

Elinete Eliete de Lima

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE GORDURAS  
INTERESTERIFICADA, NÃO INTERESTERIFICADA E  
PARCIALMENTE HIDROGENADA NO PERFIL  
NUTRICIONAL, BIOQUÍMICO E ESTRESSE OXIDATIVO  
EM CAMUNDONGOS BALB-C E NO  
DESENVOLVIMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich  
EM CAMUNDONGOS C57BL-6**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutora em Ciência dos Alimentos.  
Orientadora: Prof. Dra. Jane Mara  
Bloch  
Coorientador: Prof. Dr. Edson Luiz da  
Silva

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Lima, Elinete Eliete

Efeitos da suplementação de gorduras  
interesterificada, não interesterificada e  
parcialmente hidrogenada no perfil nutricional,  
bioquímico e estresse oxidativo em camundongos Balb  
c e no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich  
em camundongos C57BL-6 / Elinete Eliete de Lima ;  
orientador, Jane Mara Block, coorientador, Edson  
Luiz da Silva, 2019.

200 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Gordura  
interesterificada. 3. Ácidos graxos trans. 4. Ácido  
palmítico. 5. Câncer. I. Block, Jane Mara. II. da  
Silva, Edson Luiz. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
dos Alimentos. IV. Título.


EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GORDURA INTERESTERIFICADA, NÃO INTERESTERIFICADA E PARCIALMENTE HIDROGENADA NO PERFIL NUTRICIONAL, BIOQUÍMICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS BALB-C E NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS C57BL-6

Por


**Elinete Eliete de Lima**


Esta Defesa de tese foi julgada adequada para obtenção do Título “Doutorado em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 13 de março de 2019


  
Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa  
Coordenador


**Banca Examinadora:**

  
Prof.(a). Dr.(a). Jana Mara Block,  
Orientador (UFSC)

  
Prof.(a). Dr.(a). Sandra Soares Melo,  
Membro (UNIVALI)

  
Prof.(a). Dr.(a). Karina Bettega Felipe,  
Membro (UFPR)

  
Prof.(a). Dr.(a). Rozângela Curi Pedrosa,  
Membro (UFSC)

  
Prof.(a). Dr.(a). Emilia Addison Machado Moreira,  
Membro (UFSC)



*Este trabalho é dedicado à sociedade brasileira, que patrocinou os meus muitos anos de estudos em instituições públicas; aos meus pais, Haroldo Isidoro de Lima (in memoriam) e Eliete Caetano de Lima que, apesar de serem filhos de analfabetos e de terem poucos anos de estudos, acreditaram no poder transformador da educação, incentivando e dando condições para que seus seis filhos concluíssem no mínimo o ensino superior; e à minha filha Isabella de Lima Santos, que também acredita no poder da educação.*



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de muita gente e só foi possível por esta razão. Tanta gente que temo não serem devidamente lembradas... perdoe-me se isso acontecer.

Antes de tudo quero agradecer a força que faz a semente germinar, o sol nascer, os corações baterem, a vida se renovar...

Sou muito grata à minha mãe Eliete Caetano de Lima e ao meu pai Haroldo Isidoro de Lima (*in memoriam*) pela vida, pelo amor, pelo cuidado, pelos ensinamentos, pelos exemplos...

Sou imensamente grata à minha filha Isabella de Lima Santos, que muito amor e muitas alegrias me trouxe e me traz.

Agradeço também...

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela minha formação na graduação, pós graduação lato sensu, mestrado e doutorado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC), por viabilizar o afastamento das minhas atividades docentes para a realização do doutorado e aos gestores que sempre me apoiaram Daniela de Carvalho Carrelas, Nelda Plentz de Oliveira, Luiz Otávio Cabral, Caio Alexandre Martini Monti e Jane Parisenti.

À Profa. Dra. Jane Mara Block, por ter despertado em mim o prazer pelo estudo dos lipídeos, quando fui sua aluna na disciplina Química de Lipídeos, na condição de aluna especial, no ano de 2003. Fui tocada por sua motivação e clareza na condução das aulas; pela oportunidade de ingressar no doutorado e estudar o tema gordura interesterificada; pela orientação e apoio durante o processo.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz da Silva, coorientador deste trabalho, pelas pela disponibilidade em ajudar e pelas palavras de incentivo.

À Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa por oportunizar a realização dos estudos *in vivo* no biotério e no laboratório de bioquímica experimental, os quais lidera com muita competência; por ter incentivado sua equipe de orientandos a me auxiliar - auxílio este indispensável uma vez que minha formação não me preparou para as lidas de um laboratório de bioquímica - e também no cuidado dos animais quando precisei me ausentar por problema de saúde; pela orientação e apoio ao longo da caminhada.

Aos professores da banca de qualificação e defesa professoras Dra. Sandra Soares Melo, Dra. Karina Bettega Felipe, Dra. Rozangela Curi Pedrosa, Dra. Emília Addison Machado Moreira e Dra. Edna Regina Amante, pelo aceite ao convite e pelas importantes contribuições.

À Triângulo Alimentos pela doação das gorduras interesterificada e não interesterificada.

As colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFSC, em especial à Joseane Hilbig, Fernanda Demoliner, Rossana Podestá, Priscila Policarpo e Letícia Turcato por toda ajuda na confecção das rações, nas diversas análises bioquímicas, pelo companheirismo e pela amizade semeada.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental/LABIOEX/ Departamento de Bioquímica/UFSC, em especial à Valdelúcia Grinevicius, Nádia Sandrini Mota, Luiza Will Castro, Rodrigo Costa Zeferino, Cynthia Pádua, Eduardo Benedetti Parisotto, Tâmila Siminski, Gabriela M Almeida, Fabiana Ourique, Jean Carlos Benassi, Raquel Eckert Dreher, Daniela Coelho dos Santos, Guilherme Zirbel, Maicon Roberto Kwiecinski e Eduarda Rohling. Obrigada por tudo! Vocês são maravilhosos!!!

À equipe da Coordenação dos Laboratórios do Campus Continente / IFSC, em especial ao Prof. Caio Alexandre Martini Monti e Danielli Prado Dzioba Loss, que oportunizaram a confecção das rações enriquecidas com as gorduras experimentais e à todas as colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras e do Labioex que ajudaram no preparo das rações.

Ao Laboratório de Nutrição (LABNUTRI) do Laboratório de Análise de Biologia e Cultivo de Peixe de Água Doce (LAPAD) da UFSC, pela ajuda na análise centesimal da ração, em especial à Prof. Débora Machado Fracalossi, ao Jefferson, Janice, Liziane e Lucas.

À equipe do LAMEB da UFSC, especialmente à Vanessa e ao Denis pelo suporte técnico nas leituras das análises.

À colega Rossana Podestá pela ajuda no preparo das amostras para as análises de ácidos graxos e triglicerídeos.

Às técnicas Patrícia e Gisele do Labcal/UFSC e Renata Oselame Nóbrega/ Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal/UFSC pelo auxílio na leitura das amostras em CG, nas análises dos perfis de ácidos graxos.

À Dra. Roberta Claro da Silva/Faculdade de Ciências Farmacêutica/USP pelas análises de distribuição regioespecífica de ácidos graxos nos triglicerídeos.

Ao Prof. Dr. Iván Jachmanián, do Laboratorio de Grasas y Aceites/Facultad de Química - Universidad de la República (UDELAR)/Uruguay, pela análise dos perfis de triglicerídeos.



Ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC. A todos os professores e servidores, especialmente ao secretário Sérgio de Souza por todo apoio.

Aos professores do Departamento de Nutrição da UFSC, responsável por minha formação na graduação, especialização e mestrado. Em especial à Prof. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte responsável por minha iniciação científica e Anete Araújo de Sousa, minha orientadora de mestrado.

Aos animais que deram suas vidas em prol desta pesquisa.

Às minhas irmãs Elite, Elizete, Elineia e Elenita e ao meu irmão Eduardo e suas famílias, por todo apoio e pela alegria de compartilhar a vida com vocês.

À Maria do Carmo Ribeiro da Silva Chaves por cuidar da nossa casa e também de nós.

Às amigas de todas as horas e de todos os cantos (sonoros inclusive) Angela Faria Brognoli, Cláudia Hickenbick, Denise Araújo, Elenita E. de Lima Ramos (que também é minha irmã) e Rosa Patrícia da Silveira.

Aos amigos do IFSC, Campus Florianópolis Continente, em especial à Jane Parisenti, Krischina Singer Aplevitz, Eni Maria Ranzan, Liz Cristina Camargo Ribas, Meimilany Gelsleichter, Mariana Kilpp Silva, Berenice Giehl Zanetti Von Dentz, Patrícia Matos Scheuer, Andreia Giaretta Gonçalves, Emilaura Alves, Cristiany Martins, Martha Machado, Paulia Maria Reis, Fernando Goulart Rocha... e tantos outros.

Às amigas da graduação que a vida nos presenteou duplamente ao nos apresentar e nos reaproximar, em especial à Bethania Hering, Karina Souto Vasconcellos, Gladys Helena Gonçalves Milanez e Angela Martinha Bongioiolo.

Aos amigos da Ataliba e da Univali, especialmente à Denise Rampellotti Collioni, Amanda Alcaraz da Silva, Claudia Ambrosi, Zilma Saibro da Silva... e tantas outras.

Aos amigos da biodança, em especial à Susana Pasinato, à minha irmã Elite E. de Lima, Isadora Bortolon, Thays Cristina Meireles, Justina Sponchiado, ao Daniel Akira, ao Zé Luiz e a muitos outros.

A todos os médicos, terapeutas e técnicos da saúde que cuidaram de mim nos dias difíceis.

E por fim, ao meu amado João Frederico Hofstatter Trott que após alguns desencontros, chegou me presenteando com tudo que eu precisava para finalizar a “nossa” tese. Tua participação foi imprescindível. Quero seguir ao teu lado.



*“...Uma dúzia de rosas, cheiro de alfazema  
Presente eu fui levar  
E nada pedi, entreguei ao mar (e nada pedi)  
Me molhei no mar (e nada pedi) só agradecei.”*

Letra da música Agradecer e abraçar  
Artista: Maria Bethânia  
Compositores: Geronimo Duarte e  
Everaldo Calazans de Almeida Filho



## RESUMO

As gorduras desempenham importante papel em vários alimentos. A indústria alimentícia utiliza tecnologias de modificação de óleos e gorduras para melhorar as características relacionadas ao comportamento de fusão, teor de gordura sólida, plasticidade e estabilidade oxidativa, tornando-as mais funcionais. A hidrogenação parcial de óleos vegetais por alterar a configuração isomérica de ácidos graxos insaturados de *cis* para *trans*, vem sendo substituída pela interesterificação, uma vez que o consumo de ácidos graxos *trans* (AGT) tem sido associado a doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2 e câncer. Gorduras interesterificadas são livres de *trans*, mas ricas em ácidos graxos saturados (AGS), que ocupam principalmente a posição *sn*-2 dos triglicerídeos (TAG), com melhor aproveitamento pelo organismo, segundo a literatura. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do consumo de dietas ricas em gordura interesterificada, gordura não interesterificada e gordura vegetal parcialmente hidrogenada no ganho de peso corporal, no perfil bioquímico sérico e na modulação do estresse oxidativo hepático em camundongos Balb-c; e no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos C57BL-6. Dois modelos experimentais foram realizados. Em ambos, os animais foram divididos em quatro grupos. O grupo controle (GC) recebeu dieta normolipídica e os demais receberam dietas hiperlipídicas (40% kcal), contendo gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GGNI), ou gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH). As análises das gorduras utilizadas indicaram que a gordura interesterificada (GI) continha aproximadamente 60% de AGS, principalmente ácido palmítico (39%); que o *blend* não interesterificado tinha o mesmo perfil de ácidos graxos da GI e continha duas vezes menos AGS na posição *sn*-2 dos TAG do que a GI; e a gordura vegetal parcialmente hidrogenada apresentava AGT (20%) e continha ácido linolênico (6%). No modelo experimental 1 os camundongos Balb-c (n=6) foram tratados por um período de 75 dias com dietas experimentais. No modelo experimental 2, após 70 dias de tratamento, os camundongos (n=16) receberam intraperitonealmente células do TAE e após 10 dias o desenvolvimento do tumor foi avaliado. Os camundongos Balb-c e C57BL-6 (p<0,001) dos grupos hiperlipídicos apresentaram maior ganho de peso corporal, comparado ao GC. Porém, sem diferença entre GGI, GGNI e GGPH. No modelo experimental 1, os parâmetros bioquímicos séricos e biomarcadores do estresse oxidativo hepático do grupo GGPH foram semelhantes aos do GC, exceto pelo aumento do colesterol total (CT)

( $p < 0,05$ ). Em comparação ao GGPH, camundongos do GGI apresentaram aumentos significativos nos valores plasmáticos de CT ( $p < 0,01$ ), não-HDL-C ( $p < 0,05$ ) e glicose ( $p < 0,05$ ) e glutathiona reduzida (GSH) (2,7 vezes,  $p < 0,05$ ) e atividade da glutathiona redutase (2,4 vezes,  $p < 0,001$ ) hepáticos. No modelo experimental 2, os camundongos C57BL-6 do GGPH apresentaram resultados semelhantes aos do GC, quanto ao crescimento do tumor (%), percentual de células apoptóticas e biomarcadores do estresse oxidativo. Em comparação ao GC, camundongos do GGI e GGNI apresentaram redução na sobrevivência (20% a menos), menor percentual de células apoptóticas (3 vezes menos), elevados níveis de peroxidação lipídica ( $p < 0,01$ ) e conteúdo depletado de glutathiona reduzida (GSH) ( $p < 0,01$ ) nas células tumorais. O estresse oxidativo observado nas células tumorais não foi suficiente para prolongar a vida dos camundongos dos grupos (GGI e o GGNI). Em ambos os modelos experimentais, o GGI e o GGNI apresentaram resultados semelhantes em todos os parâmetros avaliados. Os resultados obtidos indicam que a modificação da estrutura dos triglicerídeos causada pela interesterificação, não alterou os resultados dos parâmetros metabólicos avaliados, nem afetou de forma diferente o desenvolvimento do tumor TAE. As dietas contendo ácido palmítico (GGI e GGNI) apresentaram resultados mais deletérios do que a dieta contendo GVPH, fonte de AGT e ácido linolênico. Os resultados sugerem a necessidade de mais estudos *in vivo* com diferentes gorduras interesterificadas, uma vez que sua utilização tende a aumentar ainda mais em função do intenso movimento para eliminação da gordura trans.

**Palavras-chave:** Gordura interesterificada. Gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Gordura trans. Ácido palmítico. Estresse oxidativo. Câncer.

## ABSTRACT

Fat plays an important role in various foods. The food industry uses oil and fat modification technologies to improve characteristics related to fusion behavior, solid fat content, plasticity and oxidative stability, making it more functional. The partial hydrogenation of vegetable oils, by altering the isomeric configuration of unsaturated fatty acids from *cis* to *trans*, has been replaced by interesterification, since the consumption of *trans* fatty acids (TFA) has been associated with cardiovascular diseases, diabetes mellitus type 2 and cancer. Interesterified fat is *trans*-free but rich in saturated fatty acids (SFA), which occupy the *sn*-2 position of triacylglycerides (TAG), with better absorption by the body, according to literature. In this work, we evaluated the effects of the consumption of diets rich in interesterified fat, non-interesterified fat and partially hydrogenated vegetable fat in body weight gain, in serum biochemical profile and in the modulation of hepatic oxidative stress in Balb-c mice; and the development of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in C57BL-6 mice. Two experimental models were performed. In both, the animals were divided into four groups. The control group (CG) received a normolipid diet and the others received hyperlipidic diets (40% kcal), containing interesterified fat (IFG), non-interesterified fat (NIFG) or partially hydrogenated vegetable fat (PHFG). Analysis of the fat used indicated that the interesterified (IF) fat contained approximately 60% of SFA, mainly palmitic acid (39%); that the non-interesterified blend had the same IF fatty acid profile and contained twice less SFA at the *sn*-2 position of TAGs than did the IF; and partially hydrogenated vegetable fat had TFA (20%) and contained linolenic acid (6%). In the experimental model 1, the Balb-c mice (n=6) were treated for a period of 75 days with experimental diets. In experimental model 2, after 70 days of treatment, the C57BL-6 mice (n=16) received EAC intraperitoneal cells and after 10 days, tumor development was evaluated. Balb-c and C57BL-6 mice ( $p < 0.001$ ) from the hyperlipidic groups presented higher body weight gain, compared to CG. However, there was no difference between IFG, NIFG and PHFG. In the experimental model 1, the serum biochemical parameters and biomarkers of hepatic oxidative stress in the PHFG were similar to those of the CG, except for the increase in total cholesterol (TC) ( $p < 0.05$ ). Compared to PHFG, IFG mice showed significant increase in plasma values of TC ( $p < 0.01$ ), non-HDL-C ( $p < 0.05$ ) and glucose ( $p < 0.05$ ) and reduced glutathione (GSH) (2.7-times,  $p < 0.05$ ) and hepatic reductase glutathione activity (2.4-times,  $p < 0.001$ ). In the experimental model 2, PHFG C57BL-6 mice presented CG-like results regarding tumor

growth (%), percentage of apoptotic cells and oxidative stress biomarkers. In comparison to CG, IFG and NIFG mice showed a reduction in survival (20% less), lower percentage of apoptotic cells (3 times less), and high levels of lipid peroxidation ( $p < 0.01$ ) and reduced glutathione (GSH) depleted content ( $p < 0.01$ ) in tumor cells. The oxidative stress observed in tumor cells was not sufficient to prolong the life of the mice in these groups. In both experimental models, IFG and NIFG presented similar results in all evaluated parameters. The results indicate that the modification of the triacylglycerol structure caused by the interesterification did not alter the results of the metabolic parameters evaluated, nor did it affect the development of the EAC tumor differently. Diets containing palmitic acid (IF and NIF) presented more deleterious results than the diet containing partially hydrogenated vegetable fat, TFA source and linolenic acid. The results also suggest the need for more in vivo studies with different interesterified fat, as their use tends to increase as a result of the intense movement to eliminate trans fat.

**Keywords:** Interesterified fat. Partially hydrogenated vegetable fat. Trans fat. Palmitic acid. Oxidative stress. Cancer.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química de um exemplo de triacilglicerol .....	37
Figura 1.2	Lipólise de triacilglicerol por lipase pancreática ou de lipoproteínas .....	38
Figura 1.3	Configuração isomérica e grau de saturação dos ácidos graxos e justaposição de ácidos graxos em agregados estáveis .....	45
Figura 1.4	Descrição dos potenciais mecanismos que podem estar envolvidos na associação hipotética entre as gorduras da dieta e a progressão do câncer de mama .....	94
Figura 2.1	Grupos experimentais alimentados com diferentes dietas.....	122
Figura 2.2	Estratégia experimental.....	127
Figura 2.3	Metodologias utilizadas nas análises dos biomarcadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante hepáticos.....	128
Figura 2.4	Efeitos da gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH) após 75 dias de dieta A. Ingestão alimentar (g/dia), B. Ganho de peso corporal (g), C. Consumo energético (kcal / dia), D. Eficácia alimentar (ganho de peso em g / consumo energético em kcal).....	136
Figura 2.5	Peso corporal e consumo alimentar dos grupos experimentais, durante os 75 dias de tratamento. A. Progressão do peso (g). B. Média do consumo alimentar (g / dia).....	139
Figura 2.6	Deposição gordurosa abdominal.....	140
Figura 2.7	Avaliação do perfil bioquímico sérico. Análise de: A. Triglicérides, B. Colesterol total, C. HDL-C, D. Não-HDL-C, E. Glicose, F. AST: aspartato amina transferase e G. ALT: alanina amina transferase.....	142
Figura 2.8	Avaliação da modulação do estresse oxidativo hepático. A. Análise do conteúdo de GSH, B.	

