, 27 (1), 65-74.
- Chandra, S., & de Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583-3589.
- Chen, J., Muntner, P., Hamm, L. L., Jones, D. W., Batuman, V., Fonseca, V., Whelton, K., & He, J. (2004). The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Annals of Internal Medicine*, 140 (3), 167-174.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., & Kim, S. K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163 (6), 1161-1168.
- Couto, A. N., & Wichmann, F. M. A. (2011). Efeitos da farinha de linhaça no perfil lipídico e antropométrico. *Alimentos e Nutrição*, 22 (4), 601-608.
- Galvão, E. L., Silva, D. C. F., Silva, J. O., Moreira, A. V. B., & Sousa, E. M. B. D. (2008). Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 28 (3), 551-557.
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Spertus, J. A., & Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome. *Journal of the American Heart Association*, 112, 2735-2752.
- Hajer, G. R., van der Graaf, Y., Olijhoek, J. K., Verhaar, M. C., & Visseren, F. L. J. (2007). Levels of homocysteine are increased in metabolic syndrome patients but are not associated with an increased cardiovascular risk, in contrast to patients without the metabolic syndrome. *Heart and Education in Heart*, 93 (2), 216-220.
- Hasan, R., Hossain, M., Akter, R., Jamila, M., Mazumder, E. H., & Rahman, S. (2009). DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. *Journal of Medical Plants Research*, 3 (11), 875-879.
- Henriques, S., Lélis, M., Jesus, H., & Araújo, J. N. (2006). Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*, 13 (2), 113-125.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.

- Jacques-Silva, M. C., Nogueira, C. W., & Broch, L. C. (2001). Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology & Toxicology*, 88 (3), 119-125.
- Kaithwas, G., & Majumdar, D. K. (2012). In vitro antioxidant and in vivo antidiabetic, antihyperlipidemic activity of linseed oil against streptozotocin-induced toxicity in albino rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1237-1245.
- Laghari, A. H., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K. M., & Yasmin, A. (2011). Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chemistry*, 126 (4), 1850-1855.
- Mandasescu, S., Mocanu, V., Dascalita, A. M., Haliga, R., Nestian, I., Stitt, P. A., & Luca, V. (2005). Flaxseed supplementation in hyperlipidemic patients. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 109 (3), 502-506.
- Molena-Fernandes, C. A., Schimidt, G., Neto-Oliveira, E. R., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2010). Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12 (2), 201-207.
- Morris, D. H. (2007). *Linaza - una recopilación sobre sus efectos en la salud y nutrición*. (4th ed.). Winnipeg: Flax Council of Canada.
- Nelson, B., Pfeiffer, C., Sniegosky, L., & Satterfield, M. (2003). Development and evaluation of an isotope dilution LC/MS method for the determination of total homocysteine in human plasma. *Analytical Chemistry*, 75 (4), 775-784.
- Pan, A., Sun, J., Chen, Y., Ye1, X., Li, H., Yu, Z., Wang, Y., Gu1, W., Zhang, X., Chen, X., Demark-Wahnefried, W., Liu, Y., & Lin, X. (2007). Effects of a flaxseed-derived lignan supplement in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, cross-over trial. *PLoS One*, 2 (11), e1148.
- Paschos, G. K., Magkos, F., Panagiotakos, D. B., Votteas, V., & Zampelas, A. (2007). Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1201-1206.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *American Journal of Cardiology*, 98 (4), 3-18.
- Rhee, Y., & Brunt, A. (2011). Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *Nutrition Journal*, 10, 44-50.

- Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. (2010). VI Diretriz Brasileira de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 9, 1-51.
- Stahl, C. H., Novak, M., Lappas, G., Wilhelmsen, L., Bjorck, L., Hansson, P. O., & Rosengren, A. (2012). High-normal blood pressure and long-term risk of type 2 diabetes: 35-year prospective population based cohort study of men. *BMC Cardiovascular Disorders*, 12, 89-96.
- Stuglin, C., & Prasad, K. (2005). Effect of flaxseed consumption on blood pressure, serum lipids, hemopoietic system and liver and kidney enzymes in healthy humans. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 10 (1), 23-27.
- Taylor, C. G., Noto, A. D., Stringer, D. M., Froese, S., & Malcolmson, L. (2010). Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *The Journal of the American College of Nutrition*, 29 (1), 72-80.
- The third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). (2001) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Journal of the American Medical Association*, 285, 2486-2497.
- Ullah, M. F., & Khan, M. W. (2008). Food as Medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9, 187-1896.
- Urbschat, A., Obermüller, N., & Haferkamp, A. (2011). Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 16 (51), S22-S30.
- Veeranna, V., Zalawadiya, S. K., Niraj, A., Pradhan, J., Ference, B., Burack, R. C., Jacob, S., & Afonso, L. (2011). Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *The Journal of the American College of Cardiology*, 58 (10), 1025-1033.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37 (2), 99-105.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.
- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization Technical Report Series*, 89, 1-253.

- Wu, H., Pan, A., Yu, Z., Qi, Q., Zhang, G., Yu, D., Zong, G., Zhou, Y., Chen, X., Tang, L., Feng, Y., Zhou, H., Chen, X., Li, H., Demark-Wahnefried, W., Hu, F. B., & Lin, X. (2010). Lifestyle counseling and supplementation with flaxseed or walnuts influence the management of metabolic syndrome. *Journal of Nutrition, 140*, 1937-1942.
- Zanwar, A. A., Hegde, M. V., & Bodhankar, S. L. (2011). Cardioprotective activity of flax lignin concentrate extracted from seeds of *Linum usitatissimum* in isoprenaline induced myocardial necrosis in rats. *Interdisciplinary Toxicology, 4* (2), 90-97.
- Zhang, W., Wang, X., Liu, Y., Tian, H., Flickinger, B., Empie, M. W., & Sun, S. Z. (2008). Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *British Journal of Nutrition, 99*, 1301-1309.

Figure 1.

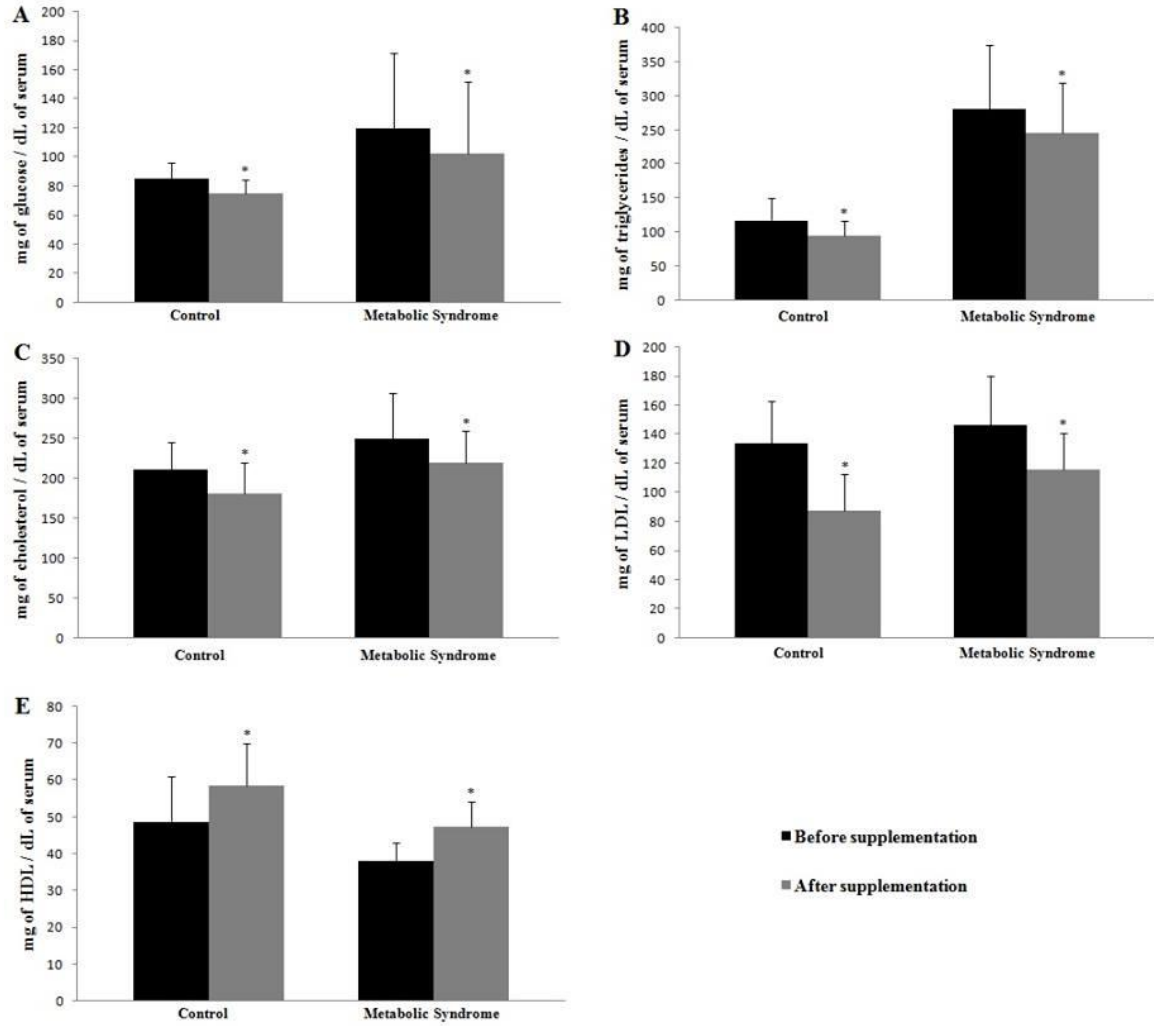


Figure 2.