	Conteúdo de TBARS, C. Conteúdo de proteína carbonilada, D. Atividade da superóxido desmutase (SOD), E. Atividade da catalase (CAT), F. Atividade da glutathiona redutase (GR), G. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	146
Figura 2.9	Resumo gráfico do estudo .....	155
Figura 3.1	Grupos experimentais alimentados com diferentes dietas .....	171
Figura 3.2	Resumo da estratégia experimental .....	172
Figura 3.3	(A) Consumo alimentar em gramas (B) ganho de peso corporal em porcentagem e (C) peso corporal em gramas ao longo dos 70 dias experimento, anteriores a inoculação do TAE .....	176
Figura 3.4	(A) Crescimento do tumor ascítico de Ehrlich com base na variação da circunferência abdominal, n=6, 10 dias após a inoculação do tumor e (B) sobrevida dos camundongos de acordo com a curva de Kaplan-Meier, n = 10, até 35 dias após a inoculação do tumor. ....	178
Figura 3.5	Morfologia das células do TAE e o tipo de morte celular induzida pelas diferentes dietas administradas por 80 dias (70 dias antes do implante e 10 dias após). Avaliação pelo método de coloração com brometo de etídio / laranja de acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência (aumento = 400 ×); As manchas vermelhas, laranjas e verdes indicam células necróticas, apoptóticas e viáveis, respectivamente. ....	179
Figura 3.6	(A) Histograma e (B) porcentagem de células tumorais nas fases Sub-G1, G1, S e M do ciclo celular do TAE, dos animais tratadas com diferentes dietas por 80 dias, analisadas por citometria de fluxo.....	183
Figura 3.7	Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes medidas em células do TAE tratadas com diferentes dietas por 80 dias. (A) Níveis de peroxidação lipídica (TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (B)	

	Marcador de dano proteico (Proteínas carbonilas)	
	(C) Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH). (D)	
	Atividade da enzima catalase.....	185
Figura 3.8	Resumo gráfico do estudo .....	190



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Composição de ácidos graxos de diferentes óleos / gordura .....	40
Quadro 1.2	Principais triglicerídeos de diferentes óleos e gorduras .....	43
Quadro 1.3	Tipos de triglicerídeos, estado físico e aplicação nos alimentos .....	46
Quadro 1.4	Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais .....	57
Quadro 1.5	Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos .....	67
Quadro 2.1	Valor nutricional da ração Linha Bio Tec Ratos e Camundongos (Bio Base®, Águas Frias, SC), segundo informações do fabricante.....	123



## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição de ácidos graxos das gorduras (g / 100 g de gordura) da gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GNI) e gordura parcialmente hidrogenada (GVPH) .....	131
Tabela 2.2	Distribuição regiospecífica de ácidos graxos nas posições <i>sn-1,3</i> e <i>sn-2</i> dos triglicerídeos da gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GNI) e gordura parcialmente hidrogenada (GVPH).....	133
Tabela 2.3	Composição de triglicerídeos (TAG) da gordura interesterificada (GI) e da gordura não-interesterificada (GNI), expressos em percentual. ....	134





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS - *American Chemical Society*  
AG - Ácido(s) graxo(s)  
AGI - Ácido(s) graxo(s) insaturado(s)  
AGMS - Ácido(s) graxo(s) monossaturado(s)  
AGPI - Ácido(s) graxo(s) poli-insaturado(s)  
AGS - Ácido(s) graxo(s) saturado(s)  
AGT - Ácido(s) graxo(s) *trans*  
ALT - Alanina amina transferase  
AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*  
AOCS - *American Oil Chemists' Society*  
AST - Aspartato amina transferase  
B - Banha  
BI - Banha interesterificada  
C12:0 - Ácido laurício  
C14:0 - Ácido mirístico  
C16:0 - Ácido palmítico  
C18:0 - Ácido esteárico  
CAT - Catalase  
CCB - Centro de Ciências Biológicas  
CEUA - Comissão de ética no uso de animais  
DCV - Doença cardiovascular  
DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
GC - Grupo controle  
GGI - Grupo gordura interesterificada  
GGNI - Grupo gordura não-interesterificada (gordura com o mesmo perfil de AG da GGI)  
GGPH - Grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada  
GI - Gordura interesterificada  
GIP - Polipeptídeo insulínico  
GK - Gordura de kareté  
GKI - Gordura de kareté interesterificada  
GNI - Gordura não interesterificada  
GP - Gordura de palma  
GPI - Gordura de palma interesterificada  
GVPH - Gordura vegetal parcialmente hidrogenada  
GGTH - Grupo gordura vegetal totalmente hidrogenada  
GPx - Glutathione peroxidase  
GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathiona reduzida  
GSSG - Glutathiona oxidada  
iAUC - do inglês "*incremental area under curve*", área incremental sob a curva  
IDL - Lipoproteína de densidade intermediária  
IE – Interesterificação enzimática  
IQ – Interesterificação química  
HOMA - IR – Índice de resistência à insulina (do inglês *homeostatic model assessment*)  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
Lp (a) - Lipoproteína A  
MCF-7 - Linhagem de células de tumor de mama  
MDA - Malondialdeído  
NCE - Número de carbono equivalente  
NIH - National Institutes of Health  
O - Ácido oléico  
OC – Óleo de canola  
OCI - Óleo de canola interesterificado  
OGAO - Óleo de girassol alto oleico  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
OP – Oleína de palma  
OPI - Oleína de palma interesterificada  
OS – Óleo de soja  
OSPH – Óleo de soja parcialmente hidrogenado  
OSTH – Óleo de soja totalmente hidrogenado  
P - Ácido palmítico  
PBS - Salina tamponada fosfato (Phosphate Buffered Saline)  
S - Ácido esteárico  
SFC - Conteúdo de gordura sólida, do inglês *Solid Fat Content*  
SOD - Superóxido dismutase  
TAG - Triacilglicerol(is) ou triglicerídeo(s)  
TAE - Tumor ascítico de Ehrlich  
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA - Ácido tricloroacético  
TLR-4 - Receptor do tipo Toll 4 do inglês *Toll like receptor 4*  
VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>Objetivo geral</b> .....	35
<b>Objetivos específicos</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	37
<b>1 ÓLEOS E GORDURAS ALIMENTARES</b> .....	37
1.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ÓLEOS E GORDURA .....	43
1.2 GORDURAS PARA PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA .....	47
<b>2 GORDURAS MODIFICADAS</b> .....	49
2.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA .....	50
2.2 GORDURA INTERESTERIFICADA .....	52
2.2.1 Tipos de interesterificação .....	53
2.2.2 Consumo de gorduras interesterificadas .....	54
2.2.3 Estudos sobre o efeito do consumo de gordura interesterificada .....	55
<b>3 GORDURAS MODIFICADAS E METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÊMICO</b> .....	79
3.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA E METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÊMICO .....	79
3.1.1 Metabolismo lipídico .....	79
3.1.2 Glicemia e resistência insulínica .....	81
3.1.3 Atuação sobre o fígado e sobre o peso corporal .....	81
3.2 GORDURA INTERESTERIFICADA E METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÊMICO .....	82
3.2.1 Metabolismo lipídico .....	82
3.2.2 Metabolismo glicêmico .....	85
3.2.3 Atuação sobre o peso corporal e sobre os marcadores hepáticos .....	86
<b>4 GORDURAS MODIFICADAS E ESTRESSE OXIDATIVO</b> .....	87
4.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA E ESTRESSE OXIDATIVO .....	90
4.2 GORDURA INTERESTERIFICADA E ESTRESSE OXIDATIVO .....	91
<b>5 GORDURAS MODIFICADAS E CÂNCER DE MAMA</b> ..	91

5.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA E CÂNCER DE MAMA .....	95
5.2 GORDURA INTERESTERIFICADA E CÂNCER DE MAMA .....	96
5.3 TUMOR ASCÍTICO DE ERHLICH (TAE) .....	96
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	97
<b>CAPÍTULO 2:</b>	
<b>DIFERENTES GORDURAS MODIFICADAS NA DIETA E SEUS EFEITOS NO PESO CORPORAL, NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE EM CAMUNDONGOS</b> .....	
	115
RESUMO .....	115
ABSTRACT .....	116
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	117
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	119
2.1. PRODUTOS QUÍMICOS E GORDURAS .....	119
2.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS GORDURAS .....	119
2.3 DISTRIBUIÇÃO POSICIONAL DOS ÁCIDOS GRAXOS NOS TRIGLICERÍDEOS DAS GORDURAS .....	120
2.4 COMPOSIÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DAS GORDURAS INTERESTERIFICADA E NÃO INTERESTERIFICADA.....	120
2.5. ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	121
<b>2.5.1 Delineamento experimental e dietas</b> .....	121
<b>2.5.2 Determinações bioquímicas</b> .....	125
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	129
<b>3. RESULTADOS</b> .....	129
3.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, DISTRIBUIÇÃO POSICIONAL DOS ÁCIDOS GRAXOS NOS TRIGLICERÍDEOS E COMPOSIÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DAS GORDURAS.....	129
3.2 INGESTÃO ALIMENTAR, GANHO DE PESO CORPORAL E CONSUMO ENERGÉTICO .....	135
3.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS .....	141
3.4 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO .....	145
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	149
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	153
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	157

<b>CAPÍTULO 3:</b>	
<b>EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE GORDURA INTERESTERIFICADA, NÃO INTERESTERIFICADA E PARCIALMENTE HIDROGENADA EM CAMUNDONGOS C57BL-6 COM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH</b> .....	165
<b>RESUMO</b> .....	165
<b>ABSTRACT</b> .....	166
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	168
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	170
2.1. PRODUTOS QUÍMICOS E GORDURAS .....	170
2.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	170
2.2.1 Delineamento experimental e dietas .....	170
2.2.2 Peso corporal e avaliação do crescimento tumoral e da sobrevida dos animais .....	173
2.2.3 Avaliação do tipo de morte e análise do ciclo celular das células do tumor ascítico de Ehrlich .....	173
2.2.4 Biomarcadores de danos oxidativos e defesa antioxidante no tumor ascítico de Ehrlich .....	174
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	174
<b>3. RESULTADOS</b> .....	175
3.1 CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	175
3.2 CRESCIMENTO TUMORAL E SOBREVIDA .....	177
3.3 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE DE CÉLULAS DO TUMOR .....	177
3.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS DO TUMOR .....	181
3.5 BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS E DEFESA ANTIOXIDANTE NO TUMOR .....	182
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	187
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	191
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	192
<b>CONCLUSÕES DA TESE</b> .....	198
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	200



## INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são constituintes indispensáveis na alimentação humana, por serem fontes de vitaminas lipossolúveis, de ácidos graxos (AG) essenciais, de outros compostos funcionais e de energia. Estas biomoléculas são fundamentais para os processos metabólicos basais e fazem parte da composição de membranas celulares, mantendo sua integridade e fluidez. Além disso, nos alimentos, os óleos e gorduras estão relacionados às características de textura, aparência e sabor (BLOCK; BARRERA-ARELLANO, 2009; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As gorduras desempenham um papel importante em uma grande variedade de alimentos processados, como por exemplo *shortenings*, margarinas, chocolates, produtos de panificação e confeitaria e óleos de fritura (MILLS; HALL; BERRY, 2017). A indústria alimentícia utiliza tecnologias de modificação de óleos e gorduras, tais como a hidrogenação, a interesterificação, o fracionamento e a mistura (*blending*) - para melhorar as características relacionadas ao comportamento de fusão, teor de gordura sólida, plasticidade e estabilidade oxidativa, tornando-as mais funcionais. Isso porque os óleos vegetais em suas formas originais têm aplicações limitadas (MENSINK et al., 2016).

O século XX foi marcado pela substituição das gorduras animais, como a manteiga e a banha de porco, por óleos/gorduras vegetais modificados, como as gorduras parcialmente hidrogenadas (MONDINI; MONTEIRO, 1994). Essas gorduras tem sido amplamente utilizadas no último século, uma vez que foram desenvolvidas como uma alternativa mais barata e mais saudável em relação às gorduras animais, por serem livres de colesterol e por conterem menor quantidade de AGS (ácidos graxos saturados) (MENSINK et al., 2016; O'BRIEN; FARR; WAN, 2000).

A hidrogenação parcial de óleo caracteriza-se pela reação química na qual moléculas de hidrogênio reagem com AGI (ácidos graxos insaturados), reduzindo o número de duplas ligações. Entretanto, esse processo altera a configuração isomérica da molécula de AG insaturados, da configuração *cis* para *trans* (MENAA et al., 2013b). A gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH) representa a principal fonte de ácidos graxos *trans* (AGT) na dieta humana (SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007).

A partir da década de 1990, evidências científicas passaram a associar o consumo de AGT, em especial do AG eláidico (18:1 9t), com

doenças cardiovasculares (MENSINK; KATAN, 1990; ZOCK; MENSINK, 1996). Posteriormente também foi associada com diabetes mellitus tipo 2 (LIU et al., 2018; RISÉRUS, 2006), câncer (CHAJÈS et al., 2008; HIRKO et al., 2018a), entre outras doenças. Por essa razão vários países têm adotado medidas para reduzir ou eliminar os AGT de alimentos processados (L'ABBÉ et al., 2009). Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o programa "Replace", cujo objetivo é tornar o mundo livre de gordura *trans* até 2023 (GHEBREYESUS; FRIEDEN, 2018; WHO, 2018a).

Neste contexto, surgiram as gorduras interesterificadas (GI), com aplicabilidade nos alimentos semelhante à GVPH, mas, com a vantagem de serem livres de AGT, pois o processo de interesterificação não promove a isomerização das duplas ligações dos AG (MENAA et al., 2013b). A interesterificação, por ação de catalisadores químicos ou enzimáticos, promove um rearranjo na distribuição dos AG, intra e entre os triglicerídeos (TAG), formando novas espécies de TAG com os AGS ocupando prioritariamente a posição *sn*-2. Diferentemente do que ocorre na natureza, onde os AGS de alimentos vegetais ocupam prioritariamente as posições *sn*-1 e 3. Na interesterificação, a composição em AG da(s) matéria(s) prima(s) é mantida, mas a composição de TAG é modificada, alterando também suas propriedades físicas e funcionais (MARANGONI; ROUSSEAU, 1995; SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009).

A alteração na distribuição dos AG nos TAG, além de alterar propriedades físicas da gordura, tais como alteração do perfil de fusão e retardo da rancificação, também pode alterar suas propriedades nutricionais (BERRY, 2009a; MENAA et al., 2013a). Estudos tem indicado que os AG presentes na posição *sn*-2 do TAG tendem a ser melhor absorvidos pelo organismo humano, uma vez que as lipases pancreáticas hidrolisam especificamente as ligações nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Teoricamente os AG livres oriundos das posições *sn*-1 e *sn*-3 podem formar sabões no ambiente intestinal e se perder nas fezes, ao contrário dos 2-monoacilgliceróis que são rapidamente absorvidos. Portanto, os efeitos dos AG ocupantes da posição *sn*-2 podem ser potencializados no organismo (ALFIERI et al., 2018; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

As gorduras interesterificadas normalmente são formuladas com *blends* de diferentes óleos e/ou gorduras. Tendem a ser ricas em ácidos graxos saturados (AGS) de cadeia longa, uma vez que apresentam em suas formulações gordura(s) com alto ponto de fusão, geralmente fonte de ácido palmítico (16: 0) ou ácido esteárico (18: 0) (BERRY, 2009b).

Muitos alimentos ultraprocessados contêm gorduras modificadas em sua formulação, como gorduras parcialmente hidrogenadas e



interesterificadas (MONTEIRO et al., 2016). Alimentos ultraprocessados podem ser entendidos como formulações alimentícias industriais prontas para o consumo e feitas de substâncias extraídas de alimentos (gorduras, açúcar), ou derivadas de constituintes de alimentos (gorduras hidrogenadas, gorduras interesterificadas) ou sintetizadas em laboratório (corantes, aromatizantes e outros aditivos) (LOUZADA et al., 2015).

Pesquisas têm alertado sobre o rápido aumento na produção e consumo desses produtos em todo o mundo e sua potencial associação com a atual pandemia de obesidade e outras doenças não transmissíveis relacionadas à dieta (MONTEIRO et al., 2016; MOODIE et al., 2013; MOUBARAC et al., 2017).

Alguns estudos abordaram o papel da GI no metabolismo. No entanto, as implicações nutricionais e de saúde do consumo de GI a longo prazo precisam ser melhor compreendidas. Além disso, existem resultados controversos e de difícil interpretação, uma vez que as GI podem ser formuladas com diferentes combinações de óleos e gorduras e podem ser comparadas com gorduras diversas. Além disso, várias GI utilizadas nas pesquisas não são disponíveis comercialmente (MENSINK et al., 2016; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Por outro lado, estudos epidemiológicos e experimentais utilizando modelos animais têm associado o elevado consumo de gorduras com o risco de desenvolvimento do câncer de mama (GU et al., 2011; LAMAS et al., 2015; SCHULZ et al., 2008; SIERI et al., 2014; TURNER, 2011). Adicionalmente, outros estudos têm associado o aumento do risco de câncer de mama, principalmente à alta ingestão de AGS (DANDAMUDI et al., 2018; FASANO et al., 2017; HIRKO et al., 2018a) e também de AGT de alimentos processados (CHAJÈS et al., 2008; HIRKO et al., 2018b; SEILER et al., 2018). Convém destacar, que o carcinoma mamário é o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres e é também o que apresenta a maior mortalidade por câncer em todo o mundo (SEILER et al., 2018).

Assim, o alto consumo de alimentos processados, fontes de gorduras modificadas (gordura parcialmente hidrogenada e/ou gordura interesterificada) e a limitada disponibilidade de estudos que investigaram os efeitos metabólicos da ingestão, de longo prazo, de gorduras interesterificadas comercialmente disponíveis, e sua relação com o câncer justificam a presente pesquisa.

A hipótese deste estudo é que os efeitos do consumo de uma dieta hiperlipídica - no perfil nutricional, perfil bioquímico sérico e modulação do estresse oxidativo hepático e no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos - seriam mais deletérios quando do consumo de

uma gordura vegetal parcialmente hidrogenada (por ser fonte de ácidos graxos *trans*), seguida da gordura interesterificada (por conter maior quantidade de ácidos graxos saturados na posição *sn-2*). Portanto, menos deletérios no caso da gordura não interesterificada, que não é fonte de graxos *trans* e apresenta menor quantidade de ácidos graxos saturados na posição *sn-2*, quando comparada à gordura interesterificada.

O presente documento foi organizado na forma de artigos e está dividido da seguinte forma:

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica: neste capítulo são abordados os principais temas envolvidos no trabalho: 1. Óleos e gorduras alimentares; 2. Gorduras modificadas (gordura vegetal parcialmente hidrogenada, gordura interesterificada); 3. Gorduras modificadas e metabolismo lipídico e glicêmico; 4. Gorduras modificadas e estresse oxidativo e 5. Gorduras modificadas e câncer de mama.

Capítulo 2 – Efeitos da suplementação de gordura interesterificada, não interesterificada e parcialmente hidrogenada nos parâmetros bioquímicos plasmáticos e estresse oxidativo hepático em camundongos Balb-c.

Capítulo 3 – Efeitos da suplementação de gordura interesterificada, não interesterificada e parcialmente hidrogenada no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos C57BL-6.

## OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da suplementação de gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH) no perfil nutricional, perfil bioquímico sérico e modulação do estresse oxidativo hepático em camundongos Balb-c e no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos C57BL-6.

### **Objetivos específicos**

- a) Analisar a composição em ácidos graxos e a distribuição regioespecífica de ácidos graxos das GI, GNI e GVPH.
- b) Investigar a composição em triglicerídeos da GI, GNI e GVPH.
- c) Avaliar os efeitos da suplementação das diferentes gorduras no consumo alimentar e o ganho de peso corporal nos camundongos Balb-c e C57BL-6.
- d) Avaliar os efeitos da suplementação das diferentes gorduras nos depósitos de gordura abdominal nos camundongos Balb-c.
- e) Avaliar os efeitos da suplementação das diferentes gorduras nas concentrações séricas de lipídeos, glicose e enzimas transaminases nos camundongos Balb-c.
- f) Avaliar os efeitos da suplementação das diferentes gorduras na defesa antioxidante e nos biomarcadores de dano oxidativo hepático nos camundongos Balb-c.
- g) Investigar os efeitos pró ou antitumoral da suplementação das diferentes gorduras em camundongos C57BL-6 inoculados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE), por meio da avaliação do crescimento do tumor e da sobrevida dos animais.
- h) Avaliar os efeitos da suplementação das diferentes gorduras no tipo de morte celular induzido e no ciclo celular de células do TAE implantadas em camundongos C57BL-6.
- i) Avaliar os efeitos da suplementação das diferentes gorduras nos níveis de marcadores de estresse oxidativo e indicadores de defesas antioxidantes de células de TAE implantadas em camundongos C57BL-6.

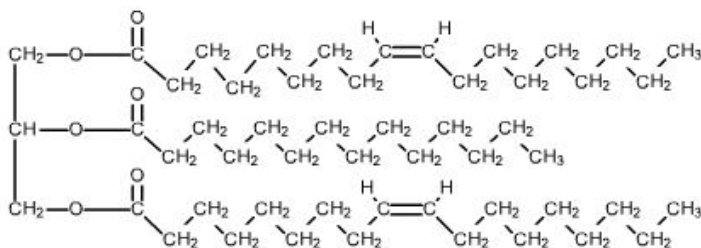


## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 ÓLEOS E GORDURAS ALIMENTARES

Óleos e gorduras são lipídeos compostos predominantemente por três AG esterificados a uma molécula de glicerol, os TAG (Figura 1.1). Os óleos e gorduras apresentam diferentes composições em AG e em TAG e diferenciam-se por sua consistência à temperatura ambiente, sendo os óleos líquidos e as gorduras sólidas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 1.1 - Estrutura química de um exemplo de triacilglicerol



Fonte: Chegg Study (2018).

As características físicas, químicas, funcionais e propriedades nutricionais de um óleo / gordura estão diretamente relacionadas à composição em ácidos graxos e à distribuição regioespecífica dos mesmos nas moléculas de TAG (posições *sn*- 1-3 ou 2) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009). A maioria dos AG encontrados na natureza apresenta cadeia linear, com número par de carbonos (de 14 a 24). Grande parte dos AG insaturados distribuídos na natureza possuem as duplas ligações na configuração *cis* (os carbonos da dupla ligação da cadeia alifática estão do mesmo lado), separadas por um carbono metilênico (duplas não conjugadas) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

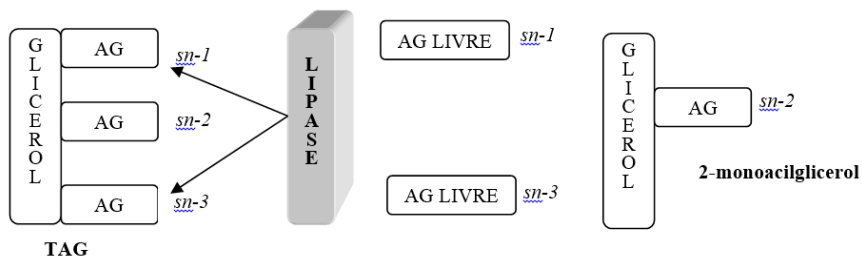
No Quadro 1.1 pode ser observada a composição em AG de diferentes óleos e gorduras. A maioria dos óleos vegetais, como o óleo de soja, milho e girassol é predominantemente insaturada, contendo

principalmente os ácidos linoleico (C18:2), oleico (C18:1) e linolênico (C18:3). A gordura de palma contém quantidades elevadas de AGS, principalmente de palmítico (C16:0). As gorduras láuricas de palmiste e coco são ricas em AGS de cadeia curta, principalmente o ácido láurico (C12:0). Gorduras de origem animal são ricas em AGS. A manteiga é rica em AG palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0).

No Quadro 1.2 estão apresentados a composição em TAG de diferentes óleos e gorduras. Os TAG apresentam uma estrutura de “garfo torcido”, com dois dos ácidos graxos nos terminais da molécula do glicerol apontando para a mesma direção (posições *sn-1* e *sn-3*) e outro apontando para direção oposta (posição *sn-2*). De um modo geral, os TAG de origem vegetal tendem a apresentar um AG insaturado na posição *sn-2*, já os TAG de origem animal tendem a apresentar um AGS (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O óleo de palma, por exemplo, apresenta na posição *sn-2* principalmente o ácido oleico (C18:1), e o sebo bovino apresenta o ácido palmítico (C16:0) (BERRY; SANDERS, 2005).

Na digestão dos TAG no trato digestivo humano, a lipase pancreática atua sobre os ácidos graxos da posição *sn-1* e *sn-3* (Figura 1.2). Como resultado tem-se AG livres e um monoacilglicerol composto pelo AG esterificado na posição *sn-2* do glicerol. Os AG livres podem formar sabões de cálcio e/ou de magnésio e não serem absorvidos pelo organismo, por esta razão atribui-se aos AG das posições *sn-1* e *sn-3* menor biodisponibilidade e aos AG ocupantes da posição *sn-2* um melhor aproveitamento pelo organismo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MU; HOY, 2004).

Figura 1.2 - Lipólise de triglicerídeos por lipases pancreática e lipoprotéica.



Legenda: AG – ácido graxo

Fonte: adaptado de Berry; Sanders, 2005.

Desta forma, conhecer a distribuição região-específica dos AG nos TAG é uma informação relevante, tanto para avaliar as propriedades físico-químicas de um óleo/gordura, quanto na avaliação dos efeitos do consumo desses sobre parâmetros relacionados à saúde.

Quadro 1.1 - Composição de ácidos graxos de diferentes óleos / gorduras

Óleos / gorduras de / Ácidos graxos		Algodão	Coco	Estearina de palma <sup>(1)</sup>	Girassol	Manteiga <sup>(*)</sup>	Milho	Palma <sup>(2)</sup>	Palmiste <sup>(3)</sup>	Oleína de palma <sup>(4)</sup>	Soja
C6:0	<u>Ac. capróico</u>	ND	ND-0,7	ND	ND	NI	ND	ND	ND-0,8	ND	ND
C8:0	<u>Ac. caprílico</u>	ND	4,6-10,0	ND	ND	NI	ND	ND	2,4-6,2	ND	ND
C10:0	<u>Ac. cáprico</u>	ND	5,0-8,0	ND	ND	1,7-3,2	ND	ND	2,6-5,0	ND	ND
C12:0	<u>Ac. láurico</u>	ND-0,2	45,1-53,2	0,1-0,5	ND-0,1	2,2-4,5	ND-0,3	ND-0,5	45,0-55,0	0,1-0,5	ND-0,1
C14:0	<u>Ac. mirístico</u>	0,6-1,0	16,8-21,0	1,0-2,0	ND-0,2	5,4 – 14,6	ND-0,3	0,5-2,0	14,0-18,0	0,5-1,5	ND-0,2
C16:0	<u>Ac. palmítico</u>	21,4-26,4	7,5-10,2	48,0-74,0	5,0-7,6	25 – 41	8,6-16,5	39,3-47,5	6,5-10,0	38,0-43,5	8,0-13,5
C16:1	<u>Ac. palmitoléico</u>	ND-1,2	ND	ND-0,2	ND-0,3	2,0-6,0	ND-0,5	ND-0,6	ND-0,2	ND-0,6	ND-0,2
C17:0	<u>Ac. margárico</u>	ND-0,1	ND	ND-0,2	ND-0,2	NI	ND-0,1	ND-0,2	ND	ND-0,2	ND-0,1
C18:0	<u>Ac. esteárico</u>	2,1-3,3	2,0-4,0	3,9-6,0	2,7-6,5	6-12	ND-3,3	3,5-6,0	1,0-3,0	3,5-5,0	2,0-5,4
C18:1	<u>Ac. oléico</u>	14,7-21,7	5,0-10,0	15,5-36,0	14,0-39,4	18,7-33,4	20,0-42,2	36,0-44,0	12,0-19,0	39,8-46,0	17,0-30,0
C18:2	<u>Ac. linoleico</u>	46,7-58,2	1,0-2,5	3,0-10,0	48,3-74,0	0,9-3,7	34,0-65,6	9,0-12,0	1,0-3,5	10,0-13,5	48,0-59,0
C18:3	<u>Ac. linolênico</u>	ND-0,4	ND-0,2	ND-0,5	ND-0,3	NI	ND-2,0	ND-0,5	ND-0,2	ND-0,6	4,5-11,0
C20:0	<u>Ac. araquídico</u>	0,2-0,5	ND-0,2	ND-1,0	0,1-0,5	1,2 – 2,4	0,3-1,0	ND-1,0	ND-0,2	ND-0,6	0,1-0,6
C20:1	<u>Ac. gadolênico</u>	ND-0,1	ND-0,2	ND-0,4	ND-0,3	NI	0,2-0,6	ND-0,4	ND-0,2	ND-0,4	ND-0,5
C22:0	<u>Ac. beênico</u>	ND-0,6	ND	ND-0,2	0,3-1,5	NI	ND-0,5	ND-0,2	ND-0,2	ND-0,2	ND-0,7



ND: Não detectado, definido como 0,05%

NI: Não informado

- (1) Estearina de palma é a fração com mais alto ponto de fusão originária do fracionamento da gordura de palma (*Elaeis guineensis*).
- (2) Gordura de palma é derivada do mesocarpo (polpa) do fruto da palma (*Elaeis guineensis*).
- (3) Óleo de palmiste é derivado da amêndoa do fruto da palma (*Elaeis guineensis*).
- (4) Oleína de palma é a fração líquida derivada do fracionamento da gordura de palma (*Elaeis guineensis*).

Fonte: (CODEX STANDARDS FOR FATS AND OILS FROM VEGETABLE SOURCES, 1999), adaptada



Quadro 1.2 - Principais triglicerídeos de diferentes óleos e gorduras

Óleo / gordura	Principais Triglicerídeos		
Algodão	PLiLi	POLi	LiLiLi
Coco	LLL	CLL	CLM
Girassol	LiLiLi	OLiLi	LiOO
Manteiga	PPB	PPC	POP
Milho	LiLiLi	LiOLi	LiLiP
Palma	POP	POO	POLi
Palmiste	LLL	MOL	OLO
Soja	LiLiLi	LiLiO	LiLiP

B = C4:0 (Ácido butírico); C = C10:0 (Ácido cáprico); L = C12:0 (Ácido Lauríco); Li = C18:2 (Ácido Linoleico); M = C14:0 (Ácido Mirístico); O = C16:1 (Ácido Oléico); P = C16:0 (Ácido Palmítico); S = C18:0 (Ácido Esteárico).

Fonte: adaptado de Mu; Hoy (2004).

## 1.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ÓLEOS E GORDURAS

O comportamento de cristalização de lipídeos apresenta forte influência sobre as propriedades físico-químicas e sensoriais de produtos à base de gorduras (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os óleos e gorduras são polimórficos e apresentam uma tendência a formar predominantemente determinado tipo de cristal ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\beta'$ ) o que vai definir a sua aplicabilidade na produção de alimentos. A forma  $\alpha$  é a menos estável, forma  $\beta'$  é o polimorfo de estabilidade intermediária e o polimorfo  $\beta$  é o mais estável (O'BRIEN; FARR; WAN, 2000).

Óleos vegetais, tais como o de soja, estearina de palma, girassol e milho apresentam tendência cristalina estável na forma  $\beta$ , enquanto que a gordura de palma, de algodão, a oleína de palma e a manteiga tendem a desenvolver cristais do tipo  $\beta'$  (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O conteúdo de gordura sólida (conhecido pela sigla SFC, do inglês *Solid Fat Content*) é a percentagem de lipídeos que se encontra em estado sólido em determinada temperatura (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O SFC e a natureza dos cristais de gorduras existentes influenciam no comportamento de fusão do produto (ZHONG; ALLEN; MARTINI, 2014).

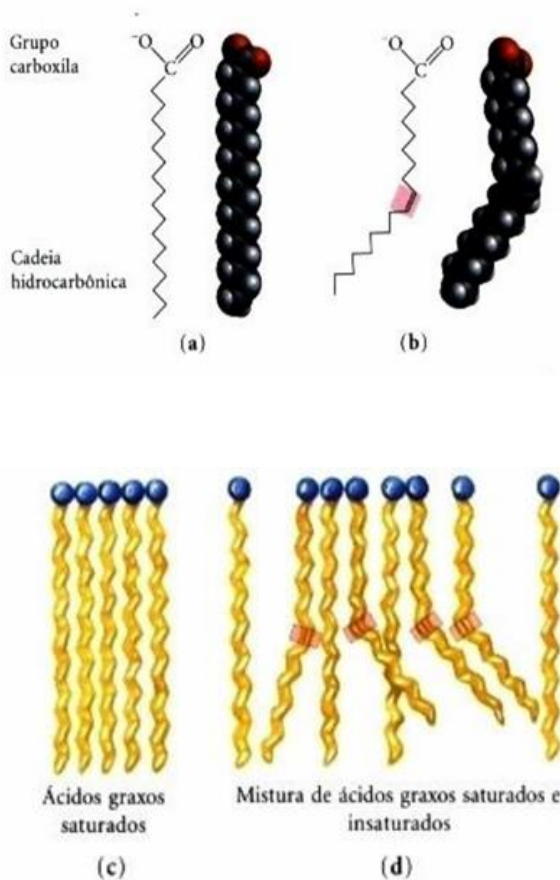
O perfil de fusão de um óleo ou gordura tem grande influência sobre a sua aplicação nos alimentos e está na dependência direta das propriedades químicas dos AG que o compõem. Quanto maior o grau de saturação, o tamanho da cadeia e a presença de ligações na configuração *trans*, mais elevado será o ponto de fusão do AG (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Uma gordura apresenta uma mistura complexa de TAG, cada qual com um ponto de fusão diferente, por esta razão cada gordura apresenta um perfil de fusão e não um ponto específico de fusão.

Quanto maior o número de duplas ligações na configuração *cis*, mais curvada a molécula de AG, o que impede o empacotamento espacial de agregados desses AG dentro dos cristais (Figura 1.3), enfraquecendo assim as interações de *van der Waals*, o que resulta em menor ponto de fusão. Quanto maior o empacotamento, maior a densidade do lipídeo. Por esta razão, os óleos (ricos em AG insaturados) são líquidos a temperatura ambiente, ou seja, seu ponto de fusão é baixo, e as gorduras (ricas em AGS ou AG na configuração *trans*) tendem a ser sólidas, uma vez que as moléculas desses AG são mais lineares (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A molécula de um AGT se assemelha a de uma AGS, diferentemente de um AG insaturado na configuração *cis*.

Os TAG podem ser divididos em quatro tipos, de acordo com os tipos de AG que estejam esterificados com a molécula de glicerol (trissaturados, dissaturados-monoin saturado, monossaturado-dissaturados e totalmente insaturados). No Quadro 1.3 estão apresentados alguns exemplos de TAG, seus pontos de fusão e sua aplicação nos alimentos.

A distribuição regioespecífica dos AG nos TAG também apresenta influência sobre o perfil de fusão de um óleo e gordura. Quando um AGS ocupa a posição *sn-2* do TAG alteram-se as propriedades físicas da gordura, tais como a elevação do ponto de fusão e retardo da rancificação (BERRY, 2009b; MENAA et al., 2013a, 2013b).

Figura 1.3 - Configuração isomérica e grau de saturação dos ácidos graxos e justaposição de ácidos graxos em agregados estáveis.



(a) Configuração de ácidos graxos saturado (C18:0). (b) Configuração de ácidos graxos insaturado (C18:1). (c) ácidos graxos totalmente saturados, estabilizados por muitas ligações hidrofóbicas. (d) presença de ácidos graxos saturado e insaturados com ligações *cis*, interferindo no empacotamento, resultando em agregados menos estáveis.

Fonte: Nelson; Cox (2014).

Quadro 1.3 - Tipos de triglicerídeos, estado físico, ponto de fusão e aplicação nos alimentos.

Tipos	Exemplos de TAG	Estado físico	Ponto de Fusão (°C)	Aplicação
<u>Trissaturados</u>	LLL (12:0-12:0-12:0) MMM (14:0-14:0-14:0) PPP (16:0-16:0-16:0) SPP (18:0-16:0-16:00) SSS (18:0-18:0-18:0)	Sólido	46 58 66 - 73	Coberturas duras
<u>Dissaturados-monoinsaturados</u>	SSO (18:0-18:0-18:1) SOS (18:0-18:1-18:0)	Sólido- <u>semisólido</u>	43	Confeitaria
Monossaturados-Di-insaturados	SOO (18:0-18:1-18:1)	<u>Semisólido</u> -sólido	23	Margarinas
Totalmente insaturados	OOO (18:1-18:1-18:1) <u>LiLiLi</u> (18:2-18:2-18:2) <u>LnLnLn</u> (18:3-18:3-18:3)	Líquido	5 -13 -24	Óleos líquidos para fritura, óleos para saladas

Legenda: L = C12:0 (Ácido lauríco); M = C14:0 (Ácido mirístico); P = C16:0 (Ácido palmítico); S = C18:0 (Ácido esteárico); O = C16:1 (Ácido oleico); Li = C18:2 (Ácido linoleico); Ln = C18:3 (Ácido linolênico).

Fontes: Adaptado de Damodaran; Parkin; Fennema (2010); Shahidi; Senanayake (2009).

## 1.2 GORDURAS PARA PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA

As gorduras desempenham importantes funções nos produtos de panificação e confeitaria como incorporação de ar, lubrificação, transferência de calor, maciez, umidade, sabor, aroma, estrutura e aumento da vida útil. A *performance* das gorduras durante o processamento e no produto final é afetada pelas propriedades físico-químicas da gordura utilizada, tais como relação entre o teor de gordura sólida e líquida; o tamanho dos cristais e o comportamento de fusão (ZHONG; ALLEN; MARTINI, 2014).

As gorduras plásticas são desejáveis para produtos de panificação e confeitaria. Gorduras plásticas são aquelas que apresentam uma pequena variação no teor de sólidos em uma ampla faixa de temperatura. Essa característica permite a submissão do produto à temperaturas diversas sem que haja perda da capacidade de aeração, nem de sua consistência. Um *shortening*, gordura vegetal modificada, sólida em temperatura ambiente e utilizada pela indústria de alimentos, é um exemplo clássico de uma gordura plástica (GRIMALDI; GONÇALVES; ESTEVES, 2000).

A plasticidade de uma gordura é dada pela proporção das fases sólida e líquida. As propriedades reológicas podem ser entendidas como o comportamento de corpos sólidos e fluídos. As propriedades reológicas “plásticas” desejáveis de gorduras comestíveis costumam ocorrer em intervalo de temperaturas no qual os lipídeos encontram-se parcialmente cristalinos, ou seja, formando redes tridimensionais de pequenos cristais de gordura dispersos em matrizes de óleo líquido, unidos por forças internas de coesão em uma adequada proporção (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A forma  $\beta'$  apresenta-se como a forma cristalina mais adequada para a fabricação de grande parte dos produtos de panificação e confeitaria. A forma  $\beta'$  caracteriza-se por cristais pequenos e delicados capazes de capturar mais líquido, conferindo textura suave, boa plasticidade, resistência térmica, palatabilidade e brilho ao produto. Por outro lado, a forma  $\beta$  caracteriza-se por cristais grandes, podendo produzir efeitos como granulidade e arenosidade no produto, mais adequado para a produção de massas crocantes para tortas (O'BRIEN; FARR; WAN, 2000; SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009).

No passado eram utilizadas para a fabricação de produtos de panificação e confeitaria, gorduras animais como a banha e a manteiga, mas, por questões econômicas, nutricionais (são fontes de colesterol e de AGS) e de disponibilidade essas gorduras foram substituídas por gorduras de origem vegetal modificadas (O'BRIEN; FARR; WAN, 2000). Sobre a questão nutricional, embora a manteiga e a banha sejam ricas em colesterol e AGS, hoje sabe-se que as gorduras modificadas, especialmente se fontes de AGT não apresentam vantagens nutricionais (MENSINK; KATAN, 1990; ZOCK; MENSINK, 1996).



## 2 GORDURAS MODIFICADAS

Os óleos vegetais e as gorduras em sua forma natural tendem a não apresentar características plásticas adequadas para serem incorporadas em um grande número de alimentos. Por esta razão, a indústria de alimentos tem desenvolvido tecnologias de modificação de óleos e gorduras tornando-as mais adequadas para aplicações específicas (COSTALES; FERNÁNDEZ, 2009).

Alimentos ultraprocessados apresentam em sua composição gorduras modificadas (MONTEIRO et al., 2016). Alimentos ultraprocessados são formulações alimentícias industriais prontas para o consumo humano e feitas de substâncias extraídas de alimentos (gorduras, açúcar), ou derivadas de constituintes de alimentos (gorduras hidrogenadas, gorduras interesterificadas) ou sintetizadas em laboratório (corantes, aromatizantes e outros aditivos) (LOUZADA et al., 2015). Pesquisas têm alertado sobre o rápido aumento na produção e consumo desses produtos em todo o mundo (MONTEIRO et al., 2016; MOODIE et al., 2013; MOUBARAC et al., 2017).

Dentre as tecnologias de modificação de óleos e gorduras estão, além da mistura (*blending*), o fracionamento, a hidrogenação e a interesterificação. Para a produção de uma gordura modificada pode-se fazer uso de uma dessas tecnologias ou de uma combinação entre elas (COSTALES; FERNÁNDEZ, 2009). Por exemplo, pode-se utilizar para a fabricação de uma gordura interesterificada uma mistura (*blending*) de óleo de soja totalmente hidrogenado (hidrogenação total), estearina de palma (produto do fracionamento) e óleo de algodão, a qual será submetida ao processo de interesterificação.

A mistura (*blending*) consiste em combinar óleos e/ou gorduras com o objetivo principal de obter um sistema com propriedades de fusão específicas. O fracionamento é um processo físico através do qual óleos e gorduras, frequentemente ricos em AGS, são submetidos a diferentes temperaturas com o objetivo de separar frações com diferentes pontos de fusão, como as frações sólida (estearina) e líquida (oleína) (SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009).

A hidrogenação de óleo é um processo no qual são adicionados hidrogênio às duplas ligações dos AG, podendo ser parcial ou total. O objetivo é torná-lo mais sólido em temperatura ambiente, com comportamento adequado de cristalização e com maior estabilidade oxidativa, aumentando o tempo de vida de prateleira do produto (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A hidrogenação pode ser total ou parcial. A hidrogenação total produz gorduras muito sólidas, totalmente saturadas. E a hidrogenação parcial caracteriza-se pela produção de gorduras semi-sólidas, parcialmente saturadas e pela presença de AG insaturados com configuração isomérica *trans*, em especial o ácido eláidico - C18:1 n-9t (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A interesterificação de um óleo ou de uma gordura, ou de uma mistura de óleos e gorduras, é o processo que consiste em quebra simultânea das ligações éster existentes e formação de novas ligações nas moléculas de glicerol. A interesterificação promove rearranjo na distribuição dos AG, intra e entre os TAG, formando novos TAG, com novas propriedades físicas, químicas e funcionais (MARANGONI; ROUSSEAU, 1995; RIBEIRO et al., 2007; SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009).