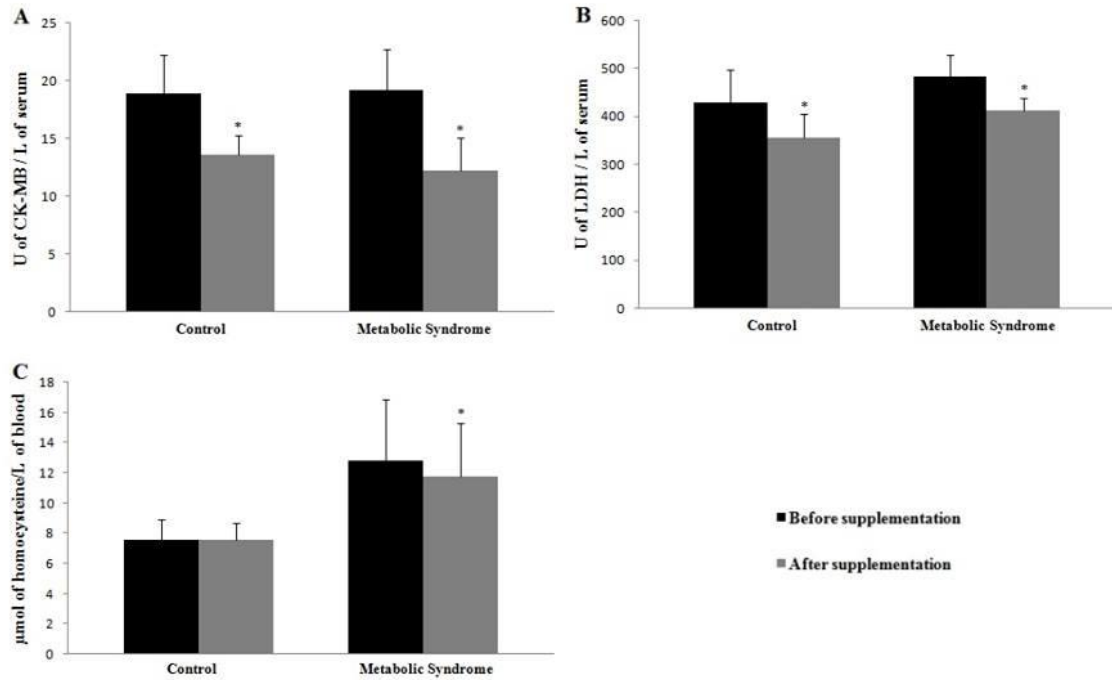


Figure 3.

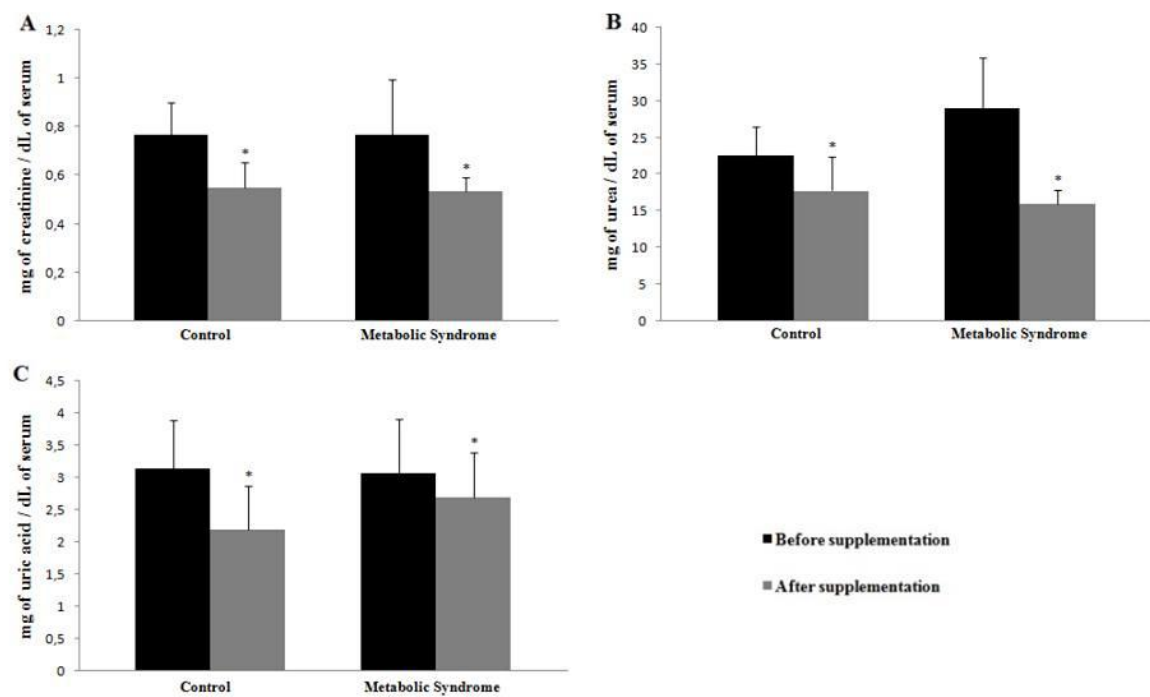


Figure captions:

Fig. 1: Lipid profile and fasting glucose levels in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed. A. Glucose levels. B. Triglyceride levels. C. Total cholesterol levels. D. LDL cholesterol levels. E. HDL cholesterol levels. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p<0.05$) between the groups before and after supplementation.

Fig. 2: Cardiac markers in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed. A. Creatine-kinase MB levels. B. Lactate dehydrogenase levels. C. Homocystein levels. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p<0.05$) between the groups before and after supplementation.

Fig. 3: Renal function markers in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed. A. Creatinine levels. B. Urea levels. C. Uric acid levels. Data are expressed as means \pm SD Asterisks indicate statistically significant differences ($p<0.05$) between the groups before and after supplementation.

Table 1: Nutritional information of golden linseed used in this protocol.

10 g portion of linseed	Amount per portion	% DV^a
Calories	47 Kcal = 197 KJ	3%
Carbohydrate	3,3g	1%
Protein	2g	3%
Total fat	3,3g	6%
Saturated fat	0,34g	1%
Trans fat	0g	**
Monounsaturated fat	0,8g	9%
Polyunsaturated fat	2,14g	9%
Cholesterol	0g	0%
Dietary fiber	2,7g	11%
Omega 3 (alpha linolenic acid)	1,7g	^b
Omega 6 (linoleic acid)	0,5g	^b
Omega 9 (oleic acid)	0,8g	^b
Sodium	0mg	0%
Magnesium	37mg	14%
Phosphorus	50mg	7%
Manganese	0,34mg	14%
Iron	0,6mg	5%

^a % Reference Daily Values are based on a diet of 2.000 kcalories or 8.400 kJ. Your daily values may be higher or lower depending on your calorie needs. ^b Daily Values not established.

Table 2: Phytochemical analysis of golden linseed used in this protocol.

Group / Compound	Golden Linseed (in $\mu\text{g/g}$ of linseed)
Polyphenolic compounds ^a	10560 \pm 839
Total flavonoids ^a	3740 \pm 642
Ascorbic acid ^a	155.04 \pm 28.14
Gallic acid ^a	416.08 \pm 35.64
Chlorogenic acid ^a	419.60 \pm 19.39
Caffeic acid ^a	371.18 \pm 56.32
Rutin ^a	715.76 \pm 64.19
Quercetin ^a	574.22 \pm 37.86
Kaempferol ^a	695.80 \pm 46.32

^aData are expressed as means \pm SD. Each experiment was repeated three times in triplicate.

Table 3: Anthropometric and pressure parameters of controls and patients before and after supplementation.

Parameters	Control		Metabolic Syndrome	
	Before	After	Before	After
	Supplementation	Supplementation	Supplementation	Supplementation
Total Volunteers	24 volunteers		20 volunteers	
Males	12 males		10 males	
Females	12 females		10 females	
Body Mass Index	25.93 ±	25.92 ±	31.60 ±	31.15 ±
(kg/m²)^a	3.09	3.07	5.54	5.56
Waist	86.37 ±	85.63 ±	97.71 ±	97.14 ±
Circumference	8.46	7.99	10.03	9.34
(cm)^a				
Systolic Pressure	120.00 ±	117.30 ±	145.00 ±	149.28 ±
(mmHg)^a	10.69	10.33	20.28	24.64
Diastolic Pressure	74.70 ±	76.00 ±	91.40 ±	100.00 ±
(mmHg)^a	7.43	9.10	15.11	14.67

^a Data are expressed as means ± SD. In all evaluated parameters, there were no statistically significant differences between groups.

5. MANUSCRITO II

Supplementation with golden linseed improves oxidative stress parameters in patients with metabolic syndrome

Bruna Cocco Pilar, Angélica Aparecida da Costa Güllich, Deise Jaqueline Ströher, Luisa Zuravski, Ritiele Pinto Coelho, Débora Faoro, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Vanusa Manfredini

Submetido a Human & Experimental Toxicology



CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

De: "Leila.Ahlstrom@ttl.fi" <Leila.Ahlstrom@ttl.fi>

Para: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

Enviadas:

Assunto: Human and Experimental Toxicology - Manuscript ID HET-13-0647

26-Nov-2013

Dear Prof. MANFREDINI:

Your manuscript entitled "Supplementation with golden linseed improves oxidative stress parameters in patients with metabolic syndrome" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Human and Experimental Toxicology.