O processo de hidrogenação parcial era o mais utilizado até recentemente. Porém, atualmente, em função da formação de isômeros *trans* pelo processo de hidrogenação parcial, o mesmo vem sendo substituído pelos processos de hidrogenação total, fracionamento e principalmente pela interesterificação.

## 2.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA

O processo de hidrogenação de óleos vegetais foi patenteado em 1903. A partir de 1950 a indústria de alimentos passou a utilizar amplamente as GVPH na produção de biscoitos, bolos, produtos de panificação, batatas fritas, sorvetes. Em nível doméstico, margarinas, cremes vegetais e gorduras vegetais culinárias passaram a substituir a manteiga e a banha (MARTIN; MATSHUSHITA; SOUZA, 2004; MONDINI; MONTEIRO, 1994; ZOCK; MENSINK, 1996).

Vários fatores contribuíram para o crescente aumento da utilização da GVPH. Entre eles, o baixo custo, boa disponibilidade, boa plasticidade, faixa de fusão adequada para a produção de diversos alimentos, boa estabilidade oxidativa e a alegação de ser uma gordura livre de colesterol e com menos gordura saturada que as gorduras de origem animal (MENAA et al., 2013a; SCHEEDER, 2007; VALENZUELA; MORGADO, 1999; WASSELL; YOUNG, 2007). A popularização da GVPH foi impulsionada pela descoberta dos impactos negativos na saúde dos AGS, nas décadas de 1950 a 1970 (WHO, 2018b).

A GVPH é a principal fonte de gordura *trans* de origem tecnológica (não biológica) presente na alimentação. No início dos anos 2000 contribuíam com cerca de 80% a 90% de todos os isômeros *trans*

que estavam presentes na alimentação (LARQUÉ; ZAMORA; GIL, 2001).

Apesar dos benefícios tecnológicos da GVPH, a partir da década de 90, pesquisas passaram a associar o consumo de gordura *trans* com problemas relacionados à saúde, em especial com as doenças cardiovasculares (BAYLIN et al., 2003; FOURNIER et al., 2012; KARBOWSKA; KOCHAN, 2011; MENSINK; KATAN, 1990; MOZAFFARIAN; ARO; WILLETT, 2009; MOZAFFARIAN; CLARKE, 2009; WILLETT, 2012). Além de outros problemas, como diabetes *mellitus* (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; MALIK; WILLETT; HU, 2013; MENAA et al., 2013a; SANTOS et al., 2013; WANG; PROCTOR, 2013); doença inflamatória (BENDSEN et al., 2011; MOZAFFARIAN et al., 2004), obesidade (THOMPSON; MINIHAINE; WILLIAMS, 2011), depressão (SÁNCHEZ-VILLEGAS et al., 2011), infertilidade feminina (CHAVARRO et al., 2007), infertilidade masculina (CHAVARRO et al., 2011), aumento do estresse oxidativo (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; CASSAGNO et al., 2005; DHIBI et al., 2011); maior tendência ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; MENAA et al., 2013b) e o câncer, em especial o de mama (BAKKER et al., 1997; CASSAGNO et al., 2005; CHAJÈS et al., 2008; HOLMES et al., 1999; HU et al., 2011; KIM et al., 2006; KOHLMEIER et al., 1997; LAAKE et al., 2013; MAKAREM et al., 2013; WIRFÄLT et al., 2011).

Diante deste cenário, a Organização Mundial da Saúde em 2004 estabeleceu como meta a eliminação do consumo de gordura *trans*, através da Estratégia Global para Promoção da Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde (WHO, 2004), por considerar não haver limite seguro de ingestão para este tipo de gordura. Recomendação esta reforçada em 2013 no Plano de Ação para a Prevenção e Controle de Doenças Não-Transmissíveis (WHO, 2013) e em 2018 no Programa “*Replace: a roadmap to make the world trans fat free by 2023*” (WHO, 2018a).

Governos e associações de diversos países passaram também a criar políticas e estratégias para controlar a oferta e o consumo da gordura *trans*. A Dinamarca foi a pioneira, ao determinar em 2003 o limite de 2% de AGT para óleos e gorduras. A partir de então, outros países, como a Suíça, Estados Unidos da América, Canadá, Austrália e países da América do Sul delinearam outras ações para reduzir o consumo de gordura *trans* (L'ABBÉ et al., 2009).

No Brasil destacam-se três estratégias que visam reduzir o consumo de gordura *trans* pela população: (a) declaração obrigatória do

conteúdo de gordura *trans* presente em alimentos embalados (BRASIL, 2003); (b) acordo de cooperação técnica entre o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) para a redução da gordura *trans* nos alimentos processados (ABIA, 2010) e (c) a publicação dos Guias Alimentares para a População Brasileira o qual recomenda evitar o consumo de alimentos ricos em gorduras *trans* (BRASIL, 2005) e de alimentos ultraprocessados, frequentemente ricos em gordura *trans* (BRASIL, 2014).

A indústria também tem desenvolvido processos, como a hidrogenação seletiva, que reduz a formação de AGT, mas não a elimina. O óleo de soja parcialmente hidrogenado, por exemplo, quando obtido por diferentes técnicas de hidrogenação seletiva podem formar diferentes quantidades de AGT, podendo variar de 2,6% a 34,3% (COSTALES; FERNÁNDEZ, 2009).

Neste contexto, surge como substituta da gordura parcialmente hidrogenada a gordura interesterificada, uma gordura com aplicabilidade semelhante à GVPH, mas, com a vantagem de ser livre ou com pequena quantidade de AGT, pois o processo de interesterificação não promove a isomerização das duplas ligações dos AG (MENAA et al., 2013a).

## 2.2 GORDURA INTERESTERIFICADA

A interesterificação de óleos e gorduras tem-se mostrado como importante método para produção de gorduras plásticas com baixos teores ou ausência de isômeros *trans*.

A interesterificação pode ser usada com o objetivo de ampliar o intervalo plástico, ou seja, influenciar o comportamento de fusão, fornecendo consistência desejada em temperatura ambiente e de refrigeração; melhorar o comportamento térmico; e melhorar ou modificar o comportamento cristalino, estimulando cristais  $\beta'$  como polimorfos mais estáveis, de forma a facilitar os processos de produção e diminuir a tendência à recristalização durante a vida útil do produto (RIBEIRO et al., 2007). O comportamento de cristalização é alterado, por dificultar a formação de cristais mais estáveis ( $\beta$ ), uma vez que a composição de TAG torna-se mais heterogênea (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Diferentemente da hidrogenação, a interesterificação não afeta o grau de saturação, nem causa isomerização das duplas ligações dos AG, ou seja, uma gordura interesterificada apresenta o mesmo perfil de AG da matéria prima utilizada na sua fabricação (COSTALES; FERNÁNDEZ, 2009; MENAA et al., 2013b). No entanto, ocorre uma alteração quanto a

ocupação de ácidos graxos da posição *sn*-2 do TAG, que passa a ser ocupada prioritariamente por um AGS, o que altera suas propriedades física, funcionais e nutricionais (BERRY, 2009a; MENAA et al., 2013a). De acordo com Gouk et al. (2013) o óleo de palma que apresentava 7,4% de AGS na posição *sn*-2, após a interesterificação passou a apresentar 49%.

Por outro lado, a interesterificação frequentemente conduz a uma redução de TAG trissaturados e triinsaturados (COSTALES; FERNÁNDEZ, 2009). As alterações físicas que ocorrem nas gorduras após a interesterificação podem ser justificadas também pela mudança na estrutura cristalina das gorduras, cujas formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$  apresentam diferentes pontos de fusão (22,4 °C; 36,5 °C e 41,6 °C, respectivamente) (BERRY; MILLER; SANDERS, 2007).

Uma gordura interesterificada pode ser obtida a partir de uma gordura ou de uma mistura de óleos e gorduras. Podem ser usados óleos como o de soja, girassol, canola e milho; gorduras completamente hidrogenadas e frações sólidas obtidas da gordura de palma e de coco (BERRY, 2009a). Em função da necessidade de utilização de gorduras com alto ponto de fusão, uma gordura interesterificada tende a ser rica em AGS (SANTOS et al., 2013).

Para Hayes; Pronczuk (2010), o óleo de palma e o óleo de soja totalmente hidrogenados interesterificados com outros óleos são os mais utilizados na fabricação de GI. No Brasil, Rekson (2007) sugeriu, a partir de análises dos perfis de AG, que os óleos mais comumente utilizados na produção de margarinas e cremes vegetais zero *trans* foram o óleo de soja, óleo de soja totalmente hidrogenado, algodão ou palma e óleo de palmiste.

### **2.2.1 Tipos de interesterificação**

A interesterificação pode ser realizada por processo químico ou enzimático; a interesterificação química é o método mais utilizado, pelo menor custo e facilidade de aplicação em larga escala (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Neste tipo de processo o catalisador mais frequentemente empregado é o metóxido de sódio (MeONa), embora outras bases, ácidos e metais também possam ser utilizados (GIOIELLI, 2008; RIBEIRO et al., 2007).

Na interesterificação química a redistribuição dos AG na molécula do glicerol é feita de forma randomizada (SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009). Neste processo são formados durante a reação produtos indesejáveis, tais como sabões, ésteres metílicos, diacilgliceróis e

monoacilgliceróis, exigindo a etapa de refino posterior (RIBEIRO et al., 2007).

Na interesterificação enzimática são utilizados biocatalisadores, tais como lipases microbianas (GIOIELLI, 2008; RIBEIRO et al., 2007). As enzimas utilizadas podem ter seletividade para diferentes AG ou por regioespecificidade, principalmente para as posições *sn-1* e *sn-3*, permitindo desta forma, maior controle sobre os produtos formados (SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009).

A interesterificação enzimática é mais adequada para a produção de lipídeos com composições específicas, inclusive aquelas destinadas a aplicações médicas e funcionais, como por exemplo, na produção de substitutos de manteiga de cacau e lipídeos para formulações infantis (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; GIOIELLI, 2008; MENAA et al., 2013a).

A interesterificação enzimática apresenta algumas vantagens em relação à interesterificação química. Além da maior especificidade, o processo é mais simples, apresenta elevada eficiência catalítica e ocasiona menos impacto ao meio ambiente. O processo enzimático produz menor quantidade de subprodutos, necessita de menor quantidade de água, menor consumo de energia e não utiliza produtos químicos agressores ao meio ambiente. Além disso, em função das condições de pH e de temperaturas mais brandas, tendem a produzir menos danos ao produto (PULIGUNDLA et al., 2012; SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009; SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2016).

### **2.2.2 Consumo de gorduras interesterificadas**

A interesterificação não é um processo novo, os princípios básicos foram documentados pela primeira vez em 1969 (MENAA et al., 2013a; WASSELL; YOUNG, 2007). Porém, a produção de gorduras interesterificadas iniciou de forma mais significativa a partir da década de 1990, quando o conhecimento sobre os malefícios da gordura *trans* tornaram-se mais evidentes (MENAA et al., 2013b).

Muitos alimentos industrializados estão sendo formulados com GI (BERRY, 2009a). *Shortenings*, margarinas e cremes vegetais comercializados estão sendo fabricados com óleos vegetais interesterificados (CAVENDISH et al., 2010; REKSON, 2007). A redução da presença de gordura *trans* em alguns alimentos, como apontado por algumas pesquisas, pode também indicar de forma indireta o uso crescente deste tipo de gordura (ARCAND et al., 2014; HOOKER; DOWNS, 2014; INNIS; GREEN; HALSEY, 1999; OTITE et al., 2013).

A GI já faz parte da alimentação de muitas populações, porém, pouco se sabe sobre as implicações da sua ingestão sobre a saúde dos consumidores.

### **2.2.3 Estudos sobre o efeito do consumo de Gordura Interesterificada**

Foram encontrados vinte estudos experimentais com animais que avaliaram os efeitos do consumo de GI sobre a saúde (Quadro 1.4). Alguns estudos compararam os efeitos do consumo de uma GI com uma gordura similar, com o mesmo perfil de AG, mas sem passar pelo processo de interesterificação e outros com outras gorduras, como a GVPH e a gordura de palma, principalmente.

Os animais mais frequentes nesses experimentos foram ratos *Wistar*, utilizados principalmente por uma equipe da Índia liderada pelo pesquisador Lokesh, cujo objetivo dos experimentos era verificar os efeitos do consumo de uma diversidade de misturas de óleos, interesterificados e não interesterificados, e comparar com a gordura de coco, bastante utilizada naquele país. Nos últimos anos surgiram pesquisas com camundongos C57BL/6 (AFONSO et al., 2016; GOUK et al., 2014, 2013; MAGRI et al., 2015; MISAN et al., 2015; VELASCO et al., 2015, 2017).

O tempo dos experimentos, além de avaliação dos efeitos pós-prandiais, variou de 21 a 120 dias, sendo 60 dias o período mais frequente. Foram diversos os tipos de óleos e gorduras usados na formulação das GI, sendo a maioria produzida em laboratório. Apenas um pequeno número de estudo utilizou GI comercial (BISPO et al., 2015; MAGRI et al., 2015; MISAN et al., 2015; VELASCO et al., 2015), com o objetivo de avaliar os efeitos do consumo materno de GI, durante a gestação e lactação, sobre a prole. Outro estudo (RODRIGUES; SCHIESSEL, 2009), utilizou GI comercial, com diferentes percentuais na ração. Com relação à quantidade de GI, a maioria das pesquisas substituiu a gordura da ração pela gordura teste, mantendo uma quantidade de óleo de soja para garantir o fornecimento dos AG essenciais. Apenas três estudos trabalharam com dieta hiperlipídica. Gouk et al (2013) e Gouk et al (2014) avaliaram o acúmulo de gordura corporal e Afonso et al (2016) investigaram os efeitos do consumo sobre o desenvolvimento de lesão aterosclerótica.

Quanto às pesquisas com seres humanos, foram encontrados dezessete estudos (Quadro 1.5). Desses, oito estudaram os efeitos pós-prandiais (até 6 ou 8 horas, após o consumo) e 8 realizaram avaliações por períodos mais longos, sendo os mais frequentes de 3 a 4 semanas. No primeiro grupo o tamanho da amostra variou de 9 a 50 participantes

(média 23) e no segundo grupo de 27 a 60 participantes (média 40). Metade dos estudos incluiu homens e mulheres, sendo quase todos saudáveis. Apenas dois estudos crônicos trabalharam com indivíduos hipercolesterolêmicos (NESTEL et al., 1995; NOAKES; CLIFTON, 1998); um estudo de avaliação pós-prandial trabalhou com indivíduos obesos (ROBINSON et al., 2009) e outro com indivíduos com hipertrigliceridemia (HALL et al., 2014).

Assim como nos estudos com animais, algumas pesquisas com seres humanos compararam os efeitos do consumo de uma determinada gordura antes e após a interesterificação, tais como oleína de palma (BERRY et al., 2007; FILIPPOU et al., 2014b; HALL et al., 2014; YLI-JOKIPII et al., 2001; ZOCK et al., 1995), manteiga (CHRISTOPHE et al., 2000), gordura de karitê (BERRY; MILLER; SANDERS, 2007), misturas de óleos e gorduras (MEIJER; WESTSTRATE, 1997; ROBINSON et al., 2009). Outros estudos compararam a GI com gordura *trans*, óleo de girassol alto oleico, manteiga e banha (NESTEL et al., 1995; NOAKES; CLIFTON, 1998; SANDERS et al., 2011; SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007; ZAMPELAS et al., 1994). A própria GI apresentou diferentes composições, entre os estudos descritos.



Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais.

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(VELASCO et al., 2017) Camundongos C57BL/6 (mães e prole (♂))	Idem Velasco et al (2015)	Idem Velasco et al (2015)	Bioenergética mitocondrial e metabolismo lipídico hepático	- GI elevou glicemia - GI e <i>trans</i> elevaram Triglicerídeos - Fígado com menos AG mono e poli-insaturados, possivelmente alterando função mitocondrial.
(AFONSO et al., 2016) Camundongos LDLr-KO (C57BL/6). 16 semanas	- AGPI (óleo girassol e canola) - <i>Trans</i> (100% GVPH de óleo soja) - OP – (95% óleo palma, 4% soja, 1% canola) - OP IE - Esteárico (42% óleo de canola TH 40,5% girassol alto oleico, 2% soja) - Esteárico IE	Dieta rica em gordura (40% kcal de lipídeos)  Tipo de interesterificação não citada.	- Lipídeos plasmáticos e lipoproteínas - Área de lesão arterial - Infiltração de macrófagos - Conteúdo de colágeno - inflamação - Efluxo de colesterol dos macrófagos	- Interesterificação não altera lipídeos plasmáticos. - <i>Trans</i> aumentou mais colesterol do que OP IE, mas ambos aumentaram LDL - OP IE induziu maior secreção de IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-6 de macrófagos peritonais - OP IE - maior lesão aterosclerótica, infiltração de macrófagos e conteúdo de colágeno do que os demais grupos. - GI com C16:0 induz o desenvolvimento da aterosclerose pelo acúmulo de colesterol nas partículas de LDL e células macrófágicas, ativando o processo inflamatório.

Legenda: C16:0 – ácido palmítico; AGPI – ácidos graxos polissaturados; GI – gordura interesterificada; GVPH – gordura vegetal parcialmente hidrogenada; IE – interesterificado; OP – óleo de palma; TH – totalmente hidrogenado.

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(BISPO et al., 2015)  Ratos Wistar (mães e prole machos). Gestação e lactação (3 meses)	Idem Velasco et al (2015)	Idem Velasco et al (2015)	- Índice de adiposidade - Proteínas: Receptor de insulina e Akt quinase B (PBK)	- Trans, óleo de palma e GI consumidas pela mãe durante a gestação e lactação, afeta negativamente a regulação na ingestão de alimentos na prole, em resposta a administração de insulina.
(MISAN et al., 2015)  Camundongos C57BL/6 (prole machos) Gestação e lactação (3 meses)	Idem Velasco et al (2015)	Idem Velasco et al (2015)	- Perfil de AG no cérebro - Densidade de capilares cerebrais - Interações leucócito-endotélio - Inflamação	- Trans, óleo de palma e GI consumidas pela mãe durante a gestação e lactação, pode desencadear os passos iniciais da inflamação no cérebro da prole, na fase adulta. - Mudanças do perfil de AG - aumenta interação leucócito-endotélio - Tendência em aumentar TLR4

Legenda: cont. – continuação; GI – gordura interesterificada; TLR4 - *Toll-like receptor* 4 ou receptor do tipo *Toll* 4

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(VELASCO et al., 2015)  Camundongos C57BL/6 Gestação e lactação (3 meses)	Dieta materna: AIN-93 G, Normolipídica, c/ uma das gorduras: GVPH, OP e GI (óleo palmiste 2,5%; estearina palma 45%; óleo de soja 45%; e GVTH 7,5%.	Normoli pí-dica (7%).  Tipo de interesterificação não citada.	- Adiposidade - Perfil de AG do cérebro - Densidade capilar funcional cerebral; - interações leucócito-endotélio	- GI e OP > ganho de peso e mais gordura em algumas áreas; Depósito gordura > em GI - GVPH > área de adipócitos em outras áreas; OP > n° de adipócitos em uma das áreas; - GVPH, OP e GI – alteração da micro circulação no cérebro, c/aumento de leucócitos. Mas GVPH maior adesão. - GI e OP como substituto de GVPH na dieta materna pode predispor a prole à obesidade e inflamação no cérebro, quando adulta.
(MAGRI et al., 2015)  Camundongos C57BL/6 fêmeas. Gestação/ lactação	Idem Velasco et al (2015)	Idem Velasco et al (2015)	- Ganho de peso - Avaliação da adiposidade - Histologia e morfometria do tecido adiposo.	- Maior ganho de peso nos grupos palma e GI, do que GVPH. - Ingestão materna de GI e / ou Gord. palma durante a gravidez e lactação predispõe a prole ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta em camundongos.

Legenda: cont. – continuação; GI – gordura interesterificada; GVPH – gordura vegetal parcialmente hidrogenada; GVTH – gordura vegetal totalmente hidrogenada; IE – interesterificado; OP – óleo de palma.

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

Estudo / Animais / Tempo do experimento	Dieta / Tipos de gordura	% de gordura da dieta	Variáveis investigadas	Principais resultados
(GOUK et al., 2014)  Camundongos C57BL/6. 15 semanas	Manteiga de cacau, óleo de palma, de girassol rico em oleico. Na posição sn-2 18:1. Nas posições 1 e 3: 16:0, 18:0 ou 18:1.	Ração com 150 g da gordura teste/kg de ração (60% kcal lipídeos)	- Peso / Massa corporal - Gordura subcutânea, visceral e total - Lipídeos fecais – Índice de excreção de ácidos graxos	- C18:0 nas posições sn-1,3 acumulou menos gordura corporal do que C16:0.
(GOUK et al., 2013)  Camundongos C57BL/6. 15 semanas	Oleína de palma GNI (sn-2 - AGS 7,4%); OPI (sn-2 - AGS 49%); ou óleo de soja. Interesterificação química	Ração com 150 g da gordura teste/kg de ração (60% kcal lip.).	- Peso / Massa corporal - Gordura subcutânea, visceral e total - Lipídeos fecais – Índice de excreção de ácidos graxos	- OP GNI (rico em AGS nas posições 1 e 3) levou ao menor acúmulo de gordura corporal (massa de gordura: consumo) e maior excreção de AGS nas fezes, do que OP GI. - Correlação negativa entre acúmulo de gordura por consumo alimentar e o conteúdo de AGS nas sn- 1 e 3

Legenda: cont. – continuação; AGS – ácidos graxos saturados; C16:0 – ácido palmítico; C18:0 – ácido esteárico; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; OP – oleína de palma.