Your manuscript ID is HET-13-0647.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/het> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/het>.

Thank you for submitting your manuscript to Human and Experimental Toxicology.

Sincerely,
Human and Experimental Toxicology Editorial Office

Supplementation with golden linseed improves oxidative stress parameters in patients with metabolic syndrome

Bruna Cocco Pilar^a, Angélica Aparecida da Costa Güllich^a, Deise Jaqueline Ströher^a, Luisa Zuravski^a, Ritiéle Pinto Coelho^c, Débora Faoro^c, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^{b,c}, Vanusa Manfredini^{a,c*}

Affiliation

^a Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Course of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

***Corresponding author:**

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Uruguaiiana

Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica

BR 472, Km 585

Uruguaiiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970

Telephone: +55 55 3413 4321 fax: +55 55 34134321

E-mail: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

Abstract

Linseed has been extensively studied due to its antioxidant effects. Humans and animals studies indicate that increased linseed intake is inversely related with the symptoms of metabolic syndrome (MS). The aim of this study was to evaluate the effects of golden linseed supplementation for 28 days on parameters of oxidative stress in patients with MS. We performed phytochemical analysis and *in vitro* antioxidant activity of golden linseed. Subsequently, 20 patients with MS and 24 healthy volunteers (control) were selected, who received 40 g/day of golden linseed for 28 days. Fasting blood samples were taken before and after the supplementation period for analysis of oxidative damage and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses. Golden linseed showed high concentrations of polyphenolic compounds and high *in vitro* antioxidant power. Serum analysis showed significant reductions ($p < 0.05$) in oxidative damage to lipids and proteins. Furthermore, it was found a significant improvement ($p < 0.05$) in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses. The results of this study demonstrated that golden linseed supplementation reduces the oxidative damage and improves the antioxidant defenses in both healthy individuals and patients with MS.

Keywords: Linseed, metabolic syndrome, oxidative stress, antioxidant defenses.

1 Introduction

In recent years, consumer interest in functional food had increased substantially in an effort to promote better health and well-being.¹ These foods contain compounds such as vitamin C, phenolic acids and flavonoids, which are well known for their antioxidant activities.²

Linseed (*Linum usitatissimum* L.) is a functional food that has been extensively studied due to its ability to reduce blood lipids and produce antioxidant effects.³ Among the linseed nutritional constituents, we highlight its high content of polyunsaturated fatty acids (particularly alpha-linolenic acid), vegetable protein, soluble fiber, phenolic acids, flavonoids and lignans.^{4,5}

Many studies have shown that these compounds can reduce oxidative damage to biomolecules.^{6,7} This oxidative damage is a result of the disruption of cellular homeostasis, resulting in increased lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage, which can lead to cell death. The endogenous antioxidant defense systems of cells competitively neutralize oxidative damage. However, if the level of reactive oxygen species (ROS) exceeds the defense mechanisms, supplementation with external antioxidants as functional foods may be necessary.⁸

These ROS have been associated with many disorders such as metabolic syndrome (MS), diabetes mellitus (DM) and cardiovascular disease (CVD).⁹ Among these disorders, MS is a multifactorial disorder that is rapidly increasing in prevalence and becoming a major concern.¹⁰ This syndrome is characterized by individuals who meet at least three of the following criteria: increased waist circumference, high blood pressure, high fasting glucose and triglyceride levels and reduced high density lipoprotein (HDL) levels.¹¹

The treatment of MS is complex and includes both changes in lifestyle as drug treatment.¹² However, human and animal models studies indicate that an increased dietary intake of linseed or its isolated lignan is directly related to the reduction of oxidative stress and / or increased antioxidant defenses. Rhee & Brunt demonstrated that supplementation with 40 g of linseed daily for 12 weeks reduces lipid peroxidation in obese glucose intolerant people.⁷ In another study, Moniem et al. (2010) evaluated the protective effect of linseed oil against lead-induced oxidative stress in albino rats. They showed that the treatment with linseed oil effectively protected against lipid peroxidation and DNA damage, and the levels of reduced glutathione (GSH) and antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide

dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) were significantly increased.⁶

In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of golden linseed supplementation on parameters of oxidative stress in patients with MS.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

All the chemicals used were of analytical grade. HPLC solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All the others reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2 Plant material

Golden linseed was obtained from Cerélus Company, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brazil, in October of 2012. For the phytochemical analysis, the seeds were triturated in a blender, macerated and extracted with ethanol (70%) for 7 days, at *room temperature* and *dark* conditions, with daily agitation. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure at 45 °C to remove the ethanol.

2.3 Determination of total polyphenolic contents

The extracts were prepared following a standardized procedure: 0.5 g of the extract was dissolved in 10 mL of ethanol and the volume adjusted to 100mL with water. An aliquot of 3 mL was dissolved in 100 mL of water. Final concentration was 0.15 mg/mL. The total polyphenolic concentration in the extract was measured spectrophotometrically using a modified Folin-Ciocalteu method.¹³ Briefly, 0.5 mL of 2 N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 1 mL of the sample (0.15 mg/mL), and this mixture was allowed to stand for 5 min before the addition of 2 mL of 20% Na₂CO₃. The solution was then allowed to stand at room temperature for 10 minutes before reading at 730 nm in a Shimadzu-UV-1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. The estimation of phenolic compounds in the extract was carried out in triplicate. Thus, it is only possible to get relative equivalents with the standard used. The standard curve of gallic acid was prepared in the same manner and total polyphenolic content was expressed as microgram equivalents of gallic acid per gram of

linseed. The equation obtained for standard curve of gallic acid in the range of 0.001 – 0.020 mg/mL was $y = 40.112x + 0.0581$ ($R^2 = 0.9994$).

2.4 Determination of flavonoids

The analysis was made according to Woisky and Salatino.¹⁴ To 2 mL of the reference solution, 20 mL of methanol and 1 mL of 5% $AlCl_3$ (w/v) were added and the volume was made up to 50 mL with methanol at 20°C. After 30 minutes, the absorbance was measured at 425 nm in a Shimadzu-UV-1201 spectrophotometer. The same procedure was made to analyse of the extract. The blank was the 5% $AlCl_3$ (w/v) alone. The estimation of flavonoids was carried out in triplicate. The total flavonoid content was calculated on the basis of the standard curve for quercetin and it was expressed as microgram equivalents of quercetin per gram of linseed. The equation obtained for standard curve of quercetin in the range of 0.02 – 0.60 mg/mL was $y = 0.891x + 0.0149$ ($R^2 = 0.9723$).

2.5 Determination of ascorbic acid content

Sulphuric acid solution 1 M was used to solubilize and prepare the curve of ascorbic acid used as reference. The reference sample was mixed with trichloroacetic acid 13,3% and 2,4-dinitrophenylhydrazine. The procedure followed the description of Jacques-Silva et al.¹⁵ After an incubation period, the sample was measured at 520 nm in a Shimadzu-UV-1201 spectrophotometer. The equation obtained for standard curve of ascorbic acid in the range of 1.5 – 4.5 mg/mL was $y = 0.0534x + 0.0713$ ($R^2 = 0.9790$). The extract was measured using the same procedure. The estimation of ascorbic acid concentration was carried out in triplicate.

2.6 HPLC analysis

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software. Reverse phase chromatographic analysis was carried out under gradient conditions using C18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 μ m diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 minutes and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 minutes, respectively, following the method described by Laghari et

al.¹⁶ The presence of six antioxidants compounds was investigated, namely, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, rutin and kaempferol. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.7 mL/min and an injection volume of 40 μ L. Detection wavelengths were set at 254 nm for gallic acid, 327 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. The sample and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.200 mg/mL for quercetin, rutin and kaempferol and 0.050 – 0.250 mg/mL for gallic, caffeic and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 13260x + 1276.4$ ($r = 0.9998$); chlorogenic acid: $Y = 12158x + 1174.9$ ($r = 0.9996$); caffeic acid: $Y = 14034x + 1527.5$ ($r = 0.9995$); rutin: $Y = 13721x + 1068.4$ ($r = 0.9997$); quercetin: $Y = 13794x + 1392.1$ ($r = 0.9999$) and kaempferol: $Y = 12647x + 1178.3$ ($r = 0.9995$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.7 Radical - scavenging capacity - DPPH assay

The antioxidant capacity of the extract was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method previously described by Choi et al.¹⁷ Spectrophotometric analysis (SHIMADZU-UV-1201) was used in order to determine the inhibition concentration (IC) and the inhibition percentage (IP %) of the crude extract. The DPPH quenching ability was expressed as IC₅₀ (concentration which gives 50% inhibition). Six different ethanol dilutions of the extract (2.5 mL), at 250; 125; 62.5; 31.25; 15.62; and 7.81 μ g/mL were mixed with 1.0 mL of a 0.3 mM DPPH ethanol solution. The absorbance was measured at 518 nm by spectrophotometer against a blank after 30 min of reaction at room temperature in the dark. DPPH solution (1.0 mL, 0.3 mM) plus ethanol (2.5 mL) was used as a control. Relative activity was calculated from the calibration curve of *L*-ascorbic acid standard solution working in the same experimental conditions. Inhibition of free radical by DPPH in percent (IP %) was calculated in following way, according to the **Equation 1**:

$$\text{Equation 1: } IP\% = 100 - [(ABS_{\text{SAMPLE}} - ABS_{\text{BLANK}}) / ABS_{\text{CONTROL}}] \times 100]$$

Where, ABS_{SAMPLE} is the absorbance of the test compound, ABS_{BLANK} is the absorbance of the blank (containing 1.0 mL of ethanol plus 2.5 mL of the plant extract solution) and $ABS_{CONTROL}$ is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound). IP% was plotted against sample concentration, and a linear regression curve was established in order to calculate the IC_{50} . Test was carried out in triplicate.