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(FARFÁN et al., 2013)  Ratos <i>Sprague-Dawley</i> , Machos. Pós-prandial (tempo 0 e 12h)	GNI e GI (IE) - Mistura 60/40 de óleo de linhaça (rico em C18:3) + estearina de palma (>60% AGS; rico em C16:0 e tripalmitina).	4g / 100 g ração (AIN-93) + 1 ml a 36 °C, por gavagem.	- Perfil de AG plasmáticos (µg/ml) - AUC plasmático de C18:3 n3	- Qto maior o ponto de fusão mais lenta a absorção, mas sem efeito sobre o total absorvido. - Sem diferença significativa na absorção de AG linolênico.
(SHARMA; LOKESH, 2013)  Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	Ração AIN 76, c/ 10 g de GI (IE) ou GNI, compostas por: Óleo de amendoim e de linhaça.	10 g de gordura (20% kcal de lipídeos).	- Colesterol, HDL-C, LDL-C/ VLDL-C, TAG, fosfolipídeos - Perfil AG soro - Atividade HMG-CoA redutase - Eficiência alimentar	GI reduziu LDL e Triacilglicerol

Legenda: cont. – continuação; AGS – ácidos graxos saturados; C18:3 – ácido linolênico; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; IE – interesterificação enzimática; IQ – interesterificação química.

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(REENA; LOKESH, 2012)  Ratos <i>Wistar</i> machos. 8 semanas	Ração AIN 76, c/ 10 g de GI (IE) ou GNI, compostas por: Óleo de palma / de farelo de arroz.	10 g de gordura (20% kcal de lipídeos).	- AG fígado e soro - colesterol, HDL-C, LDL-C+VLDL-C, TAG - Fosfolipídeos	- GI reduziu (-10%) LDL, comparado a mesma gordura GNI - GI reduziu peso do fígado, comparado a mesma gordura GNI.
(PONNAMPALA M et al., 2011)  Leitões recém desmama-dos (ambos sexos). 8 semanas	4 grupos: Banha; Oleína de palma (OP) natural; OP IQ e OP IE.	11 g / 100 g de ração (31% kcal de lipídeos).	- Ganho de peso; Eficiência alimentar - Massa gorda / massa magra - Perfil de lipídeos sangue e insulina - Perfil de ácidos graxos no músculo e tecido adiposo	- Consumo e ganho de peso – Maior OP IE. - TAG – Maior em OP IE e Banha - LDLc – Tendência a ser menor no OP natural - AGS no tecido adiposo – Maior no grupo Banha - Gordura corporal – Maior no grupo Banha

Legenda: cont. – continuação; AGS – ácidos graxos saturados; C18:3 – ácido linolênico; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; IE – interesterificação enzimática; IQ – interesterificação química; OP – oleína de palma

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(REENA; GOWDA; LOKESH, 2011)  Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	Ração AIN 76, c/ 10 g de GI (IE) ou GNI, compostas por: Óleo de coco / de farelo de arroz / de gergelim.	10 g de gordura (20% kcal de lipídeos).	- Colesterol, HDL-C, LDL-C/VLDL-C - Atividade enzima HMG-CoA redutase - Genes (RNAm) envolvidos com a homeostase do colesterol no fígado	- GI reduziu colesterol e LDL / VLDL de forma mais significativa que GNI (-15%) - Efeitos atribuídos provavelmente a > captação de colesterol LDL no fígado (regulação + de LDL-R) e aumento da via catabólica através da ativação de expressão do gene CYP7A1.
(REENA; LOKESH, 2011)  Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	Ração AIN 76, c/ 10 g de GI ou GNI, compostas por: Óleo de coco / de farelo de arroz / de gergelim.	10 g de gordura (20% kcal de lipídeos).	No fígado e na membrana do eritrócito: - Peroxidação lipídica, - Enzimas antioxidantes - Perfil de AG	- Sem diferença entre GI e GNI - Misturas GI e GNI (ricos em AGP) apresentaram > peroxidação lipídica e > atividade enzimática do que óleo de coco. - Relação AGPI/AGS importante para stress oxidativo.

Legenda: cont. – continuação; AGS – ácidos graxos saturados; AGPI – ácidos graxos polissaturados; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; IE – interesterificação enzimática.

Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(REENA; KRISHNAKANTHA; LOKESH, 2010) Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	Ração AIN 76, c/ 10 g de GI (IE) ou GNI, compostas por: Óleo de coco / de farelo de arroz / de gergelim.	10 g de gordura (20% kcal de lipídeos).	Parâmetros trombóticos: - agregação plaquetária, -Eicosanóides no soro	- Sem diferença significativa entre GI e GNI.
(RODRIGUES; SCHIESSEL, 2009) Ratos <i>Wistar</i> machos. 50 dias	Ração padrão p/ Cobaias BioBASE BioTec (35% de lipídeos). Mix de 3 GI.	≠ % de GI adicionada à ração: 0%, 2%, 4% e 8%.	- peso e consumo ração - Glicemia, TAG, Colesterol Total e HDL-C	- Redução de 27% nas concentrações de colesterol (grupo 8%) - Demais sem diferença estatística.
(NAGARAJU; LOKESH, 2007) Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	Ração AIN 76, c/ 10 g de GI (IE) ou GNI, compostas por coco + amendoim ou oliva	10 g de gordura (20% kcal de lipídeos).	- Peroxidação lipídica - Atividade enzimas antioxidantes no fígado - Suscetibilidade a oxidação LDL	Não houve diferenças significativas entre as misturas GI e GNI

Legenda: cont. – continuação; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; IE – interesterificação enzimática.



Quadro 1.4 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada, envolvendo experimentos com animais (cont.)

<b>Estudo / Animais / Tempo do experimento</b>	<b>Dieta / Tipos de gordura</b>	<b>% de gordura da dieta</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(NAGARAJU; LOKESH, 2007)  Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	GI (IE) e GNI, composta por: Coco + amendoim ou Coco + oliva	10 g/100 g ração (20% energia).	- perfil de AG do soro e fígado. Colesterol, TAG, HDL-C, VLDL + LDL e fosfolídeos.	- Misturas GI reduziram mais o colesterol (no fígado: 11% x 21%) e TAG sem diferenças entre GI e GNI.
(REENA; LOKESH, 2007)  Ratos <i>Wistar</i> machos. 60 dias	Ração AIN 76, c/ 10g de GI (IE) ou GNI, compostas por: Óleo de coco / de farelo de arroz / de gergelim.	10g/100g ração (20% energia).	- TAG, colesterol e perfil AG hepático. - Soro - Colesterol total, HDL-C, LDL-C / VLDL, TAG, fosfolip. e perfil de AG.	- GI apresentou efeito hipolipidêmico, reduziu no fígado – colesterol e TAG e no soro – colesterol, LDL/VLDL e TAG.
(SAKONO et al., 1997)  Ratos <i>Sprague-Dawley</i> , Machos. 3 semanas	Ração AIN 76, c/ 12 g de gordura - Mistura GNI ou GI com: tripalmitina c/ triestearina + óleo de girassol rico em oléico + óleo girassol.	12 g/100g ração.	- Absorção de AG (por análise de AG nas fezes) - Soro, linfa, fígado e tec. Adiposo – colesterol, TAG e fosfolídeos	- GI melhorou a absorção de ácidos graxos, mas não alterou colesterol.

Legenda: cont. – continuação; AG – Ácidos graxos; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; IE – interesterificação enzimática.



Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos.

Estudo / Tipo / Amostra / Tempo	Diets / Quantidade Gordura	Variáveis investigadas	Principais resultados
(THILAKARATHN A et al., 2016) ( <i>in vitro</i> x <i>in humanos</i> ).	- GNI - GI (IQ e IE) Óleo de girassol rico em oléico e Estearina de canola (GVTH) - 70:30 (gorduras ricas em ác. oleico e esteárico) 1 g de gordura / kg de massa corporal	Compararam a digestibilidade <i>in vitro</i> e bioacessibilidade usando o TIM-1 (simulador de digestão e absorção), com os resultados encontrados no estudo de ROBINSON et al. (2009).	- Estrutura molecular dos TAG e ponto de fusão impactam sobre a digestão lipídica. Temperatura de fusão mais baixas associados a maior biodisponibilidade de lipídeos. - Maior quantidade de 18:00 não digerido de GNI - Bioacessibilidade de 18:1 foi > do que 18:00 em GNI (18:1 em sn-2). Em GI foi o contrário
(FILIPPOU et al., 2014b) Estudo randomizado, cruzado. 53 adultos. 6 semanas p/ cada tipo de gordura.	- OP GNI; OP GI; óleo de girassol rico em oléico (p/ confirmar adesão às dietas). 20% do conteúdo energético. GI (IQ)	- Peptídeo C, insulina, glicose, polipeptídeo insulino-trópico glicose-dependente do plasma e (GLP-1); Lípidos e apolipoproteínas.	- Menor valor de glicose plasmática (8%) após consumo de OP IE. Demais sem diferenças significativas - Acido palmítico na posição <i>sn-2</i> não prejudica a secreção de insulina e a homeostase da glicose em indivíduos saudáveis.

Legenda: GI – gordura interesterificada; GLP-1 - *glucagon-like peptide-1* ou peptídeo semelhante a glucagon 1; GNI – gordura não interesterificada; GVTH – gordura vegetal totalmente hidrogenada; IE – interesterificação enzimática; IQ – interesterificação química; OP – oleína de palma.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(FILIPPOU et al., 2014a)  Estudo randomizado, cruzado. Pós-prandial  50 adultos saudáveis	4 refeições, c/ gorduras (50g): Girassol alto em oléico (controle); OP GNI; OP GI e Banha (0,6; 9,2; 39,1 e 70,5 mol% de 16:0 na sn-2). 50 g em uma refeição	- glicemia - insulina -peptídeo-C, GIP, (PYY),	- GIP – liberação menor p/ OP GI e banha - Tendência p/ menor aumento de PYY p/ mulheres c/ OPIE e banha. - Dieta c/ altas proporções de 16: na sn-2 não afeta insulina e glucose, mas reduz liberação de GIP e tende a aumentar menos PYY (em mulheres)
(HALL et al., 2014)  Estudo randomizado, cruzado e duplo cego. Pós-prandial (6 horas) 11 homens (40-70 anos) com hipertrigliceridemia.	OP nativo e OP GI.  Refeição c/ 75 g da gordura teste (muffin e milkshake, com 1047 kcal e 75 g gordura teste (64,4% kcal)	-TAG e colesterol de quilomicrons e de IDL - Perfil de AG do plasma e apo B48 da fração IDL	- Primeiras 4 hs. – absorção TAG mais lenta de OP GI. Ao final sem diferença. TAG nos quilomicrons entre 4 e 6 h – reduzida. Sem diferença em TAG fração IDL, col., apolipoproteína B48 - OP GI reduziu lipemia na fase inicial do período pós-prandial

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; GI – gordura interesterificada; GIP - Peptídeo insulínico dependente de glicose; GNI – gordura não interesterificada; OP – oleína de palma. PYY – Peptídeo PP relacionado à saciedade.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(SANDERS et al., 2011)  Estudo randomizado, cruzado. Pós prandial  25 homens e 25 mulheres saudáveis (idade média 24 anos)	Refeições ricas em gordura - Controle (óleo de girassol rico em oléico) 0,6 mol% de 16:00 em <i>sn-2</i> - Oleína de palma (OP) – 9,2 mol% - OP GI – 39,1 mol% - Banha – 70,5 mol%  50 g de gordura	- Lipídeos (AG livre no plasma; TAG) - Apolipoproteína B48 - Citoquinas (IL- 6, IL-8, TNF- $\alpha$ e E-selectina)	- TAG – diminuição 1- 4 h p/ OP GI em comparação com OP (e óleo de girassol alto oleico) – Menor pico das concentrações plasmáticas de TAG e AG não esterificados. - Apolipoproteína B48 – Para homens, foi menor que o controle, para banha (14%) e OP GI (16%) - IL-6 aumentou e demais reduziram - Gorduras sólidas a temperatura ambiente (com alta concentração de C16:00 em <i>sn-2</i> (OP GI e banha) reduzem lipemia pós-prandial em sujeitos saudáveis, comparado c/ óleos líquidos.

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; GI – gordura interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; OP – oleína de palma.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
<p>(ROBINSON et al., 2009)</p> <p>Estudo randomizado, cruzado. Pós-prandial (até 6 horas)</p> <p>10 obesos, homens, idade 59,3 (TG plasma &gt;1,69 mmol / L, e IMC &gt;30 ou circunferência da cintura &gt; 102 cm) e 11 não obesos (idade = 55,8)</p>	<p>Três dietas - margarina passada em 50 g de pão:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- GNI</li> <li>- GI (IQ)</li> <li>- GI (IE)</li> </ul> <p>Óleo de girassol rico em oléico e estearina de canola GVTH - 70:30 (gorduras ricas em ác. oleico e esteárico)</p> <p>Espécie de margarina (1 g de gordura / kg de massa corporal).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TAG, colesterol total, HDL-C e LDL</li> <li>- glicose, insulina e ácidos graxos livres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TAG aumentou (&gt; que 85% do que GNI) em obesos, em especial com GI (IQ)</li> <li>- A interesterificação pode afetar de forma diferente indivíduos saudáveis em comparação com aqueles já em risco de diabetes tipo 2 e / ou com doença cardiovascular.</li> </ul>

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; GI – gordura interesterificada;; GNI – gordura não interesterificada; GVTH – gordura vegetal totalmente hidrogenado; IE – interesterificação enzimática; IQ – interesterificação química.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(BERRY et al., 2007)  Estudo randomizado, cruzado. Pós-prandial (até 6 horas). Dois estudos: 1) Homens saudáveis / n = 20; 2) n = 18	Duas refeições teste – com uma semana entre cada refeição. 2 <i>muffins</i> e <i>milkshake</i> c/ 50 g de gordura: 1) OP x OPI 2) OPIE x OGAO	- Perfil de AG e posição <i>sn-2</i> nos quilomícrons; TAG, colesterol, LDL-C e HDL-C; Glicose e insulina; Fator VIIa (coagulação) e leucócitos; Atividade das lípases.	- OPI reduziu TAG e insulina pós prandial (duas primeiras horas), quando comparado com OP (aumento mais lento de TAG); OPI reduziu o aumento do Fator VIIa, qdo comparado com OGAO; Todas as gorduras elevaram leucócitos. - OPI não leva a alterações adversas comparado com OP e OGAO.
(BERRY; MILLER; SANDERS, 2007)  Estudo randomizado, cruzado. Dois estudos:  1) Pós-prandial (15 minutos a 8h); (n= 16) 2) 3 semanas, (n = 13)	1) 2 <i>muffins</i> e <i>milkshake</i> (50 g) 2) 2 <i>muffins</i> (30g)  - Gordura de karetê (GK) (C18:0) - GKI - OGAO (GK e GKI - + 10% de óleo de girassol)	- TAG, colesterol t, HD-c; AG do plasma e quilomícrons; glicose, insulina, HOMA-IR; Atividade lípases; Gorduras e perfil AG das fezes; características de fusão e conteúdo de sólidos das gorduras teste.	- Sem diferença entre GK e GKI. - Em comparação com OGAO, GKI resultou em menor (53%) lipídemia pós-prandial, maior (23%) atividade de lípase hepática e menor aumento pós-prandia do FVIIa - O elevada % de gordura sólida pode explicar a resposta lipídêmica reduzida da GK e GKI. Conteúdo de gordura sólida /37 °C: GK 22%, GKI 41% e OGAO 0%.

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; C18:0 – ácido esteárico; GK – gordura de Karetê; GKI - gordura de Karetê interesterificada; GNI – gordura não interesterificada; HOMA-IR - Índice de resistência insulínica; OGAO - óleo de girassol alto oleico; OP – oleína de palma; OPI - oleína de palma interesterificada.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

Estudo / Tipo / Amostra / Tempo	Dietas / Quantidade Gordura	Variáveis investigadas	Principais resultados
<p>(SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007)</p> <p>Estudo randomizado, cruzado, com adultos saudáveis. Dois estudos:</p> <p>1) 4 semanas cada (3 refeições / dia); n=30</p> <p>2) Efeitos pós prandiais (No 15° dia, receberam refeição teste); n = 19</p>	<p>Três grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- GI (IQ) - Osth + OS + OP</li> <li>- <i>Trans</i> – 40% de OSPH (10% AGT) + 30% de OS + 30% OP</li> <li>- Oleína de palma (OP) – por fracionamento.</li> </ul> <p>Dietas com 31% de gordura (todas com a mesma plasticidade), sendo &gt;70% gordura teste.</p> <p>Refeição teste (53 g da gordura teste)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lipoproteínas LDL-C/HDL-C</li> <li>- Glicose, insulina e peptídeo C</li> <li>- Perfil de AG (confirmação da ingestão da dieta)</li> </ul>	<p>Comparando c/ OP:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HDL-C - GT (-8%) e GI (-9%); LDL-C – <i>Trans</i> (+7%); Colesterol total / HDL-C – + 10% em GI e GT ; LDL-C/ HDL-C – + 15% em GI e <i>Trans</i>; GI – glicemia (quase +20%) e insulina (-22%); <i>Trans</i> – glicemia (+10%) e insulina (-10%).</li> <li>- GI aumentou a glicemia de jejum e a relação LDL-C/ HDL-C, além reduzir a concentração de insulina em jejum no plasma, em comparação com oleína de palma nativa.</li> <li>- Pós-prandial – GI - glicose (+ 40%); redução da insulina e Peptídeo C.</li> <li>- <i>Trans</i> e GI aumentam a relação LDL/ HDL-C e glicose em relação a uma gordura saturada não modificada (OP) em humanos.</li> </ul>

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; AGT – ácido graxo trans; GI – gordura interesterificada; IQ – interesterificação química; OSPH – óleo de soja parcialmente hidrogenado; Osth – óleo de soja totalmente hidrogenado; GVTH – gordura vegetal totalmente hidrogenado; OP – oleína de palma; OS – óleo de soja.



Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
<p>(YLI-JOKIPII et al., 2003)</p> <p>Estudo randomizado, cruzado e duplo cego. Pós-prandial (20 minutos a 8 horas)</p> <p>Adultos normolipídemicos (n=9)</p>	<p>Chocolate quente com:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Banha (B) (68% 16:0 em sn-2) ou</li> <li>- BI (52% 16:0 em sn-2)</li> </ul> <p>55 g por m<sup>2</sup> de área corporal; 4 semanas entre os dois testes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TAG, colesterol e AG livres</li> <li>- glicose e insulina</li> <li>- TAG e colesterol de quilomicrons e de VLDL-C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TAG no plasma tendência de maior aumento p/ BI, mas sem diferença estatística</li> <li>- Área sob a curva de TAG em VLDL-C foi maior p/ BI</li> <li>- TAG dos quilomícrons com mais C18:01 em <i>sn-2</i> e menos 16:00, do que gordura ingerida.</li> </ul>
<p>(YLI-JOKIPII et al., 2001)</p> <p>Estudo randomizado, cruzado e duplo cego. Pós prandial (6 horas)</p> <p>Mulheres saudáveis pré menopausa (n=10)</p>	<p>Leite com baunilha e:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- OP</li> <li>- OP interesterificada – c/ PF superior a OP.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TAG, colesterol e AG livres; insulina e glicose; TAG e colesterol de quilomicrons e de VLDL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IE – menor concentração e TAG e maior aumento dos níveis de insulina no início da resposta pós-prandial. Porém, quantidade total sem diferença estatística.</li> </ul>

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; B – banha; BI – banha interesterificada; OP – óleo de palma.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(CHRISTOPHE et al., 2000) A “margarina” e a gordura usada no preparo de alimentos foi substituída por uma das manteigas testes, por 4 semanas. Homens adultos (n=32)	- Manteiga ou - Manteiga IE  22,5 g/dia (17% do total de lipídeos) Obs.: interesterificação não foi confirmada por análise régio-específica.	- Colesterol t, LDL-C, HDL-C, colesterol livre, fosfolipídeos, apo A1 e apo B; Perfil de AG dos TAG do soro, AG livres, colesterol e fosfolipídeos.	- Sem diferenças significativas. - Não há justificativas para a substituição de manteiga por manteiga IE.
(MEIJER; WESTSTRATE, 1997)  Estudo <i>cross-over</i> , com dois períodos de 3 semanas (sem intervalo)  60 adultos saudáveis (50% de cada sexo)	- Margarina composta por 80% da mistura (36% óleo de coco + 33% óleo palma + 22% estearina de palma + 9% óleo de canola) + óleo de soja. - Margarina interesterificada (IQ) 20 ou 40 g /dia, ou seja, 4% a 8% da energia.	30 parâmetros (enzimas, lipoproteínas, proteínas, creatinina, uréia, glicose, etc.)	- Não alterou os vários parâmetros analisados, com exceção: - Menor concentração (10%) de dímeros-D para margarina interesterificada. Como não foi acompanhada de alterações de outros parâmetros relacionados à coagulação foi considerada não significativa.

Legenda: cont – continuação; IE – interesterificação enzimática; IQ – interesterificação química.

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

Estudo / Tipo / Amostra / Tempo	Dietas / Quantidade Gordura	Variáveis investigadas	Principais resultados
(NOAKES; CLIFTON, 1998)  Adultos com hiper-colesterolemia leve (n=38); 3 semanas para cada tipo de gordura	2 grupos e 3 intervenções dietéticas (20% de energia da dieta): 1) Manteiga; mistura de óleo de canola (OC) com <i>trans</i> ; OCI 2) Manteiga; mistura de óleo com AGPI com <i>trans</i> ; AGPI I  Margarinas contendo 25% de: - GI (rica em AGS) - palmoleína + óleo vegetal totalmente hidrogenado (com C12:0 e C14:0) ou - Gordura parcialmente hidrogenada ( <i>trans</i> )	Lipídeos plasmáticos (colesterol t, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e TAG)	<u>GI x <i>trans</i>:</u> - Canola - sem diferença significativa - AGPI - Colesterol total, LDL-C, TAG – <i>trans</i> > - Resultados de canola + AGPI - Colesterol total e HDL-C – <i>trans</i> <  <u>Manteiga x GI x <i>trans</i>:</u> - colesterol total e LDL-C > q <i>trans</i> e GI (canola; AGPI e todos) - TAG - > que IE (todos) - HDL-C - sem diferença - colesterol total: HDL-C > que <i>trans</i> e GI (canola); > q IE (AGPI e total)

Legenda: cont – continuação; AGS – ácidos graxos saturados; AGPI – ácidos graxos poli-insaturados; C12:0 – ácido láurico; C14:0 – ácido mirístico; GI – gordura interesterificada; OC – óleo de canola; OCI - óleo de canola interesterificada

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

Estudo / Tipo / Amostra / Tempo	Dietas / Quantidade Gordura	Variáveis investigadas	Principais resultados
(ZOCK et al., 1995)  Cruzado. Dois períodos de 3 semanas cada - coleta de sangue dias 1, 17 e 21, 38 e 42. Adultos (n=60)	Mesmo cardápio com margarinas contendo: - Óleo de palma (OP) (18% de 16:0 em sn-2) ou - OP (IE) (65% de 16:0 em sn-2) - (87,5% de estearina de palma + 11% de óleo de girassol alto oléico + 1,5% de girassol alto linoleico). Lípídeos - 30% de energia, sendo a margarina 64% dos TAG da dieta.	- TAG, colesterol, LDL-C e HDL-C	GI aumentou colesterol e LDL-C, em homens, mas não em mulheres.
(NESTEL et al., 1995)  Estudo randomizado, cruzado e duplo cego, com homens levemente hipercolesterolêmicos (n=27) 3 semanas p/ cada margarina e avaliação pós prandial	Três margarinas (com espalhabilidade ≠): - Óleo rico em ácido linoléico e moderado de AGT - Mistura óleo de palma (OP) - OPI (16:0 sn-2)  Pós prandial - Margarina + <i>cokies</i> preparados com a margarina - 1 g de gordura por kg de peso	- TG, colesterol, LDL-C, HDL-C e VLDL-C - Pós prandial - distribuição posicional de AG nos quilomicrons	- Sem diferença entre OP e OPI - Colesterol total, LDL-C e HDL-C mais reduzidos para óleo rico em ácido linoléico e moderado AGT - quando comparado com OP e OPI. - Quilomícrons no plasma - c/ mais AGS na posição sn-2 para OPI

Legenda: cont – continuação; AGS – ácidos graxos saturados; AGT – ácidos graxos trans; C16:0 – ácido palmítico; GI – gordura interesterificada; IE – interesterificação enzimática; OP – óleo de palma; OPI - óleo de palma interesterificada

Quadro 1.5 - Resumo das pesquisas com gordura interesterificada envolvendo experimentos em seres humanos (cont.).

<b>Estudo / Tipo / Amostra / Tempo</b>	<b>Dietas / Quantidade Gordura</b>	<b>Variáveis investigadas</b>	<b>Principais resultados</b>
(ZAMPELAS et al., 1994)  Homens saudáveis (n=16)  Pós prandial (6 horas)	- OP (6% 16:0 em sn-2) com Betapol (73% 16:0 sn-2)  - Mesmo perfil de AG, à base de oleína/estearina de palma, óleo de girassol alto em oléico.  40 g	- TAG - concentração de quilomicrons ricos e pobres em TAG - AG não esterificados - cetonas - glicose, insulina e GIP	- Sem diferença significativa - A distribuição posicional de AG nos triglicerídeos da dieta não foi determinante para a lipemia pós-prandial em indivíduos adultos do sexo masculino.

Legenda: cont – continuação; AG – ácido graxo; C16:0 – ácido palmítico; GI – gordura interesterificada; OP – óleo de palma.



### **3 GORDURAS MODIFICADAS E METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÊMICO**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no mundo, totalizando 30% das mortes. A formação da placa de ateroma na parede dos vasos sanguíneos, conhecida como aterosclerose, tem como consequências clínicas o infarto do miocárdio e o acidente vascular encefálico. Os fatores de risco associados a estas doenças são a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL-C, hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* e obesidade (SANTOS et al., 2013).

O padrão alimentar modula diferentes aspectos do processo aterosclerótico e fatores de risco cardiovasculares, como concentrações lipídicas no plasma, resistência à insulina e metabolismo glicídico, pressão arterial, processos oxidativos, função endotelial e inflamação vascular (SANTOS et al., 2013).

No que diz respeito à dislipidemia, a primeira meta lipídica para prevenção cardiovascular é a redução do LDL-C, seguida da redução das concentrações de TAG e a elevação das concentrações de HDL-C. O consumo de gordura saturada e *trans* é classicamente relacionado com elevação do LDL-C plasmático e aumento de risco cardiovascular. As repercussões da ingestão de gordura, no entanto, não se restringem ao metabolismo lipídico; o tipo de gordura ingerida pode influenciar também outros fatores de risco, como a resistência à insulina e a pressão arterial (SANTOS et al., 2013).

#### **3.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA E METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÊMICO**

##### **3.1.1 Metabolismo lipídico**

Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que o consumo de gordura *trans* provoca alteração do perfil lipídico, aumentando o colesterol total e o LDL-C e reduzindo o HDL-C, elevando assim o risco de doenças cardiovasculares (BAYLIN et al., 2003; FOURNIER et al., 2012; KARBOWSKA; KOCHAN, 2011; MENSINK; KATAN, 1990; MOZAFFARIAN; ARO; WILLETT, 2009; MOZAFFARIAN; CLARKE, 2009; WILLETT, 2012).

Alguns mecanismos foram propostos para justificar a ação da gordura *trans* sobre a elevação da colesterolemia e o desenvolvimento da aterosclerose.

Os AGT, assim como os saturados, aumentam as concentrações do colesterol total e do LDL-C, por empacotamento destes AG nas partículas de LDL, disponibilizando maior espaço para o transporte de colesterol. Além disso, os AGT reduzem a expressão gênica dos receptores hepáticos responsáveis pela captação das partículas de LDL-C (SANTOS et al., 2013). O consumo de gordura *trans* está associado também ao aumento das partículas de LDL-C pequena e densa, reconhecidamente mais aterogênicas (MAUGER et al., 2003).

De acordo com Chen et al. (2011), os AGT da dieta incorporam-se aos fosfolípidos da membrana plasmática de células vasculares, suprimindo a atividade do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$  - *transforming growth factor*  $\beta$ ), por um lado induzindo o aumento da afinidade da membrana por colesterol e por outro aumentando as concavidades dos lípidos da membrana, o que facilita o acúmulo dos receptores da proteína TGF-  $\beta$  (TR-I e TR-II), prejudicando a sinalização celular.

Os mecanismos envolvidos na redução do HDL-C por ação dos AGT foi explicado por Santos et al. (2013) em sua revisão. Os AGT induzem aumento da atividade da proteína envolvida no transporte reverso de colesterol, a CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*), responsável pela transferência de colesterol éster das HDL-C para VLDL-C e LDL-C. Além disso, os AGT aumentam o catabolismo das Apo A1 (principal proteína das HDL-C) e reduzem as Apo B-100 (principal proteína das LDL-C). A HDL-C é responsável em parte pela retirada de colesterol presente nos macrófagos das placas de aterosclerose. Os AGT também estão envolvidos no aumento do catabolismo do HDL-C, uma vez que induzem a produção de partículas de HDL-C mais ricas em TAG, melhor substrato para a lipase hepática.

A ingestão de gordura *trans* está também relacionada ao aumento da inflamação e disfunção endotelial, associados com o desenvolvimento de aterosclerose (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; GANGULY; PIERCE, 2015; MENAA et al., 2013a, 2013b; MICHAS; MICHA; ZAMPELAS, 2014; SANTOS et al., 2013; WANG; PROCTOR, 2013; WILLETT, 2012).



### 3.1.2 Glicemia e resistência insulínica

Alguns estudos sugerem que a ingestão elevada de gordura *trans* está relacionada ao desenvolvimento ou agravamento de resistência insulínica, especialmente em indivíduos com predisposição, elevando assim, o risco de desenvolvimento e/ou progressão de diabetes *mellitus* tipo 2 (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; MALIK; WILLET; HU, 2013; MENAA et al., 2013a; SANTOS et al., 2013; WANG; PROCTOR, 2013).

Foram propostos alguns mecanismos que tentam justificar a diminuição da sensibilidade à insulina. Segundo Saravanan; Haseeb; Ehtesham (2005), os AGT derivados da dieta podem incorporar-se aos lipídeos da membrana celular, afetando possivelmente a interação da glicose com o seu receptor de membrana. Também observaram aumento na expressão do RNAm da resistina, proteína associada à resistência insulínica em mamíferos. Supõe-se também que o aumento do estresse oxidativo e da inflamação, assim como a disfunção endotelial podem estar envolvidos no aumento da resistência insulínica (RISÉRUS, 2006).

De acordo com Santos et al. (2013), os AGT provocam maior lipogênese hepática, quando comparado aos AGS e poli-insaturados. Além disso, outro mecanismo que parece estar envolvido é a redução da síntese das proteínas estimuladoras de acilação (ASP - *human acylation-stimulating protein*), as quais captam glicose, independentemente da ação da insulina e atuam favorecendo a lipogênese.

### 3.1.3 Atuação sobre o fígado e sobre o peso corporal

Estudos em animais sugerem que os AGT tendem a depositar-se em maior proporção na gordura visceral e especialmente hepática (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; MENAA et al., 2013b), como maior tendência ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (NASH), devido a maior lipogênese (SANTOS et al., 2013). Parece ainda haver uma tendência em aumentar a gordura corporal total (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012; MENAA et al., 2013b).

## 3.2 GORDURA INTERESTERIFICADA E METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÊMICO

### 3.2.1 Metabolismo lipídico

A maioria dos estudos realizados em animais ou em seres humanos tem focado prioritariamente os efeitos das GI sobre as concentrações de lipídeos no plasma.

Como apresentado no Quadro 1.4, a maioria dos estudos com animais envolvendo o consumo de GI avaliou parâmetros do metabolismo lipídico em ratos *Wistar*, os quais comparam uma GI com gordura semelhante (mesmo perfil de AG) não interesterificada e os resultados indicam redução das concentrações de colesterol total (NAGARAJU; LOKESH, 2007; REENA; GOWDA; LOKESH, 2011; REENA; LOKESH, 2007; RODRIGUES; SCHIESSEL, 2009), de LDL-C (REENA; GOWDA; LOKESH, 2011; REENA; LOKESH, 2007, 2012; SHARMA; LOKESH, 2013) e TAG (SHARMA; LOKESH, 2013).

Reena; Gowda; Lokesh (2011) atribuem a redução do LDL-C à maior captação da LDL-C, por aumento dos seus receptores hepáticos e aumento da via catabólica do colesterol através da ativação da expressão do gene *CYP7A1*. Tais resultados sugerem que a modificação da posição do AG na molécula do glicerol ocasionado pelo processo de interesterificação pode modular as concentrações circulantes de LDL-C pela regulação de enzimas-chave envolvidas no metabolismo do colesterol. Porém, em leitões, foi observada uma tendência à elevação das concentrações de LDL-C e um aumento de TAG no grupo que recebeu oleína de palma interesterificada, quando comparada à oleína de palma GNI ou banha (PONNAMPALAM et al., 2011).

Com relação à absorção dessas gorduras, Farfán et al. (2013) verificaram em ratos *Sprague-Dawley* que quanto maior o ponto de fusão da gordura, mais lenta é a absorção, mas o total absorvido não sofre alteração. Enquanto Sakono et al. (1997) observaram também em ratos da mesma linhagem maior aumento na absorção de AG provenientes de GI.

Reena; Gowda; Lokesh (2011) avaliaram alguns parâmetros trombóticos, como agregação plaquetária e eicosanóides no soro e não encontram diferenças significativas entre GI e GNI. No entanto, Afonso et al. (2016), ao estudarem os efeitos do elevado consumo de GI (40% kcal de lipídeos), contendo ácido palmítico na posição *sn-2*, em camundongos LDLr-KO por 16 semanas, verificaram a indução no desenvolvimento de aterosclerose pela promoção do acúmulo de colesterol em partículas de LDL-C e macrófagos, o que ativa a processo

inflamatório. Fato não observado com GI contendo ácido esteárico na posição *sn-2*.

No entanto, quase todas as pesquisas com animais que encontraram redução nas concentrações de colesterol total, LDL-C e TAG e que não encontraram diferenças quanto aos parâmetros trombóticos utilizaram GI obtidas a partir da mistura de óleos ricos em AG insaturados, tais como de linhaça, de farelo de arroz, de gergelim e de amendoim. Contudo, há grande predominância de AGS nas GI comercializadas (SANTOS et al., 2013). Além disto, ratos *Wistar* não são bons modelos para estudo de perfil lipídico (AFONSO et al., 2016).

As investigações científicas em humanos que avaliaram os efeitos agudos e crônicos sobre os parâmetros lipídicos a partir do consumo de gorduras IE estão apresentados no Quadro 1.5. Estudos têm avaliado a lipemia pós-prandial, por ser um fator considerado importante no desenvolvimento de doença arterial coronariana (YLI-JOKIPII et al., 2001).

No que diz respeito à lipemia pós-prandial, a maioria dos estudos mostrou lipemia reduzida quando do consumo de 50 a 75 g de oleína de palma (OP) IE (com maior proporção de C16:0 na posição *sn-2*), quando comparada à OP GNI, especialmente durante a fase inicial do período pós-prandial, seja em indivíduos saudáveis (BERRY et al., 2007; SANDERS et al., 2011; YLI-JOKIPII et al., 2001), como com hipertrigliceridemia (HALL et al., 2014). No estudo de Zampelas et al. (1994), não houve diferença entre os grupos.

Os pesquisadores atribuem a redução da lipemia ao maior conteúdo de gordura sólida ou ponto de fusão das GI utilizadas (BERRY; MILLER; SANDERS, 2007; SANDERS et al., 2011; THILAKARATHNA et al., 2016; YLI-JOKIPII et al., 2001). De acordo com Yli-Jokipii et al. (2003) uma gordura com menor conteúdo de gordura sólida, será melhor emulsificada e, conseqüentemente, melhor absorvida.

No entanto, nos estudos com manteiga de karitê (com maior proporção de C18:0 na posição *sn-2*), banha ou óleo de soja não foram observadas diferenças na lipemia pós prandial entre GI e GNI (BERRY; MILLER; SANDERS, 2007; SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007; YLI-JOKIPII et al., 2003).

Por outro lado, Robinson et al. (2009) observaram aumento de TAG no plasma de indivíduos obesos, após o consumo de margarina contendo GI produzida por processo enzimático, formulada com óleo de girassol alto oleico e estearina de canola, na proporção de 1 g de gordura/kg de peso corporal.

Com relação aos resultados encontrados nas pesquisas de 3 a 6 semanas, alguns estudos não encontraram diferenças significativas nos parâmetros relacionados ao metabolismo lipídico, ao pesquisar GI e gordura semelhante não interesterificada (CHRISTOPHE et al., 2000; FILIPPOU et al., 2014b; MEIJER; WESTSTRATE, 1997). Meijer; Weststrate (1997) utilizaram uma pequena quantidade de GI, 9% na margarina teste.

Outros estudos compararam os efeitos do consumo de GI com outras gorduras, como gordura fontes de *trans* ou gordura de palma (NESTEL et al., 1995; NOAKES; CLIFTON, 1998; SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007).

Nestel et al. (1995) demonstraram que a margarina de óleo de palma (OP) interesterificada influenciou de forma semelhante lipídeos plasmáticos em homens hipercolesterolêmicos, quando comparado com OP GNI. Porém, observaram elevação nas concentrações de colesterol total, LDL-C e HDL-C, quando comparado com óleo contendo AGT. Além disto, verificaram que a transferência de ácido palmítico para a posição *sn-2*, pelo processo de interesterificação foi refletida nos quilomícrons do plasma.

Noakes; Clifton (1998) compararam manteiga, gordura *trans* e GI (as duas últimas à base de óleo de canola ou de óleos poli-insaturados) e observaram que quando as gorduras *trans* e GI foram formuladas com AG poli-insaturados, a GI teve menos efeito no aumento do colesterol total, no LDL-C e nos TAG, do que a gordura *trans*. No entanto, não foram observadas diferenças significativas quando as gorduras eram à base de óleo de canola, fonte de AG monoinsaturados.

Por outro lado, Sundram; Karupaiiah; Hayes (2007) observaram aumento da relação LDL-C/HDL-C quando do consumo de GI rica em ácido esteárico (composto por óleo de soja e palma), em comparação com oleína de palma GNI, 22% do conteúdo de energia. A justificativa foi pautada nas quantidades de ácido esteárico na posição *sn-2* (15%) e de AGS nesta mesma posição (2,5 vezes mais), em comparação com a oleína de palma. No entanto, o método utilizado para a discriminação regioespecífica dos AG nas moléculas de TAG (cromatografia de fase reversa líquida de alta eficiência - HPLC) foi considerada inadequada por Destailats; Moulin; Bezalgues (2007).

Zock et al. (1995) encontraram concentrações mais elevadas de colesterol total e LDL em homens, mas não em mulheres, ao consumir GI à base de estearina de palma, comparada com a mesma gordura GNI. Os mecanismos envolvidos não foram descritos pelos autores.

Em suma, pode-se concluir que não há consenso sobre os efeitos do consumo de GI sobre o metabolismo lipídico. Em ratos *Wistar* a GI à base de AG insaturados reduziu colesterol total, LDL-C e TAG. Em suínos, elevou LDL-C e TAG. No contexto de dieta hiperlipídica, a GI com predominância de C16:0 na posição *sn-2* induziu aterosclerose em camundongos LDLr-KO, diferentemente de C18:0.

Em seres humanos, nos estudos de avaliação pós-prandial a oleína de palma interesterificada (fonte de C16:0 na posição *sn-2*) reduziu a lipemia, especialmente nas primeiras horas da digestão. Fato não observado quando a GI havia sido elaborada com outras gorduras, com C18:0 nesta mesma posição por exemplo. Em obesos GI elevou TAG no plasma. Nas avaliações de consumo crônico metade dos estudos não apresentou diferenças significativas e dois estudos indicaram aumento na relação LDL-C/HDL-C ou no colesterol total e LDL-C (em homens, mas não em mulheres).

### 3.2.2 Metabolismo glicêmico

Poucas pesquisas com animais avaliaram parâmetros do metabolismo glicêmico (Quadro 1.4). Ponnampalam et al. (2011) não encontraram diferenças significativas nos níveis de insulina em leitões e Rodrigues; Schiessel (2009) não encontraram diferenças na glicemia de ratos *Wistar*, quando avaliaram os efeitos do consumo de GI.

Nas pesquisas com seres humanos, a maioria dos estudos de avaliações pós-prandiais não observou diferença significativa nas concentrações de glicose e/ou insulina após o consumo de GI (BERRY; MILLER; SANDERS, 2007; ROBINSON et al., 2009; YLI-JOKIPII et al., 2001, 2003). Tais estudos avaliaram diferentes gorduras, tais como óleo de girassol alto oleico (OGAO) com estarina de canola; manteiga de karete comparado com OGAO e banha. Por outro lado, Berry; Miller; Sanders (2007) observaram redução nas concentrações de insulina nas duas primeiras horas. Em um estudo da mesma equipe (FILIPPOU et al., 2014a) foi observado que dieta com altas proporções de GI (16:0 na *sn-2*) não afetou as concentrações de insulina e glicose, mas reduziu a liberação de GIP (*glucose-dependent insulinotropic peptide*), de incretina (que promove aumento da produção de insulina pelo pâncreas), e em mulheres tendeu a aumentar de forma menos expressiva o PYY (*peptide YY*), que suprime a secreção pancreática.