2.8 Selection of volunteers

Twenty individuals between the ages of 45 and 55 years, of both sexes, who meet the criteria of MS recommended by the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III),¹⁸ were recruited at Uruguaiana and enrolled in this study between November 2012 and December 2012. We selected twenty-four control subjects without MS in both sexes and aged-matched to the patients. We excluded from the study subjects who had cancer or lung and / or infectious disease, smokers and those using flaxseed routinely. All participants signed a consent form and lifestyle habits for each subject were assessed by a questionnaire. The volunteers received 40 grams aliquots (Rhee & Brunt, 2011) of golden linseed for daily use for a period of 28 days (Zhang et al., 2008). Twenty patients with MS and twenty-four healthy volunteers completed the study. This study was approved by the Ethics and Research of the Federal University of Pampa (Protocol n°. 140.593/2012).

2.9 Blood sample collection

Fasting morning blood samples were taken at the beginning and end of the 28 days of supplementation study. Blood was drawn from the antecubital vein into prechilled tubes containing EDTA (Vacutainer - Becton, Dickinson and Company – New Jersey – USA). The plasma were collected after centrifugation at 1500 x g for 10 min and analyzed immediately.

2.10 Oxidative parameters

The following oxidative parameters were measured using spectrophotometric methods: vitamin C,¹⁵ polyphenols,²⁰ lipid peroxidation²¹ and protein carbonyls²² in plasma; assessment of DNA damage²³ and micronucleus frequency in leukocytes;²⁴ reduced glutathione levels²⁵ and activity of superoxide dismutase (kit RANSOD - RANDOX Brasil LTDA), catalase²⁶ and glutathione peroxidase (kit RANSEL - RANDOX Brasil LTDA) in erythrocytes. All assays were carried out in triplicate.

2.12 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between before and after supplementation were performed using a t test for paired samples. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Phytochemical analysis

The concentrations of the phytochemicals constituents analyzed in the golden linseed sample used in this study are shown in Table 1. We found concentrations of 10560 ± 839 $\mu\text{g/g}$, 3740 ± 642 $\mu\text{g/g}$, 155.04 ± 28.14 $\mu\text{g/g}$, 416.08 ± 35.64 $\mu\text{g/g}$, 419.60 ± 19.39 $\mu\text{g/g}$, 371.18 ± 56.32 $\mu\text{g/g}$, 715.76 ± 64.19 $\mu\text{g/g}$, 574.22 ± 37.86 $\mu\text{g/g}$ e 695.80 ± 46.32 $\mu\text{g/g}$ for polyphenolic compounds, total flavonoids, ascorbic acid, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin and kampferol respectively. In the DPPH test, the linseed sample showed an IC_{50} of 0.226 mg/mL.

3.2 Oxidative parameters

The control subjects had baseline characteristics considered normal for healthy individuals, according to Stahl et al and patients with MS were within the cutoff values for syndromic individuals, according to the NCEP-ATP III.^{27,18}

Figure 1 shows the results of biomarkers of oxidative damage, before and after 28 days of supplementation. Figure 1A shows the results of lipid peroxidation (TBARS). After supplementation, the malondialdehyde (MDA) levels were significantly reduced ($p < 0.05$), in both control subjects and patients with MS. In Figure 1B it can be seen significant reductions ($p < 0.05$) in protein carbonyl levels in both groups. Figures 1C and 1D show the results of the comet assay and micronucleus test, respectively. There were no significant changes ($p < 0.05$) in these two tests that assess DNA damage.

Figure 2 shows the concentrations of the compounds responsible for the non-enzymatic antioxidant defenses. We found a significant increase ($p < 0.05$) of GSH and vitamin C levels (Figure 2A and Figure 2B, respectively) in both groups. Golden linseed supplementation significantly reduced ($p < 0.05$) the serum polyphenols levels in both groups (Figure 2C).

The levels of enzymatic antioxidants evaluated in this study are shown in Figure 3. It was possible to observe a statistically significant increase ($p < 0.05$) in SOD, CAT and GPx activities after linseed supplementation in control subjects and in patients with MS (Figures 3A, 3B, 3C, respectively).

4 Discussion

The phytochemical analysis of the golden linseed sample showed high concentration of polyphenolic compounds, mainly flavonoids and phenolic acids. Polyphenols are common components in plant foods and are the most abundant antioxidants in our diet.²⁸ Many studies have shown that, when added to the diet, they hamper the development of disorders associated with oxidative stress such as cancer, CVD, neurodegenerative diseases, DM and MS.²⁹ In oilseeds, such as linseed, polyphenols occur as hydroxylated derivatives of benzoic and cinnamic acids, coumarins, flavonoids and lignans.³⁰ The DPPH assay is a widely used method for evaluation of *in vitro* antioxidant potential of extracts.³¹ The technique is based on the ability of antioxidant compounds present in the sample to sequester DPPH.³² According to Wojdylo et al, the inhibition of DPPH radical activity shows a correlation with the total phenolic content, therefore the high inhibition capacity found in this study confirms the elevated concentration of these phytochemicals and their high antioxidant power.³³

Oxidative stress is a condition resulting from an imbalance between production and inactivation of ROS and plays an important role in the pathogenesis of several diseases.^{34,35} The MS has often been associated with increased ROS levels.³⁶ ROS attack unsaturated fatty acids in biological membranes, resulting in lipid peroxidation as well as desaturation of proteins and DNA. Many functional foods have been studied for reducing the oxidative damage and linseed has been shown to produce antioxidant effects in human and animal models studies.^{7,37,38}

Lipid peroxidation is a complex process that involves the interaction of ROS with polyunsaturated fatty acids, resulting in a variety of highly reactive electrophilic aldehydes and malondialdehyde (MDA) is the major product.^{39,40} In this study, lipid peroxidation was assessed by measuring thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels and the results were expressed as MDA equivalents. The reduction in MDA levels after linseed supplementation demonstrates a reduction in lipid peroxidation in both healthy subjects and patients with MS. In agreement with these findings, a study by Rhee & Brunt demonstrated a

reduction of lipid peroxidation after 12 weeks of supplementation with 40 g of linseed in obese glucose intolerant people.⁷

The oxidative modifications of proteins caused by ROS affect primarily amino acid side chains and the carbonyl group formation is one of the products of these modifications.⁴¹ The presence of carbonyl groups in proteins is widely accepted as a marker of oxidative damage in aging and disease situations.^{22,42} The results of this study show a decrease in protein carbonyl levels after linseed supplementation in both groups, indicating a reduction in oxidative protein changes. Chang et al demonstrated a reduction in protein carbonyl levels after dietary intervention with high content of polyphenols, suggesting that they are responsible for protection against oxidative damage to proteins.⁴³

In addition to lipid and protein oxidation, ROS can also cause DNA damage. The modifications include damage and fragmentation of the DNA bases and, if not repaired, may lead to chromosomal mutations that disrupt the normal gene expression and create abnormal proteins that are detrimental to cell viability and cellular function.⁴⁴ The comet assay is a technique based on electrophoretic migration of DNA fragments. It is a rapid, sensitive and relatively simple method for detecting DNA damage and is widely accepted as a standard method for assessing DNA damage in individual cells.⁴⁵ Another biomarker for DNA damage widely used in humans because of its simplicity and rapidity is a measure of the micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes, which represents fragments or whole chromosomes that fail to engage with the mitotic spindle and are back when the cell divides.^{46,47,48} Although studies show oxidative DNA damage may play an important role in many diseases, there is little evidence demonstrating cytogenetic alterations in individuals with MS.⁴⁹ In this study, the comet assay and micronucleus frequency were used to assess DNA damage in healthy individuals and patients with MS and to evaluate the possible role of linseed in reversing this damage. Both groups showed normal values in these two tests before and after supplementation, demonstrating that MS is not associated with changes in DNA and that linseed is not able to produce cytogenetic changes. These findings are consistent with studies of Bup et al, who found no changes in DNA damage after 14 days of consumption of polyphenol-rich beverages.⁵⁰

Studies have shown that diets rich in antioxidants are able to protect against oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids.⁵¹ Linseed, as we show in phytochemical analysis, has a high concentration of polyphenols and vitamin C. Polyphenols are secondary metabolites of plants and constitute the largest group of natural antioxidants.^{52,53} Regular consumption of foods rich in polyphenols can increase the potential of antioxidant defense

against oxidative damage and prevent oxidation of lipids and proteins by neutralizing certain free radicals.⁴³ This study demonstrated a reduction in levels of plasma polyphenols in the two study groups after supplementation. It is known that linseed has a high concentration of alpha-linolenic acid (ALA), which can generate ROS after its metabolism, suggesting that the reduction in polyphenols levels may be related to their ability to neutralize these species.³⁵ Furthermore, Machado et al observed that the bioavailability of polyphenols increases 1 hour after the ingestion of polyphenols-rich foods and reduces dramatically after 4 hours, suggesting the need for regular and frequent consumption of antioxidant foods throughout the day to maintain high plasma levels of polyphenols.⁵⁴ Thus, although linseed has a high concentration of polyphenols, they probably were not more available at the time of blood collection, since the last intake of linseed by volunteers in this study was approximately 24 hours before the last blood collection.

Vitamin C (ascorbic acid) is considered the most important water-soluble antioxidant found in the human body. It protects compounds in extracellular and intracellular spaces, and can directly scavenge superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals.⁵⁵ Many *in vivo* studies show a reduction in markers of oxidative lipids, proteins and DNA damage after supplementation with vitamin C-rich foods.⁵⁶ Increased vitamin C levels found in this study are directly related to the high concentration of ascorbic acid present in linseed.

GSH is an endogenous antioxidant widely distributed in living cells and it is the most abundant non-protein thiol source in mammals.^{57,58} The protection of GSH against oxidative stress occurs through the reaction of sulfhydryl group (-SH) with free radicals.^{57,59} In this study, we demonstrated an increase in GSH after supplementation with linseed, indicating that protection from oxidative damage is increased. These findings are consistent with studies, which showed that polyphenols-rich foods, especially flavonoids, are able to stimulate transcription of an essential gene for GSH synthesis, increasing its level and, therefore, the protection against free radicals.^{60,61}

In addition to these non-enzymatic antioxidants, our body has endogenous antioxidant enzymes, which are vital for regulation of oxidative stress within cells.⁶² The main enzymes involved in this protection are catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). CAT is a widely studied heme protein and is the most efficient enzyme for the decomposition of hydrogen peroxide into water and molecular oxygen without the production of free radicals.⁶³ SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion radicals to form hydrogen peroxide and molecular oxygen.⁶⁴ GPx is a selenoenzyme that protects against oxidative stress by catalyzing the reduction of hydroperoxides with thiol cofactors, and GSH

is the most efficient cofactor.⁶⁵ Our results showed an increase in the activity of these three antioxidant enzymes after 28 days of supplementation. These results are in agreement with the findings of Rajesha et al, which evaluated the antioxidant effect of linseed using a model of tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in albino rats and observed protective effect of linseed by restoration of these enzymes in the liver.³⁷ It is believed that consumption of polyphenols-rich foods and beverages cause an increase in antioxidant enzyme activities by regulation of genes that encode these enzymes.^{37,66}

5 Conclusion

In conclusion, the findings of this study demonstrate that 28 days of supplementation with golden linseed produces a reduction in oxidative damage to lipids and proteins. Moreover, the treatment was able to enhance enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in both healthy subjects and patients with MS. It is known that the development of MS is associated with oxidative stress, and supplementation with golden linseed may be a useful adjuvant in the treatment of MS by improving the antioxidant status.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Galvão EL, Silva DCF, Silva JO, et al. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciênc Tecnol Aliment* 2008; 28: 551-557.
2. Anwar F and Przybylski R. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2012; 11: 293-301.
3. Pan A, Yu D, Demark-Wahnefried W, et al. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 288-297.
4. Taylor CG, Noto AD, Stringer DM, et al. Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr*, 2010; 29: 72-80.

5. Pacheco JT, Daleprame JB and Boaventura GT. Impact of dietary flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation on biochemical profile in healthy rats. *Nutr Hosp* 2011; 26: 798-802.
6. Moniem AEA, Dkhil MA and Al-Quraishy S. Protective role of flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. *Afr J Biotechnol* 2010; 9: 7216-7223.
7. Rhee Y and Brunt A. Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *Nutr J* 2011; 10: 44-50.
8. Sisodia R, Patni S and Shrivastava P. Modulation of radiation induced oxidative damage in brain of Swiss albino mice by flaxseed oil. *Asian J Exp Sci* 2012; 26: 61-70.
9. Chongwatpol P. Body fat distribution, dietary and serum antioxidants, and insulin resistance of older Oklahoma women with and without metabolic syndrome. Dissertation, Oklahoma State University, USA, 2009.
10. Amir K, Watanabe M, Yokotsuka M, et al. Changes in serum fatty acids and effects of metabolic syndrome induced by intermittent flaxseed-oil supplementation. *Ningen Dock* 2012; 26: 927-934.
11. Barre DE. Impact of dietary flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation on biochemical profile in healthy rats. *J Oleo Sci* 2007; 56: 319-325.
12. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752.
13. Chandra S and de Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3583–3589.
14. Woisky RG and Salatino A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res* 1998; 37: 99-105.
15. Jacques-Silva MC, Nogueira CW and Broch LC. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 119–125.
16. Laghari AH, Memon S, Nelofar A, Khan KM and Yasmin A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem* 2011; 126: 1850-1855.
17. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH and Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 2002; 163: 1161-1168.

18. The third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
19. Zhang W, Wang X, Liu Y, et al. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *Brit J Nut*, 2008; 99: 1301-1309.
20. Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 1999; 299: 152- 178.
21. Ohkawa H, Ohishi H and Yagi K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
22. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 1990; 186: 464-487.
23. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
24. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
25. Akerboom TPM and Sies H. Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method Enzymol* 1981; 77: 373-382.
26. Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984; 105: 121-127.
27. Stahl CH, Novak M, Lappas G, et al. High-normal blood pressure and long-term risk of type 2 diabetes: 35-year prospective population based cohort study of men. *BMC Cardiovasc Disord* 2012; 12: 89-96.
28. Scalbert A and Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130: 2073S-2085S.
29. Scalbert A, Manach C, Morand C, et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci* 2005; 45: 287-306.
30. Cupersmid L, Fraga APR, Abreu ES, et al. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. *E-Sci* 2012; 5: 33-40.
31. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2005; 26: 211-219.
32. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006; 26: 446-452.

33. Wojdylo A, Oszmianski J and Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 2007; 105: 940-949.
34. Roberts CK and Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sci* 2009; 84: 705-712.
35. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-1761.
36. Sjogren P, Basu S, Rosell M, et al. Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2580-2586.
37. Rajesha J, Murthy KN, Kumar MK, et al. Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model. *J Agr Food Chem* 2006; 54: 3794-3799.
38. Hu C, Yuan YV and Kitts DD. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 2219-2227.
39. Tsang AHK and Chung KKK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 643-650.
40. Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin* 1998; 56:305-319.
41. Tamarit J, de Hoogh A, Obis E, et al. Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *J Proteomics* 2012; 75: 3778-3788.
42. Stadtman ER and Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208.
43. Chang WH, Hu SP, Huang YF, et al. Effect of purple sweet potato leaves consumption on exercise-induced oxidative stress and IL-6 and HSP72 levels. *J Appl Physiol* 2010; 109: 1710-1715
44. Furness DL, Dekker GA and Roberts CT. DNA damage and health in pregnancy. *J Reprod Immunol* 2011; 89: 153-162.
45. Fikrova P, Stetina R, Hronek M, et al. Application of the comet assay method in clinical studies. *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123: 693-699.
46. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, et al. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis* 2011; 26: 77-83.
47. Fenech M and Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011; 26: 43-49.

48. El-Zein R, Vral A and Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* 2011; 26: 101-106.
49. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *Faseb J* 2003; 17: 1195–1214.
50. Bub A, Watzl B, Blockhaus M, et al. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 90-98.
51. Katz DL, Doughty K and Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2779-2811.
52. Hu Y, Guo DH, Liu P, et al. Bioactive components from the tea polyphenols influence on endogenous antioxidant defense system and modulate inflammatory cytokines after total-body irradiation in mice. *Phytomedicine* 2011; 18: 970-975.
53. Ciesla L, Kowalska I, Oleszek W, et al. Free radical scavenging activities of polyphenolic compounds isolated from *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* assessed by means of thin-layer chromatography DPPH rapid test. *Phytochem Analysis* 2012; 24: 47-52.
54. Machado MM, Montagner GFFS, Boligon A, Athayde ML, Rocha MIUM, Lera JPB, Belló C and Cruz IBM. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Quim Nova* 2011; 34: 798-803.
55. Klimczak I, Malecka M, Szlachta M, et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Comp Anal* 2007; 20: 313-322.
56. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
57. Gadea J, Molla M, Selles E, et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011; 62: 40-46.
58. Perluigi M, Di Domenico F, Giorgi A, et al. Redox proteomics in aging rat brain: Involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J Neurosci Res* 2010; 88: 3498-3507.
59. Wu H, Pan A, Yu Z, et al. Lifestyle counseling and supplementation with flaxseed or walnuts influence the management of metabolic syndrome. *J Nutr* 2010; 140: 1937-1942.
60. Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström O, et al. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Bio Med* 2002; 32: 386-393.

61. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MCW, et al. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 277S-283S.
62. Gutteridge JC and Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 136-147.
63. Goyal MM and Basak A. Human catalase: Looking for complete identity. *Protein Cell* 2010; 1: 888-897.
64. Agarwal R, MacMillan-Crow LA, Rafferty TM, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 110-116.
65. Bhabak KP and Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: Bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts Chem Res* 2010; 43: 1408-1419.
66. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 577-586.

Figure 1.