A maioria dos estudos com seres humanos, de 3 a 6 semanas não apresentou diferenças significativas quanto ao metabolismo glicêmico (BERRY; MILLER; SANDERS, 2007; MEIJER; WESTSTRATE, 1997;

ZAMPELAS et al., 1994). Porém, Sundram; Karupaiah; Hayes (2007) observaram em indivíduos saudáveis que a GI rica em ácido esteárico aumentou a glicemia de jejum e diminuiu a concentração de insulina no plasma, em comparação com oleína de palma. Tais resultados foram mais acentuados com GI do que com gordura *trans*.

Segundo Sundram; Karupaiah; Hayes (2007), o mecanismo envolvido na alteração do metabolismo glicêmico tem relação com a produção reduzida de insulina. Porém, outros estudos indicam que AGS podem aumentar a resistência insulínica, por modificar a composição de AG das membranas celulares, o que prejudica as funções como fluidez, permeabilidade iônica e a ligação do receptor de insulina (RISÉRUS, 2006).

Por outro lado, Filippou et al. (2014b) encontraram menor valor de glicose plasmática (8%) nas duas primeiras horas após consumo de OP interesterificada, mas não encontraram diferenças com relação aos outros parâmetros, como glicemia de jejum, pico de glicose, HOMA 2-IR (do inglês *Homeostatic Model Assessment*, método que avalia a resistência à insulina), glicose iAUC (área incremental sob a curva da resposta glicêmica) e peptídeo C. Os autores concluíram que 16:0 na posição *sn*-2 não prejudica a secreção de insulina e a homeostase da glicose em indivíduos saudáveis.

Assim, pode-se observar que não há consenso na literatura em relação à influência da ingestão de GI sobre o metabolismo glicêmico.

### **3.2.3 Atuação sobre o peso corporal e sobre os marcadores hepáticos**

Pesquisas com animais têm encontrado uma tendência a maior ganho de peso, quando do consumo de GI, conforme exposto no Quadro 1.4. Nos estudos com seres humanos, o ganho de peso corporal e a adiposidade não têm sido investigados.

Gouk et al. (2013) em pesquisa com dieta hiperlipídica, com camundongos C57BL/6, observaram que a gordura de palma interesterificada levou ao maior acúmulo de gordura corporal e menor excreção de AGS nas fezes, quando comparado com gordura de palma GNI. Magri et al. (2015); Velasco et al. (2015) avaliaram o ganho de peso e a adiposidade em camundongos C57BL/6, cujas mães receberam GI durante a gestação e a lactação e concluíram que a ingestão materna de GI (e/ou gordura de palma) predispôs a prole ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta, quando comparado à GVPH.

Bispo et al. (2015) observaram que a GI (bem como a gordura de palma e a GVPH) consumidas pela mãe durante a gestação e lactação, afeta a regulação na ingestão de alimentos na prole, ao avaliar a expressão de proteínas (receptores de insulina e proteína quinase B) no cérebro de ratos *Wistar*.

Ponnampalam et al. (2011) também observaram maior ganho de peso em leitões que receberam dieta com oleína de palma interesterificada enzimaticamente, quando comparada à banha, oleína de palma natural e oleína de palma interesterificada quimicamente.

Não foram encontrados experimentos com animais que avaliaram a atividade de enzimas no fígado. Porém, em humanos, Meijer; Weststrate (1997) ao comparar um pequeno consumo de gordura interesterificada e GNI (na forma de margarina, correspondendo de 4% a 8% das kcal totais vindas dos lipídeos), por um período de três semanas cada, em adultos saudáveis, não encontraram diferenças nas concentrações de AST (aspartato aminotransferase) e a ALT (alanina aminotransferase).

#### **4 GORDURAS MODIFICADAS E ESTRESSE OXIDATIVO**

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio significativo entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a proteção antioxidante, em favor do primeiro, o que causa dano oxidativo (HALLIWELL, 2011).

EROs podem ser átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo capaz de existência independente (espécies radicalares) ou espécies não radicalares, que mesmo não possuindo elétrons desemparelhados em seu último orbital, possuem reatividade devido à sua instabilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Entre as principais EROs radicalares estão o radical hidroxil ( $\text{HO}\cdot$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ), o alcóxil ( $\text{RO}\cdot$ ) e o óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ). Entre os não radicalares estão o oxigênio singlete ( $1\text{O}_2^*$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Além dos EROs existem outras espécies reativas, tais como o nitrogênio, o cloro, o ferro, o cobre e espécies de enxofre, cada qual com sua reatividade química particular. Esse conjunto pode ser chamado de espécies reativas (ER) (HALLIWELL, 2011).

O organismo produz em condições fisiológicas certa quantidade de EROs, as quais exercem importantes funções biológicas atuando como mediadores para a transferência de elétrons em reações bioquímicas e como sinalizadores fisiológicos. São fundamentais em processos como a

geração de energia na forma de ATP, fertilização do óvulo, ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante processos infecciosos. Porém, quando produzidas em excesso, podem trazer consequências danosas (BARBOSA et al., 2010; HALLIWELL, 2011).

Os organismos dispõem de um sistema de defesa antioxidante que inibem e/ou eliminam os EROs, atenuando as consequências danosas causadas por sua ação deletéria. Esse sistema de defesa antioxidante pode ser enzimático e não-enzimático. As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo. Os radicais  $O_2\bullet$  são convertidos a  $H_2O_2$  pelas enzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. Por conseguinte, CAT e a GPx, de forma independente, convertem o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Na reação catalisada pela GPx, ocorre consumo de GSH, porém este tripeptídeo pode ser novamente convertido à sua forma reduzida (GSH), pela ação da glutatona redutase (GR), às custas de NADPH, portanto, com ação antioxidante de forma indireta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão incluídos os antioxidantes naturais, como o GSH (glutatona reduzida) e o ácido úrico, e os nutrientes  $\alpha$ -tocoferol, vitamina E, vitamina C, carotenóides (como o  $\beta$ -caroteno e licopeno) e compostos fenólicos (flavonóides, principalmente) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A GSH é um antioxidante de primeira linha de ação, além de apresentar grande ubiquidade (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Dentre os não enzimáticos existem ainda os antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), os quais são os mais utilizados pela indústria de alimentos, inclusive na fabricação de gorduras modificadas (RAMALHO; JORGE, 2006).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante, ou seja, o estresse oxidativo, pode causar danos às macromoléculas biológicas, tais como açúcares, proteínas, lipídeos e DNA, e/ou morte celular. O principal alvo são as membranas celulares que apresentam uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares (HALLIWELL, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O dano ao DNA pode ocasionar mutagênese e/ou carcinogênese. As EROs podem causar modificação dos pares de bases nitrogenadas e ligação cruzada do DNA com proteínas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A modificação oxidativa ocorrida nas proteínas aumenta a suscetibilidade à proteólise enzimática, o que prejudica o mecanismo de



transdução de sinal, da atividade enzimática, da estabilidade ao calor e proteólise (LOBO et al., 2010). Durante o estresse oxidativo ocorre a fragmentação das cadeias proteicas e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, particularmente a prolina, arginina e lisina, com produção de compostos carbonilados (BERGER et al., 1999).

A peroxidação lipídica é um processo de oxidação dos lipídeos poli-insaturados. Algumas espécies reativas retiram um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de AG poli-insaturados, o que ocasiona o início do processo de peroxidação. Os radicais de carbono formados podem reagir espontaneamente com o oxigênio e formar radicais peroxila que propagam a cadeia de peroxidação, retirando átomos de hidrogênio para formar hidroperóxidos lipídicos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas de AG. Como consequência, ocorre a produção de produtos como isoprostanos e malondialdeído (MDA). O MDA constitui-se em bioindicador para a peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação de fosfolipídios da membrana, juntamente com a oxidação de proteínas, prejudica a fluidez e compromete funções importantes, como regulação da atividade enzimática, permeabilidade, transporte de nutrientes e estabilidade osmótica das células (REENA; LOKESH, 2011).

Desta forma, as espécies reativas desempenham papéis fundamentais na origem e patologia de várias doenças, como câncer, aterosclerose, acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas, como a demência. No câncer, em particular, as espécies reativas podem estar envolvidas na sua gênese, progressão e às vezes até mesmo na cura (HALLIWELL, 2011), uma vez que podem estar relacionados ao processo de morte das células cancerígenas.

Estudos têm demonstrado que dieta hiperlipídica ocasiona estresse oxidativo. Dieta hiperlipídica, composta por 40 g de manteiga de cacau/100 g, induziu o estresse oxidativo em camundongos C57BL/6J e em ratos *Sprague Dawley*, no período de 6 semanas (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008; YIDA et al., 2015). No estudo com ratos *Wistar* que receberam dieta hiperlipídica à base de gordura de coco, por 10 semanas, apresentaram concentrações elevadas de TBARS e atividades reduzidas de SOD, CAT, GSH e GPx no fígado, quando comparado ao grupo controle, normolipídico (VIJAYAKUMAR; SURYA; NALINI, 2004).

Uma dieta hiperlipídica, em especial rica em gordura saturada, aumenta a concentração de AG livres no fígado, que faz aumentar a  $\beta$ -oxidação de AG nas mitocôndrias, levando a um aumento de transferência

de elétrons com o auxílio do Citocromo C, o que eleva a produção de EROs (KESH; SARKAR; MANNA, 2016).

Por outro lado, AG poli-insaturados dietéticos são mais propensos a oxidação, podendo aumentar a formação de biomarcadores do estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA), especialmente no contexto de uma dieta desequilibrada entre compostos anti-oxidantes e pró-oxidantes (GUÉRAUD et al., 2015). A relação de AG P/S (poli-insaturado/saturado) aumentada eleva o risco de suscetibilidade de estresse oxidativo (REENA; LOKESH, 2011). Mas, apesar dos AG poli-insaturados serem mais propensos à oxidação, estudos sugerem que os mesmos podem reduzir os danos oxidativos *in vivo* (HALLIWELL, 2011).

#### 4.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA E ESTRESSE OXIDATIVO

Alguns estudos têm associado o consumo de gordura *trans* ao estresse oxidativo. Ratos *Wistar* alimentados por quatro semanas com dieta hiperlipídica com diferentes quantidades de ácidos graxos *trans* apresentaram aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas (SOD, CAT e GPx). Neste estudo um grupo havia recebido 20% de óleo de soja oxidado e outro recebeu 20% de margarina. O grupo que tinha margarina na ração apresentou maior resposta inflamatória no fígado (DHIBI et al., 2011).

Camundongos C57BL/6J alimentados durante sete semanas com uma dieta suplementada com óleo de canola parcialmente hidrogenado (13,6% da energia, sendo 3% de ácido graxo *trans* 18:1t) apresentaram defesa alterada para o estresse oxidativo. Foram observados redução na concentração plasmática de vitamina E e elevação das concentrações de F2-isoprostanos, sugerindo estresse oxidativo aumentado. Além de elevação de RNAm da proteína glicose-regulada 78 (GRP78), cuja expressão é induzida durante o estresse oxidativo (CASSAGNO et al., 2005).

Em estudo com adultos saudáveis ao receberem durante seis semanas suplementação de gordura *trans* foi observado aumento em marcadores de estresse oxidativo, Em outro estudo foi verificado forte associação entre a ingestão de *trans* e marcadores de inflamação sistêmica (BALLESTEROS-VÁSQUEZ et al., 2012).

## 4.2 GORDURA INTERESTERIFICADA E ESTRESSE OXIDATIVO

Estudos com ratos *Wistar* não encontraram diferenças significativas com relação à peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes com o consumo de GI ou gordura semelhante não interesterificada (NAGARAJU; LOKESH, 2007; REENA; LOKESH, 2011). Porém, tais GI foram produzidas em laboratório a partir de óleos e gorduras de consumo não frequente para a maioria das populações, tais como gordura de coco, óleo de farelo de arroz, óleo de gergelim, óleo de amendoim e azeite de oliva.

Por outro lado, Misan et al. (2015) e Velasco et al. (2015) ao estudarem o efeito do consumo materno de diferentes gorduras (GI, gordura de palma e GVPH) durante a gestação e a lactação, sobre o cérebro da prole de camundongos C57BL/6, observaram maior predisposição à inflamação, quando comparado ao grupo controle.

No estudo de avaliação pós-prandial de Sanders et al. (2011) com adultos saudáveis foi observado aumento nas concentrações das citocinas IL-6, mas não de outros marcadores de inflamação, após a ingestão de refeição rica em gordura composta por oleína de palma interesterificada.

## 5 GORDURAS MODIFICADAS E CÂNCER DE MAMA

Câncer é um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2019).

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças, com comportamentos distintos, tanto com relação às manifestações clínicas e morfológicas, quanto às assinaturas genéticas e respostas terapêuticas. O carcinoma ductal infiltrante é o tipo histológico mais comum e compreende entre 80% e 90% do total de casos (INCA, 2019).

O câncer de mama é o mais incidente na população feminina mundial e brasileira, sem considerar o de pele não melanoma. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos, quanto nos em desenvolvimento. No Brasil, estimou-se a ocorrência de 59.700 novos casos para o ano de 2018. Dados sobre a mortalidade revelam mais de 15.400 mortes no ano de 2015 no Brasil e estima-se que

em todo o mundo mais de 627.000 mulheres morreram em 2018 devido ao câncer de mama (INCA, 2019; WHO, 2019).

Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como a idade, especialmente a partir dos 50 anos; fatores endócrinos/história reprodutiva, principalmente envolvendo o hormônio estrogênio; fatores genéticos/hereditários, envolvendo mutações nos genes, sobretudo em BRCA1, BRCA2 e p53; e fatores comportamentais e ambientais. Dentre os fatores comportamentais e ambientais estão - além da ingestão de bebida alcoólica e exposição à radiação ionizante - o sobrepeso e obesidade após a menopausa (INCA, 2016).

A recomendação alimentar para a prevenção de câncer de mama é evitar o consumo de alimentos com alta densidade energética, tais como alimentos processados e *fast foods*, em sua maioria ricos em gordura e açúcar, com o intuito de prevenir e controlar o ganho de peso, sobrepeso e obesidade (INCA, 2007).

Por outro lado, embora haja controvérsias (CAO; HOU; WANG, 2016; THOMSON, 2012), pesquisas têm associado o consumo de dietas hiperlipídicas com o risco aumentado de câncer de mama (SCHULZ et al., 2008; SIERI et al., 2014; TURNER, 2011).

O câncer de mama está classificado em subtipos, que diferem em prognóstico e fatores de risco. Esses subtipos são expressos como sendo positivos ou negativos para os receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*). Para Sieri et al. (2014) os resultados controversos encontrados nas investigações sobre consumo de gordura e risco de câncer de mama podem ser justificados pelo fato desses subtipos não terem sido devidamente considerados.

Um estudo de coorte prospectivo em uma grande e heterogênea amostra de mulheres ( $n = 337.327$ ), com 10.062 casos de câncer de mama, concluiu que uma dieta rica em gordura aumenta o risco de câncer de mama (SIERI et al., 2014).

Maior risco de câncer de mama também foi encontrado em mulheres na pós-menopausa que consumiam dietas ricas em gordura, na meta-análise conduzida por Turner (2011).

No estudo de Schulz et al. (2008), o elevado consumo de gordura (> 40% de energia de gordura), caracterizado por uma maior ingestão de carnes processadas, margarina e manteiga foi associado com um risco duas vezes aumentado para câncer de mama.

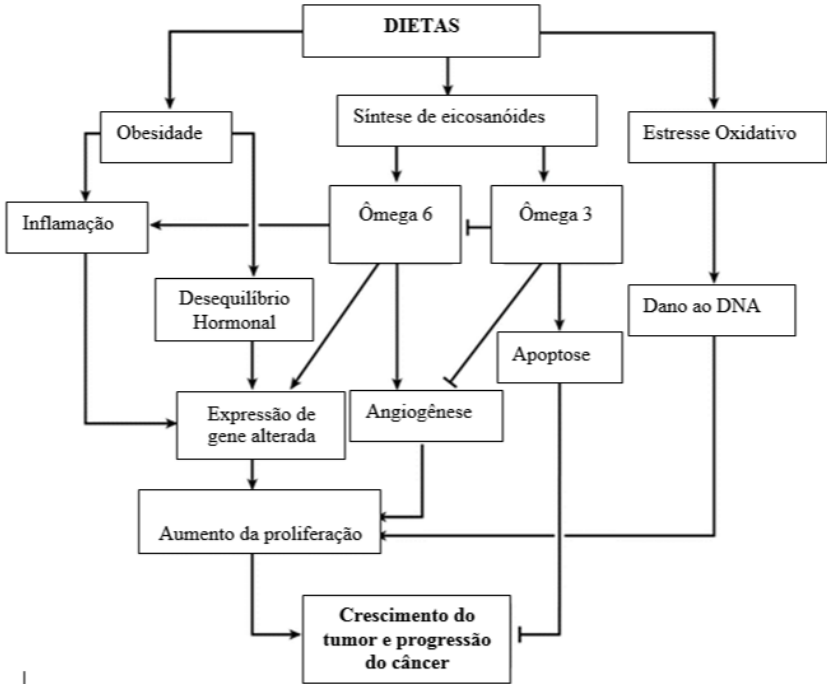
Estudos com animais também relacionaram o elevado consumo de gordura com o câncer de mama. No experimento conduzido por Gu et al. (2011), camundongos C57BL/6 em pós-menopausa foram alimentados com dietas hiperlipídicas (60% kcal de gordura) por doze semanas. Foi constatada promoção da angiogênese tumoral e progressão do tumor (E0771 – câncer de mama RE+), possivelmente pelo aumento da massa de tecido adiposo e adipocinas, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor).

Por outro lado, alguns experimentos têm observado progressão do tumor, mesmo na ausência de ganho de peso. O experimento de Lamas et al. (2015) com camundongos fêmeas atímicos Balb-c (Nu/Nu) alimentados com uma dieta hiperlipídica (36% kcal de banha) por cinco meses e submetidos ao implante de células MCF-7, demonstrou que embora sem ganho de peso, a dieta hiperlipídica aumentou a proliferação celular no tumor RE+ e reduziu a apoptose tumoral. E na pesquisa de Kim et al. (2011), com camundongos Balb-c com implante de células de carcinoma mamário 4T1, alimentados com dieta hiperlipídica (60% kcal, 54% kcal de banha) por dezesseis semanas, foi observado também crescimento do tumor mamário, metástase e aumento da mortalidade, mesmo na ausência de ganho de peso.

Makarem et al. (2013) propuseram mecanismos potenciais que podem estar envolvidos na associação entre uma dieta rica em gorduras e a progressão do câncer de mama. Os principais mecanismos incluem a síntese de eicosanóides, desequilíbrios hormonais, estresse oxidativo e dano ao DNA e alteração da expressão do gene, como mostrado na Figura 1.4.

Embora não haja consenso, gorduras saturadas e *trans* parecem estar relacionadas ao aumento do risco de câncer de mama. Já gorduras poli-insaturadas do tipo ômega 3 e uma relação positiva entre ômega 3/ômega 6 tendem a desempenhar papel benéfico na prevenção e na redução da mortalidade deste tipo de câncer. Estudos que avaliaram a ingestão de ômega-3 sugerem uma associação inversa com a incidência e mortalidade entre vítimas de câncer de mama (BASSETT et al., 2016; MAKAREM et al., 2013). Outros estudos destacam a importância da relação ômega-3/ômega-6 (BASSETT et al., 2016; KHANKARI et al., 2015; SIMONSEN et al., 1998).

Figura 1.4 - Descrição dos potenciais mecanismos que podem estar envolvidos na associação hipotética entre as gorduras da dieta e a progressão do câncer de mama.



Fonte: adaptado de Makarem et al. (2013)

## 5.1 GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA E CÂNCER DE MAMA

Estudos relacionaram o consumo de gordura *trans* com risco aumentado para câncer de mama (BAKKER et al., 1997; CHAJÈS et al., 2008; HU et al., 2011; KOHLMEIER et al., 1997), especialmente entre mulheres pós menopausa (KIM et al., 2006; LAAKE et al., 2013) e nos casos específicos de tumores RE-negativo / RP-negativo (WIRFÁLT et al., 2011); risco aumentado de morte, entre mulheres com câncer de mama (HOLMES et al., 1999; MAKAREM et al., 2013); redução da sobrevivência entre camundongos portadores de tumor de Ehrlich (AWAD, 1981) e aumento de estresse oxidativo, predispondo ao câncer, entre camundongos (CASSAGNO et al., 2005).

O mecanismo envolvendo AGT e câncer parece estar relacionado à incorporação desses ácidos graxos nos fosfolipídios da membrana celular, o que ocasiona redução da sua fluidez e faz aumentar a atividade dos radicais livres, resultando em estresse oxidativo e consequente dano ao DNA (SMITH et al., 2009). Além disso, segundo Chen et al. (2011) os AGT da dieta ao serem incorporados nos fosfolipídios das membranas plasmáticas suprimem a capacidade de resposta do fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$  - *Transforming growth factor*  $\beta$ ), proteína que atua como fator antiproliferativo em estágios iniciais da oncogênese.