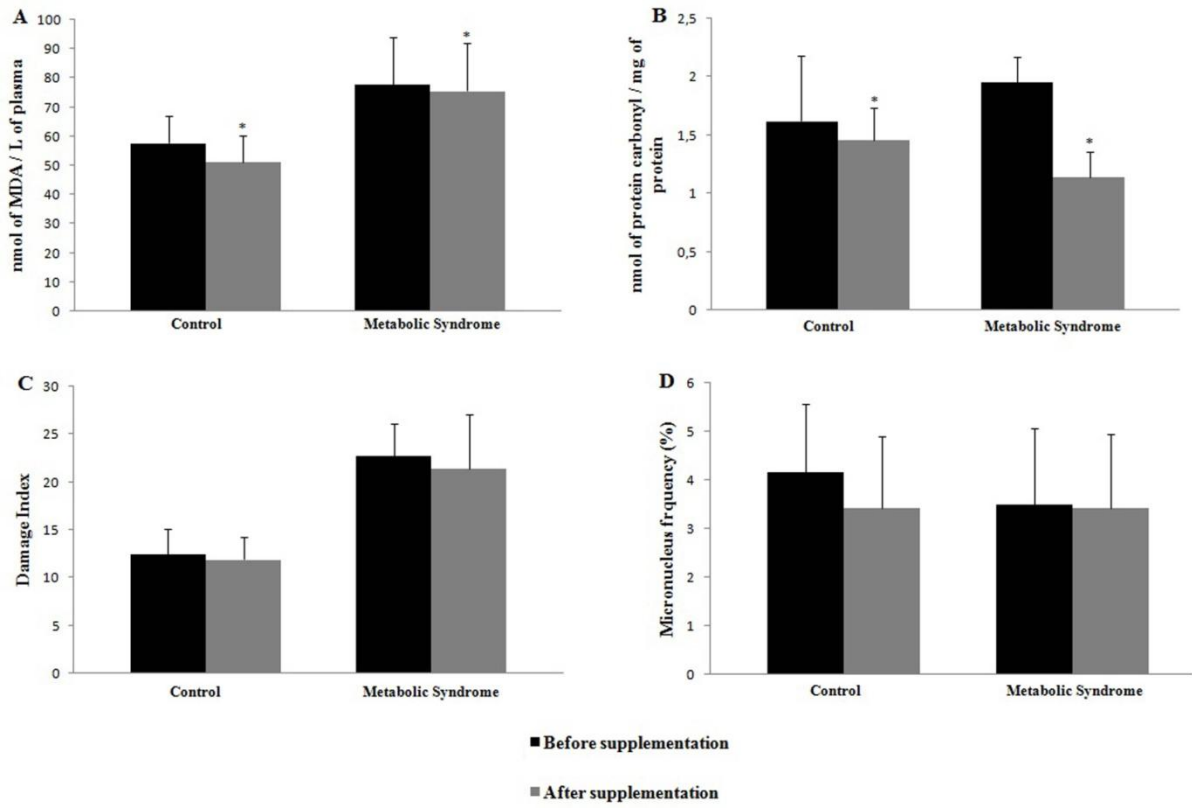


Figure 2.

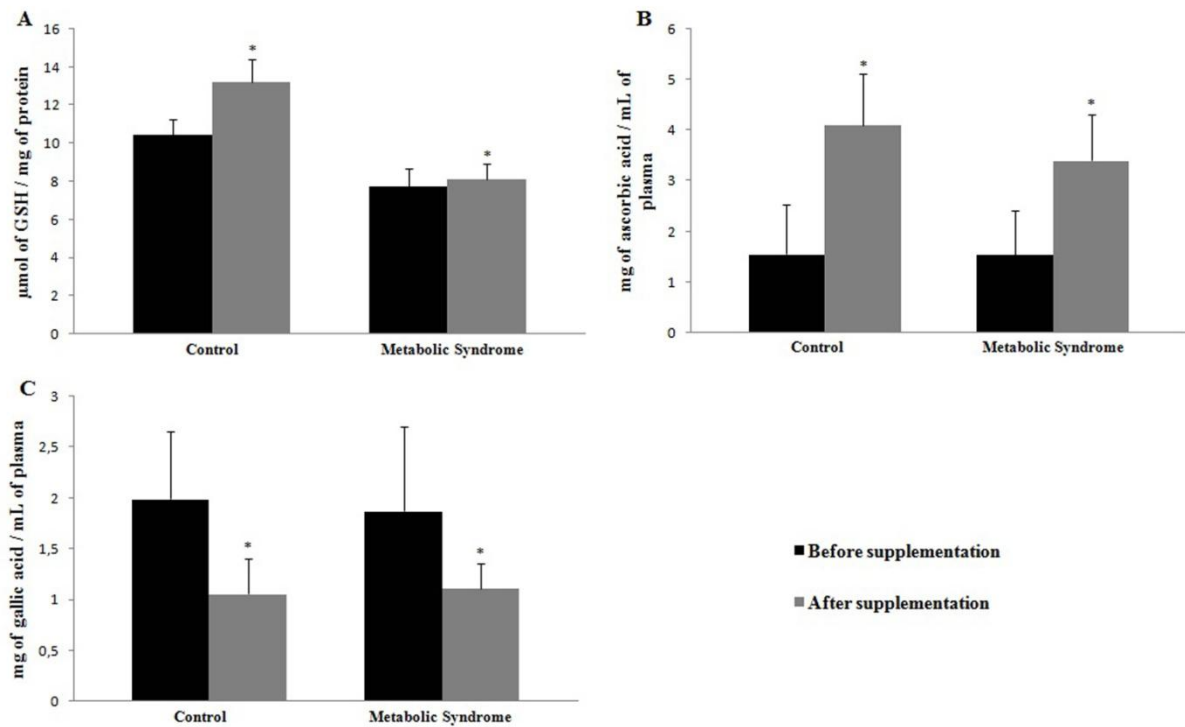


Figure 3.

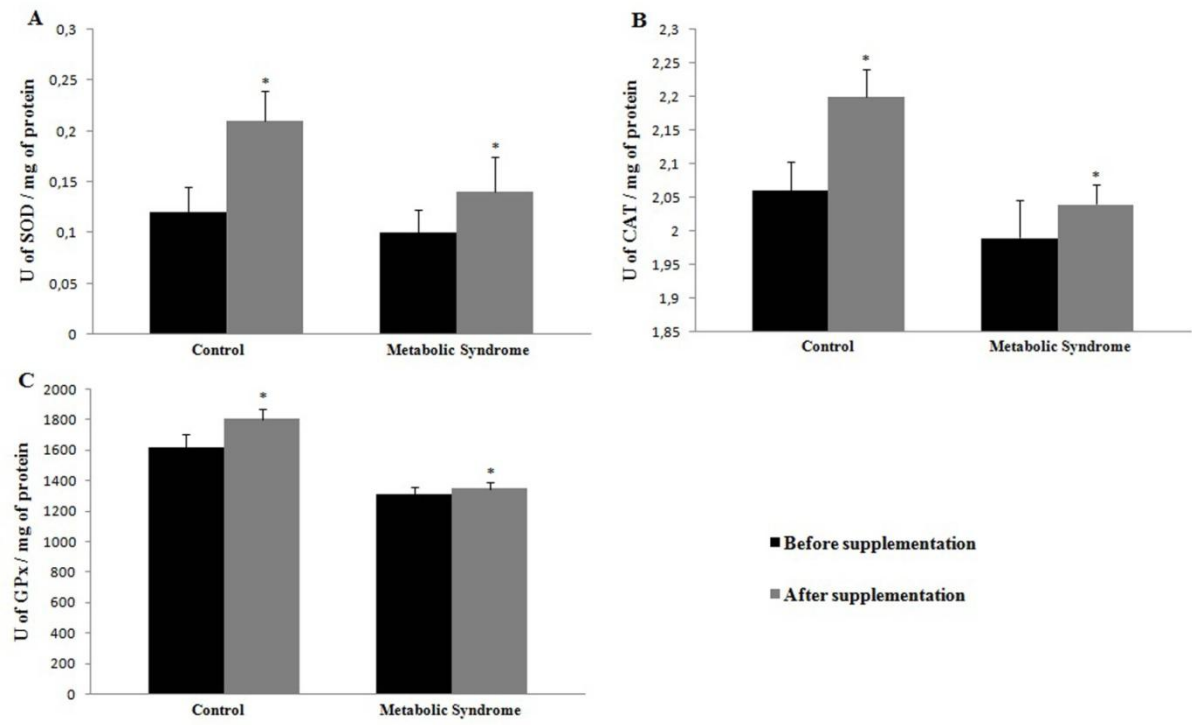


Figure captions

Fig. 1: Biomarkers of oxidative damage in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed. A. Lipid peroxidation (TBARS). B. Protein carbonyl levels. C. Comet assay. D. Micronucleus test. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the groups before and after supplementation.

Fig. 2: Non-enzymatic antioxidant levels in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed. A. GSH levels. B. Vitamin C levels. C. Polyphenol levels. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the groups before and after supplementation.

Fig. 3: Enzymatic antioxidant defenses in controls and patients before and after 28 days of supplementation with golden linseed. A. SOD activity. B. CAT activity. C. GPx activity. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the groups before and after supplementation.

Table 1: Phytochemical analysis of golden linseed used in this protocol.

Group / Compound	Golden Linseed (in $\mu\text{g/g}$ of linseed)
Polyphenolic compounds ^a	10560 \pm 839
Total flavonoids ^a	3740 \pm 642
Ascorbic acid ^a	155.04 \pm 28.14
Gallic acid ^a	416.08 \pm 35.64
Chlorogenic acid ^a	419.60 \pm 19.39
Caffeic acid ^a	371.18 \pm 56.32
Rutin ^a	715.76 \pm 64.19
Quercetin ^a	574.22 \pm 37.86
Kaempferol ^a	695.80 \pm 46.32

^aData are expressed as means \pm SD. Each experiment was repeated three times in triplicate.

PARTE III

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que:

- A semente de linhaça dourada é rica em polifenóis e vitamina C;
- 28 dias de suplementação com semente de linhaça dourada não é capaz de melhorar parâmetros antropométricos e pressóricos ou de reduzir o dano oxidativo ao DNA;
- A semente de linhaça dourada é capaz de melhorar a glicemia de jejum, o perfil lipídico, as funções cardíaca e renal, além dos parâmetros de estresse oxidativo, tais como peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, e os níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos após 28 dias de suplementação, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com SM;

Assim, sugere-se que a suplementação com semente de linhaça dourada pode atuar como adjuvante no tratamento da SM, uma vez que traz benefícios sobre os parâmetros bioquímicos e o status antioxidante.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas futuras:

- Determinar marcadores inflamatórios como proteína C-reativa ultra sensível (PCR-US), interleucina 1B (IL-1B), interleucina 6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral α (TNF- α);
- Determinar a concentração sérica de apolipoproteínas (B e AI);
- Determinar os níveis de óxido nítrico basal.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A. E.; DKHIL, M. A.; AL-QURAIHY, S. The potential role of flaxseed oil on lead acetate-induced kidney injure in adult male albino rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1436-1451, 2011.
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, p. 1059, 1063, 2005.
- AMIR K. et al. Changes in serum fatty acids and effects of metabolic syndrome induced by intermittent flaxseed-oil supplementation. **Ningen Dock**, v. 26, n., p. 927-934, 2012.
- ANWAR, F.; Przybylski, R. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 11, n. 3, p. 293-301, 2012.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.
- BARRE, D. E. Impact of dietary flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation on biochemical profile in healthy rats. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 7, p. 319-325, 2007.
- BATINIC-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 6, p. 877-918, 2010.
- BJÖRNTORP, P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome. **Annals of medicine**, v. 24, n. 6, p. 465-468, 1992.
- BLAND, J. S. Metabolic syndrome: the complex relationship of diet to conditions of disturbed metabolism. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 2, p. 1-12, 2011.
- BLOEDON, L. T. et al. Flaxseed and cardiovascular risk factors: Results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2008.
- BUSS, H. et al. Protein carbonyl measurement by a sensitive elisa method. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 3, p. 361-366, 1997.
- CASÉ, F. et al. Produção de 'leite' de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 86-91, 2005.
- COOKE, M.S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.
- COUTO, A. N.; WICHMANN, F. M. A. Efeitos da farinha de linhaça no perfil lipídico e antropométrico. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 601-608, 2011.

- CUPERSMID, L. et al. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. **E-Scientia**, v. 5, n. 2, p. 33-40, 2012.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.
- DOMINGUEZ-REBOLLEDO, Á. E. et al. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C₁₁ probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. e360-e368, 2010.
- ECKEL, F. G.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, p. 1415-1428, 2005.
- EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 101-106, 2011.
- FIKROVA, P. et al. Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 123, n. 23-24, p. 693-699, 2011.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FLORES DO AREAL. **Linum usitatissimum subsp. angustifolium (Huds.) Thell.** 2011. Disponível em: <<http://floresdoareal.blogspot.com.br/2011/10/linum-usitatissimum-subsp-angustifolium.html>>. Acesso em 10 de dezembro de 2013.
- FURNESS, D. L.; DEKKER, G. A.; ROBERTS, C. T. DNA damage and health in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 89, p. 153-162, 2011.
- GADEA, J. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology**, v. 62, p. 40-46, 2011.
- GALVÃO, E. L. et al. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 551-557, 2008.
- GILL, K. S.; YERMANOS, D. M. Cytogenetic studies on the genus *linum* i. hybrids among taxa with 15 as the haploid chromosome number. **Crop Science**, v. 7, n. 6, p. 623-627, 1967.
- GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: Looking for complete identity. **Protein & Cell**, v. 1, n. 10, p. 888-897, 2010.
- GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome. **Circulation**, v. 109, p. 433-438, 2004.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.
- GUTTERIDGE, J. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HANSON, R. L. et al. Components of the “metabolic syndrome” and incidence of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 3120-3127, 2002.

I-DBSM. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES / ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDOS DA OBESIDADE. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 1, p. 2-28, 2005.

ISOMAA, B. et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 24, n. 4, p. 683-689, 2001.

KHAN, M. I. et al. Tackling metabolic syndrome by functional foods. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 14, p. 287-297, 2013.

KLIMCZAK, I. et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

KYLIN, E. Studien. Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrome. **Zentralblatt für innere Medizin**, v. 44, 1923.

LEFÈVRE, G. et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. **Annales de Biologie Clinique**, v. 56, n. 3, p. 305-319, 1998.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-487, 1990.

LIMA, T.L. **Avaliação dos efeitos da ingestão de semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em ratos wistar fêmeas**. 2008. Monografia de Conclusão de Curso, Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, 2008.

LORENZO, C. et al. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 11, p. 3153-3159, 2003.

MARQUES, A.C. **Propriedades funcionais da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. 115 f. Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MOLENA-FERNANDES, C. A. et al. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução

ponderal em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 201-207, 2010.

MONEGO, M.A. **Goma da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) para uso como hidrocolóide na indústria alimentícia**. 2009. 89 f. Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

MONIEM, A. E. A; DKHIL, M. A; AL-QURAI SHY, S. Protective role of flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 42, p. 7216-7223, 2010.

MONTAGNER, G. F. F. S et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1410-1416, 2010.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORRIS, D. H. **Linaza - una recopilación sobre sus efectos en la salud y nutrición**. 4. ed. Winnipeg: Flax Council of Canada, 2007.

MOSKAUG, J. O. et al. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 277S-283S, 2005.

MOTTILLO, S. et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk - a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 14, p. 1113-1132, 2010.

MYKKÄNEN, L. et al. Microalbuminuria is associated with insulin resistance in nondiabetic subjects. **Diabetes**, v. 47, p. 793-800, 1998.

NCEP-ATP III. The third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 2486-2497, 2001.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G.; KENASCHUK, E. O. Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment. **Euphytica**, v. 90, p. 163-167, 1996.

PACHECO, J. T.; DALEPRAME, J. B.; BOAVENTURA, G. T. Impact of dietary flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation on biochemical profile in healthy rats. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 4, p. 798-802, 2011.

PAN, A. et al. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 2, p. 288-297, 2009.

QUERO SAÚDE. **Qual tipo de linhaça escolher? Dourada ou marrom?** 2013. Disponível em: <<http://querosaude.com.br/linhaça-dourada-ou-marrom/>>. Acesso em 10 de dezembro de 2013.

RAJESHA, J. et al. Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3794-3799, 2006.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595–1607, 1988.

RHEE, Y.; BRUNT, A. Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. **Nutrition Journal**, v. 10, p. 44-50, 2011.

SANTOS, C. R. B. et al. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 389-401, 2006.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v.130, p. 2073S-2085S, 2000.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole *versus* processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 376-387, 2009.

SIES, H. Physiological society symposium:impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 292-295, 1997.

SIRÓ, I. et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance -a review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

SISODIA, R.; PATNI, S.;SHRIVASTAVA. P. Modulation of radiation induced oxidative damage in brain of Swiss albino mice by flaxseed oil. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 26, n. 2, p. 61-70, 2012.

SMEDS, A. I. et al. Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1337-1346, 2007.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 191-208, 2000.

TANNO, M. et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of sirt1 promotes cell survival in chronic heart failure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8375-8382, 2010.

TAYLOR, C. G. et al. Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 72-80, 2010.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2006.

TSANG, A. H. K.; CHUNG, K. K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1792, p. 643-650, 2009.

VAGUE, J. La differenciation sexuelle, facteur determinant des formes de l'obesite. **La Presse Médicale**, v. 30, p. 339-340, 1947.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANCINI, R.L. et al. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 10, n. 2, p. 47-58, 2005.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VI-DBH. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 9, n. 1, p. 1-51, 2010.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; TEIXEIRA, F. C. **Alimentos funcionais: conceitos básicos**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

WHO - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic, Report of a WHO consultation. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 894, p. 1-253, 2000.

WU, H. et al. Lifestyle counseling and supplementation with flaxseed or walnuts influence the management of metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 1937-1942, 2010.

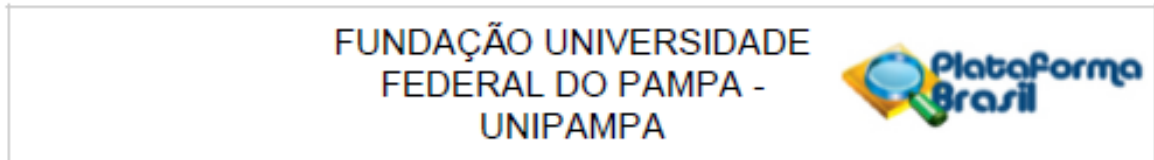
YUDKIN, J. S. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? **Diabetes Care**, v. 22, n. 3, p. C25-C30, 1999.

ZANWAR, A. A.; HEGDE, M. V.; BODHANKAR, S. L. Cardioprotective activity of flax lignin concentrate extracted from seeds of *Linum usitatissimum* in isoprenaline induced myocardial necrosis in rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 90-97, 2011.

ZHANG, W. et al. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 1301-1309, 2008.

9. ANEXOS

9.1 Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SEMENTE DE *Linum usitatissimum* L. EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Pesquisador: VANUSA MANFREDINI

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 3

CAAE: 06505112.0.0000.5323

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Pampa UNIPAMPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 140.593

Data da Relatoria: 26/11/2012

Apresentação do Projeto:

De acordo com o projeto:

As pessoas têm cada vez mais buscado alimentos funcionais para obtenção de uma dieta mais saudável e equilibrada. Entre esses alimentos, a semente de linhaça tem sido muito estudada devido a sua capacidade de reduzir os lipídios sanguíneos e produzir efeitos antioxidantes. Estudos com humanos e animais indicam que o aumento da ingestão de linhaça está inversamente relacionado com os sintomas da Síndrome Metabólica, a qual é uma doença que vem aumentando rapidamente, tornando-se motivo de grande preocupação. Sabendo-se que estudos científicos têm demonstrado efeitos positivos do uso da linhaça sobre os perfis lipídico, glicêmico e de estresse oxidativo e que não foi encontrado nenhum trabalho demonstrando o efeito da mesma em pacientes com síndrome metabólica, este estudo se propõe a avaliar os efeitos da linhaça nesses pacientes. Assim, o objetivo desse trabalho será avaliar os efeitos da suplementação com semente de linhaça dourada em pacientes com síndrome metabólica. Serão coletadas amostras de sangue venoso antes do uso da semente de linhaça e após 4 semanas de ingesta. O estudo compreenderá parâmetros antropométricos, medida da pressão arterial, avaliação da glicemia de jejum e do perfil lipídico e parâmetros de estresse oxidativo, tais como a avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e do dano oxidativo em lipídeos, proteínas e no material genético. As expectativas desse projeto referem-se a resultados que justifiquem o uso deste alimento funcional como adjuvante no tratamento de pacientes com

Síndrome Metabólica. Espera-se, assim, com base em um estudo científico, contribuir para a melhoria da saúde e, conseqüentemente, da qualidade de vida desses pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos da suplementação com semente de linhaça dourada em pacientes com síndrome metabólica.

Objetivo Secundário:

- Aferir a pressão arterial em controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada.
- Determinar os parâmetros antropométricos: Índice de Massa Corpórea (IMC), circunferência abdominal e razão cintura/quadril em controles e nos pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Obter a glicemia de jejum em controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Determinar o perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides) em controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes (Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase) em controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Determinar o dano oxidativo em proteínas, lipídeos e material nuclear em controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada
- Obter o conteúdo de polifenóis no soro de controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PAMPA -
UNIPAMPA



- Determinar os níveis de Vitamina C no soro em controles e pacientes com síndrome metabólica antes e após 4 semanas de suplementação com a semente de linhaça dourada;
- Correlacionar parâmetros de estresse oxidativo com o perfil lipídico e parâmetros antropométricos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Critério de Inclusão:

Serão incluídos no estudo homens e mulheres com idade entre 45 e 55 anos, que atendam aos critérios da síndrome metabólica e que participam das atividades coordenadas pelo Núcleo de Estudos e Pesquisa sobre Envelhecimento (NEPE UNIPAMPA). Para a definição dos pacientes com síndrome metabólica será adotado os critérios do National Cholesterol Education Program (NCEP). Serão selecionados indivíduos controles sem síndrome metabólica de ambos os sexos e com idades pareadas a dos pacientes.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos da pesquisa os indivíduos que não atenderem aos critérios estabelecidos no item 4.1.1, além daqueles indivíduos com doenças renais, endocrinopatias, tabagistas e etilistas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui um tema bastante relevante tendo em vista que busca encontrar alternativas para melhorar a saúde e a qualidade de vida dos sujeitos com síndrome metabólica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de acordo com as normas.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as solicitações do parecer anterior. (Número do Parecer: 127.764 e Data da Relatoria: 17/10/2012)

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi redigido pela coordenadora do CEP, que de acordo com o estabelecido em reunião

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PAMPA -
UNIPAMPA



com os membros, pendências apenas documentais (falta de um número interno de registro) já sanadas não necessitariam aguardar a próxima reunião.

URUGUAIANA, 07 de Novembro de 2012

Assinador por:
GIULIA ALESSANDRA WIGGERS PEÇANHA
(Coordenador)

9.2 Trabalhos apresentados referentes a esta dissertação



40^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

13^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica
4^a Jornada Latinoamericana de Genética Forense
16 a 19 de junho de 2013 | Costão do Santinho - Florianópolis - SC

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o trabalho

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE LINUM USITATISSIMUM L. SOBRE AS DEFESAS ANTIOXIDANTES DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

dos autores **Bruna Cocco Pilar, Michel Mansur Machado, Luisa Zuravski, Ritiële Pinto Coelho, Leandro Leal Galarça, Deise Jaqueline Ströher, Angélica Aparecida da Costa Güllich, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Vanusa Manfredini** foi apresentado na sessão de temas livres do Congresso.

Rio de Janeiro, 19 de junho de 2013

Realização: **SBAC** Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Entidades Parceiras: **SBCC** **SLAGF** Sociedade Latinoamericana de GENÉTICA FORENSE

Dr. Irineu Kelserman Grinberg
Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Dr. Carlos Eduardo de Queiroz Lima
Presidente da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica

Dra. Mária Elizabeth Menezes
Presidente da Sociedade Latinoamericana de Genética Forense e Presidente da Comissão Científica do 40^o CBAC

Dr. Tércio Egor Paulo Kasten
Presidente do 40^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

40^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

13^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica
4^a Jornada Latinoamericana de Genética Forense
16 a 19 de junho de 2013 | Costão do Santinho - Florianópolis - SC

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o trabalho

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE LINHAÇA (LINUM USITATISSIMUM L.) SOBRE OS MARCADORES CARDÍACOS DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

dos autores **Bruna Cocco Pilar, Juliana Mezzomo, Ritiële Pinto Coelho, Luisa Zuravski, Leandro Leal Galarça, Deise Jaqueline Ströher, Angélica Aparecida da Costa Güllich, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Vanusa Manfredini** foi apresentado na sessão de temas livres do Congresso.

Rio de Janeiro, 19 de junho de 2013

Realização: **SBAC** Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Entidades Parceiras: **SBCC** **SLAGF** Sociedade Latinoamericana de GENÉTICA FORENSE

Dr. Irineu Kelserman Grinberg
Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Dr. Carlos Eduardo de Queiroz Lima
Presidente da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica

Dra. Mária Elizabeth Menezes
Presidente da Sociedade Latinoamericana de Genética Forense e Presidente da Comissão Científica do 40^o CBAC

Dr. Tércio Egor Paulo Kasten
Presidente do 40^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

VI International Conference on Polyphenols and Health

October 16-19, 2013
Buenos Aires, Argentina



CERTIFICATE

This is to certify that **Bruna Cocco Pilar** has presented the work entitled **"Supplementation with *Linum usitatissimum* L. increases polyphenols and vitamin C levels in patients with metabolic syndrome"** at the VI International Conference on Polyphenols and Health, held on October 16-19, 2013 at the University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Co-authors: Zuravski L, Coelho R, Ströher DJ, Güllich AAC, Machado MM, Piccoli JCE, Manfredini V.

César G. Fraga
Chair

Patricia I. Oteiza
Vice-Chair

Mónica Galleano
Scientific Secretary



Society For Free Radical Biology and Medicine South American Group

Buenos Aires, Argentina • October 14-17, 2013

CERTIFICATE

This is to certify that **Pilar, Brunna Cocco** has presented a scientific communication entitled **Supplementation with flaxseed prevents oxidative damage to biomolecules in patients with metabolic syndromein the VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine - South American Group, held on October 14-17, 2013, at the School of Law, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.**

César G. Fraga
President

Alberto Boveris
Honorary President



CBTOX 2013

**XVIII Congresso Brasileiro
de Toxicologia**
Os desafios da Toxicologia
frente às novas tecnologias

CERTIFICADO

7 a 10 de Outubro de 2013 - Centro de Eventos do Hotel Plaza São Rafael - Porto Alegre - RS

O trabalho intitulado

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE LINUM USITATISSIMUM L. SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

dos autores

PILAR B.C., PEREIRA M.P., COELHO R.P., ZURAVSKI L., GALARÇA L., STRÖHER D.J., GÜLLICH A.A.C., PICOLLI J.C.E.,
MANFREDINI V.

foi apresentado durante o **XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTOX 2013**, realizado entre os dias 7 e 10 de outubro de 2013, no Centro de Eventos do Hotel Plaza São Rafael, Porto Alegre/RS, na condição de Pôster.

Porto Alegre, 10 de outubro de 2013.


 Prof. Dr. José Luiz da Costa
 Presidente da Soc. Brasileira de Toxicologia - SBTOx


 Prof. Dr. Renata Pereira Limberger
 Presidente do Comitê Organizador do CBTOX 2013







CERTIFICADO

O Comitê Científico do V Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE) certifica que **Muriel Pando Pereira** apresentou o trabalho intitulado **Efeito da Suplementação com Semente de Linum usitatissimum L. sobre Parâmetros Antropométricos e Pressóricos de Pacientes com Síndrome Metabólica**, de autoria de **Muriel Pando Pereira, Vanusa Manfredini, Bruna Cocco Pilar, Ritiele Pinto Coelho, Deise Jaqueline Strsher, Angélica Aparecida da Costa Göllich**, na categoria Pesquisa, na área Ciências da Saúde modalidade Apresentação Oral na Mostra Científica do V SIEPE, realizada entre os dias 30, 31 de Outubro e 01 de Novembro de 2013, em Bagé, RS.

Bagé, 04 de Novembro de 2013.


Ulrika Arns
 Reitora