Segundo Chajès et al. (2008), a avaliação da ingestão de AGT por meio de questionários dietéticos é susceptível a erros, uma vez que os alimentos podem ser elaborados com diferentes tipos de óleos e gorduras. Tal fato pode justificar parcialmente as evidências insuficientes e inconsistentes ligando a gordura *trans* ao câncer de mama. Smith et al. (2009) concluem no estudo de revisão e afirmam que há necessidade de mais pesquisas para avaliar com precisão a relação entre gordura *trans* e o câncer de mama.

## 5.2 GORDURA INTERESTERIFICADA E CÂNCER DE MAMA

Publicações científicas que relacionam o consumo de gordura interesterificada e câncer não foram encontradas. Porém, uma GI tende a ser rica em AGS que ocupam prioritariamente a posição *sn-2* do glicerol, isto significa que além da maior proporção de AGS, esses tendem a ser absorvidos em maior quantidade.

Estudos epidemiológicos indicam que alta ingestão de gordura saturada aumenta o risco de câncer de mama (BASSETT et al., 2016;

MAKAREM et al., 2013). Em especial nos casos de tumores dos tipos receptor-hormônio-positivo (SIERI et al., 2014). Dentre os AGS, o ácido palmítico foi destaque principalmente nos casos de tumores RE+ e EP+ (BASSETT et al., 2016). A ingestão de gordura saturada também está relacionada com impacto negativo na sobrevivência de pacientes diagnosticados com este tipo de câncer (BRENNAN et al., 2017).

### 5.3 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)

Trata-se de um tumor transplantável, introduzido na oncologia experimental por Paul Ehrlich em 1906, sendo um dos primeiros tumores transplantáveis descritos na literatura. O tumor de Ehrlich é reconhecido como um tumor mamário espontâneo, do tipo carcinoma, de camundongo fêmea (FECCHIO et al., 1990).

Há dois tipos de tumor de Ehrlich, um de forma sólida e outro de forma ascítica. Na forma sólida as células tumorais são inoculadas no tecido subcutâneo ou na veia dos animais, as quais crescem em diferentes locais do organismo. Na forma ascítica as células tumorais são transplantadas na cavidade peritoneal do animal, onde crescem em suspensão e formam ascite (FECCHIO et al., 1990).

O TAE é mantido por meio de passagens intraperitoneais de células do tumor de um animal para outro. Após aproximadamente sete dias de inoculação do tumor na cavidade peritoneal é possível observar grande quantidade de fluido levemente viscoso e de aspecto leitoso. Após 10 dias da inoculação, cerca de 90% das células peritoneais são células tumorais (FECCHIO et al., 1990; GUERRA, 1983).

Trata-se de um modelo animal bastante usado na oncologia experimental pela sua fácil manipulação e transplante em camundongos (QUEIROZ et al., 2004) e também pelo curto tempo de desenvolvimento do tumor. Neste modelo é possível observar o desenvolvimento do tumor no prazo de dez dias.

Entre os parâmetros observados para avaliar o desenvolvimento do tumor está a contagem de vasos sanguíneos do peritônio dos animais. Parte-se do princípio que quanto maior a angiogênese (ou neovascularização), mais condições para o desenvolvimento do tumor. Durante o desenvolvimento tumoral as necessidades metabólicas teciduais excedem a demanda de oxigênio e de nutrientes disponibilizados pelos capilares existentes. Desta forma, há uma resposta fisiológica para aumentar a densidade da rede capilar, ocorrendo assim a proliferação vascular (ADORNO, 2008; JAKÓBISIAK; LASEK; GOLB, 2003; OLIVEIRA et al., 2010).



## REFERÊNCIAS

ABIA. **Acordo de Cooperação Técnica: Ministério da Saúde e ABIA.** Fórum de Alimentação Saudável. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. BRASIL. **Anais...**Brasília: 2010

ADORNO, G. L. A. R. **Angiogênese em carcinomas de mama: análise de expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e suas correlações com outros fatores prognósticos.** [s.l.] 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

AFONSO, M. S. et al. Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 32, p. 91–100, 2016.

ALFIERI, A. et al. Effects of plant oil interesterified triacylglycerols on lipemia and human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2018.

ARCAND, J. A. et al. Trans fatty acids in the canadian food supply: an updated analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 4, p. 1116–1123, 2014.

AWAD, A. B. Trans fatty acids in tumor development and the host survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 67, n. 1, p. 189–192, 1981.

BAKKER, N. et al. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: An ecological study. **International Journal of Cancer**, v. 72, n. 4, p. 587–591, 1997.

BALLESTEROS-VÁSQUEZ, M. N. et al. Ácidos grasos trans: Un análisis del efecto de su consumo en la salud humana, regulación del contenido en alimentos y alternativas para disminuirlos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 1, p. 54–64, 2012.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BASSETT, J. K. et al. Plasma phospholipids fatty acids, dietary fatty acids, and breast cancer risk. **Cancer Causes and Control**, v. 27, n. 6, p. 759–773, 2016.

BAYLIN, A. et al. High 18:2 trans-fatty acids in adipose tissue are associated with increased risk of nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rican adults. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1186–1191, 2003.

BENDSEN, N. T. et al. Effect of industrially produced *trans* fat on markers of systemic inflammation: evidence from a randomized trial in women. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 10, p. 1821–1828, 2011.

BERGER, P. et al. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 433–441, fev. 1999.

BERRY, S. E. E. et al. Effect of interesterification of palmitic acid-rich triacylglycerol on postprandial lipid and factor VII response. **Lipids**, v. 42, n. 4, p. 315–323, 2007.

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: An overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2009a.

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2009b.

BERRY, S. E. E.; MILLER, G. J.; SANDERS, T. A. B. The solid fat content of stearic acid-rich fats determines their postprandial effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 6, p. 1486–1494, 2007.

BERRY, S. E. E.; SANDERS, T. A. B. Influence of triacylglycerol structure of stearic acid-rich fats on postprandial lipaemia. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 02, p. 205–212, 7 maio 2005.

BISPO, K. P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. **Journal of Physiological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 131–138, 2015.

BLOCK, J. M.; BARRERA-ARELLANO, D. **Temas selectos en aceites e grasas**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2009.

BRASIL. **Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRENNAN, S. F. et al. Dietary fat and breast cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 10, p. 1999–2008, 3 jul. 2017.

CAO, Y.; HOU, L.; WANG, W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 8, p. 1894–1904, 15 abr. 2016.

CASSAGNO, N. et al. Low amounts of trans 18 : 1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defence to oxidative stress in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 03, p. 346, 8 set. 2005.

CAVENDISH, T. A. et al. Composição de ácidos graxos de margarinas à base de gordura hidrogenada ou interesterificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 138–142, 12 mar. 2010.

CHAJÈS, V. et al. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC study. **American Journal of Epidemiology**, v. 167, n. 11, p. 1312–1320, 2008.

CHAVARRO, J. E. et al. Dietary fatty acid intakes and the risk of

ovulatory infertility. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 1, p. 231–237, 1 jan. 2007.

CHAVARRO, J. E. et al. Trans–fatty acid levels in sperm are associated with sperm concentration among men from an infertility clinic. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, p. 1794–1797, abr. 2011.

CHEGG STUDY. **Draw the products of the saponification of the following triacylglycerol (triglyceride)**. Disponível em: <<http://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/draw-products-saponification-following-triacylglycerol-triglyceride-q6697437>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

CHEN, C.-L. et al. A mechanism by which dietary trans fats cause atherosclerosis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 7, p. 649–655, jul. 2011.

CHRISTOPHE, A. B. et al. Substituting Enzymatically Interesterified Butter for Native Butter Has No Effect on Lipemia or Lipoproteinemia in Man. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 44, n. 2, p. 61–67, 2000.

CODEX STANDARDS FOR FATS AND OILS FROM VEGETABLE SOURCES. **CODEX-STAN 210 - 1999**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm#TopOfPage>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

COSTALES, R.; FERNÁNDEZ, A. Hidrogenación e Interesterificación. In: BLOCK, J.; BARRERA-ARELLANO, D. (Eds.). **Temas Selectos en Aceites y Grasas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANDAMUDI, A. et al. Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review. **Anticancer Research**, v. 38, n. 6, p. 3209–3222, 30 jun. 2018.

DESTAILLATS, F.; MOULIN, J.; BEZELGUES, J.-B. Letter to the editor: healthy alternatives to trans fats. **Nutrition & Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 10, 2007.

DHIBI, M. et al. The intake of high fat diet with different trans fatty acid

levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 65, 2011.

FARFÁN, M. et al. The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 571–577, 2013.

FASANO, E. et al. Long-chain n-3 PUFA against breast and prostate cancer: Which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2245–2262, 2017.

FECCHIO, D. et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125–132, 1990.

FILIPPOU, A. et al. Palmitic acid in the sn-2 position decreases glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in healthy adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 5, p. 549–554, 26 maio 2014a.

FILIPPOU, A. et al. Palmitic acid in the sn-2 position of dietary triacylglycerols does not affect insulin secretion or glucose homeostasis in healthy men and women. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 9, p. 1036–1041, 23 set. 2014b.

FOURNIER, N. et al. Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 2, p. 303–312, fev. 2012.

GANGULY, R.; PIERCE, G. N. The toxicity of dietary trans fats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 170–176, abr. 2015.

GHEBREYESUS, T. A.; FRIEDEN, T. R. REPLACE: a roadmap to make the world trans fat free by 2023. **The Lancet**, v. 391, n. 10134, p. 1978–1980, 2018.

GIOIELLI, L. A. **Interesterificação de óleos e gorduras**. Disponível em: <<http://www.oleosegorduras.org.br/site/assets/arquivo/b2846aa8714770a1f58d9e9e5b91e00a.pdf>>.

GOUK, S.-W. et al. Stearic acids at sn-1, 3 positions of TAG are more efficient at limiting fat deposition than palmitic and oleic acids in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 07, p. 1174–1180, 29 abr. 2014.

GOUK, S. W. et al. Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 11, p. 1987–1995, 12 dez. 2013.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G.; ESTEVES, W. Characteristics of Brazilian Shortenings. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 159–164, 2000.

GU, J.-W. et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 10, p. 910–917, 15 maio 2011.

GUÉRAUD, F. et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 192–200, jun. 2015.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich**. [s.l.] 1983. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

HALL, W. L. et al. An interesterified palm olein test meal decreases early-phase postprandial lipemia compared to palm olein: a randomized controlled trial. **Lipids**, v. 49, n. 9, p. 895–904, 8 set. 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, mar. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HAYES, K. C.; PRONCZUK, A. Replacing trans fat: The argument for palm oil with a cautionary note on interesterification. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, n. January 2014, p. 253S-284S, 2010.

HIRKO, K. A. et al. Erythrocyte membrane fatty acids and breast cancer

risk: a prospective analysis in the nurses' health study II. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 6, p. 1116–1129, 2018a.

HIRKO, K. A. et al. Erythrocyte membrane fatty acids and breast cancer risk: a prospective analysis in the nurses' health study II. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 6, p. 1116–1129, 2018b.

HOLMES, M. D. et al. Dietary factors and the survival of women with breast carcinoma. **Cancer**, v. 86, n. 5, p. 826–835, 1 set. 1999.

HOOKER, N.; DOWNS, S. Trans-border reformulation: Us and canadian experiences with trans fat. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 17, n. SpecialIssueA, p. 131–146, 2014.

HU, J. et al. Dietary transfatty acids and cancer risk. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 6, p. 530–538, nov. 2011.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. DE. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

INCA. **Resumo. Alimentos, nutrição, atividade física e prevenção do câncer: Uma perspectiva global**. Rio de Janeiro: INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007.

INCA. **Câncer de mama**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama)>. Acesso em: 28 jun. 2016.

INCA. **Câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

INNIS, S. M.; GREEN, T. J.; HALSEY, T. K. Variability in the trans fatty acid content of foods within a food category: Implications for estimation of dietary trans fatty acid intakes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 255–260, jun. 1999.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOŁB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, n. 2–3, p. 103–122, dez. 2003.

KARBOWSKA, J.; KOCHAN, Z. Trans-fatty acids-effects on coronary

heart disease. **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 31, n. 181, p. 56–59, 2011.

KESH, S. B.; SARKAR, D.; MANNA, K. High-fat diet-induced oxidative stress and its impact on metabolic syndrome: A review. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 9, n. 1, p. 47–52, 2016.

KHANKARI, N. K. et al. Polyunsaturated fatty acid interactions and breast cancer incidence: a population-based case-control study on Long Island, New York. **Annals of Epidemiology**, v. 25, n. 12, p. 929–935, dez. 2015.

KIM, E. H. J. et al. Dietary fat and risk of postmenopausal breast cancer in a 20-year follow-up. **American Journal of Epidemiology**, v. 164, n. 10, p. 990–997, 15 nov. 2006.

KIM, E. J. et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. R78, 11 ago. 2011.

KOHLMEIER, L. et al. Adipose tissue trans fatty acids and breast cancer in the European community multicenter study on antioxidants, myocardial infarction, and breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 6, p. 705–710, 1997.

L'ABBÉ, M. R. et al. Approaches to removing trans fats from the food supply in industrialized and developing countries. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. S2, p. S50–S67, 6 maio 2009.

LAAKE, I. et al. Intake of trans fatty acids from partially hydrogenated vegetable and fish oils and ruminant fat in relation to cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 6, p. 1389–1403, 15 mar. 2013.

LAMAS, B. et al. Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 1, p. 58–71, jan. 2015.

LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. **Early Human Development**, v. 65, n. SUPPL. 2, p. S31–S41, nov. 2001.



- LIU, B. et al. Association between plasma trans-fatty acid concentrations and diabetes in a nationally representative sample of US adults. **Journal of Diabetes**, v. 10, n. 8, p. 653–664, 2018.
- LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.
- LOUZADA, M. L. DA C. et al. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 49, p. 1–11, 2015.
- MAGRI, T. P. R. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 904–910, out. 2015.
- MAKAREM, N. et al. Dietary Fat in Breast Cancer Survival. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 319–348, 17 jul. 2013.
- MALIK, V. S.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 13–27, 20 jan. 2013.
- MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 10, p. 329–335, out. 1995.
- MARTIN, C. A.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. DE. Ácidos graxos trans: implicações nutricionais e fontes na dieta. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 361–368, set. 2004.
- MATSUZAWA-NAGATA, N. et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57, n. 8, p. 1071–1077, 2008.
- MAUGER, J.-F. et al. Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 370–375, 1 set. 2003.
- MEIJER, G.; WESTSTRATE, J. Interesterification of fats in margarine: effect on blood lipids, blood enzymes and hemostasis parameters. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 527–534, 18 ago. 1997.

MENAA, F. et al. Technological approaches to minimize industrial trans fatty acids in foods. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 3, p. R377–R386, mar. 2013a.

MENAA, F. et al. Trans-fatty acids, dangerous bonds for health? A background review paper of their use, consumption, health implications and regulation in France. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 1289–1302, 27 jun. 2013b.

MENSINK, R. P. et al. The increasing use of interesterified lipids in the food supply and their effects on health parameters. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 7, n. 4, p. 719–729, 15 jul. 2016.

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 7, p. 439–445, 16 ago. 1990.

MICHAS, G.; MICHA, R.; ZAMPELAS, A. Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 2, p. 320–328, jun. 2014.

MILLS, C. E.; HALL, W. L.; BERRY, S. E. E. What are interesterified fats and should we be worried about them in our diet? **Nutrition Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 153–158, 2017.

MISAN, V. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat during the perinatal period produces changes in the brain fatty acids profile and increases leukocyte–endothelial interactions in the cerebral microcirculation from the male off. **Brain Research**, v. 1616, p. 123–133, ago. 2015.

MONDINI, L.; MONTEIRO, C. A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 433–439, dez. 1994.

MONTEIRO, C. et al. NOVA. The star shines bright. The Food System. Food classification. Public health. **World Nutrition**, v. 7, n. 1–3, p. 28–38, 2016.

MOODIE, R. et al. Non-Communicable Diseases 4 Profi ts and

pandemics : prevention of harmful effects of tobacco , alcohol , and ultra-processed food and drink. **The Lancet**, v. 6736, n. 12, p. 1–10, 2013.

MOUBARAC, J. et al. Consumption of ultra-processed foods predicts diet quality in Canada. **Appetite**, v. 108, p. 512–520, 2017.

MOZAFFARIAN, D. et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 4, p. 606–612, 1 abr. 2004.

MOZAFFARIAN, D.; ARO, A.; WILLETT, W. C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. S2, p. S5–S21, 6 maio 2009.

MOZAFFARIAN, D.; CLARKE, R. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. S2, p. S22–S33, 6 maio 2009.

MU, H.; HOY, C.-E. The digestion of dietary triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 105–133, mar. 2004.

NAGARAJU, A.; LOKESH, B. R. Interesterified coconut oil blends with groundnut oil or olive oil exhibit greater hypocholesterolemic effects compared with their respective physical blends in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 9, p. 580–586, set. 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NESTEL, P. J. et al. Effect on plasma lipids of interesterifying a mix of edible oils. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 950–955, 1 nov. 1995.

NOAKES, M.; CLIFTON, P. M. Oil blends containing partially hydrogenated or interesterified fats: differential effects on plasma lipids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 242–247, 1 ago. 1998.

O'BRIEN, R. D.; FARR, W. E.; WAN, P. J. **Introduction to fats and oils technology**. 2. ed. Champaign: AOCS Press, 2000.

OLIVEIRA, L. B. O. DE et al. Angiogênese e tumorigênese: Onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vittalle**, v. 22, n. 2, p. 11–22, 2010.

OTITE, F. O. et al. Trends in trans fatty acids reformulations of US supermarket and brand-name foods from 2007 through 2011. **Preventing Chronic Disease**, v. 10, n. 1, p. 120198, 23 maio 2013.

PONNAMPALAM, E. N. et al. Differential effects of natural palm oil, chemically- and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 53, 18 dez. 2011.

PULIGUNDLA, P. et al. Emerging trends in modification of dietary oils and fats, and health implications - A review. **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 7, p. 871–877, 2012.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 511–525, 12 jan. 2004.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, jul. 2006.

REENA, M. B.; GOWDA, L. R.; LOKESH, B. R. Enhanced hypocholesterolemic effects of interesterified oils are mediated by upregulating LDL receptor and cholesterol 7- $\alpha$ -hydroxylase gene expression in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 24–30, 1 jan. 2011.

REENA, M. B.; KRISHNAKANTHA, T. P.; LOKESH, B. R. Lowering of platelet aggregation and serum eicosanoid levels in rats fed with a diet containing coconut oil blends with rice bran oil or sesame oil. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, n. 3, p. 151–160, set. 2010.

REENA, M. B.; LOKESH, B. R. Hypolipidemic effect of oils with balanced amounts of fatty acids obtained by blending and interesterification of coconut oil with rice bran oil or sesame oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10461–10469, dez.

2007.

REENA, M. B.; LOKESH, B. R. Effect of feeding blended and interesterified vegetable oils on antioxidant enzymes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 136–143, jan. 2011.

REENA, M. B.; LOKESH, B. R. Effect of blending and lipase catalyzed interesterification reaction on the cholesterol lowering properties of palm oil with rice bran oil in rats. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 1, p. 203–209, jan. 2012.

REKSON, A. O. **Avaliação da composição de ácidos graxos de margarinas e cremes vegetais zero trans comercializados no estado do Rio de Janeiro**. [s.l.] 2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1295–1300, out. 2007.

RISÉRUS, U. Trans fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 161–165, 2006.

ROBINSON, D. M. et al. Influence of Interesterification of a Stearic Acid-Rich Spreadable Fat on Acute Metabolic Risk Factors. **Lipids**, v. 44, n. 1, p. 17–26, 4 jan. 2009.

RODRIGUES, E.; SCHIESSEL, D. L. Perfil lipídico e glicêmico de ratos suplementados com diferentes quantidades de gordura interesterificada. **Revista Salus-Guarapuava**, v. 3, n. 2, p. 33–44, 2009.

SAKONO, M. et al. Absorption and lymphatic transport of interesterified or mixed fats rich in saturated fatty acids and their effect on tissue lipids in rats. **Nutrition Research**, v. 17, n. 7, p. 1131–1141, jul. 1997.

SÁNCHEZ-VILLEGAS, A. et al. Dietary Fat Intake and the Risk of Depression: The SUN Project. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16268, 26 jan. 2011.

SANDERS, T. A. B. et al. Palmitic acid in the sn-2 position of

triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 6, p. 1433–1441, 1 dez. 2011.

SANTOS, R. D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq Bras Cardiol.**, v. 100, n. 1 Supl.3, p. 1–40, 2013.

SARAVANAN, N.; HASEEB, A.; EHTESHAM, N. Z. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. **European Journal of Endocrinology**, v. 153, n. 1, p. 159–165, jul. 2005.

SCHEEDER, M. R. L. About the trans-(hi)story: How did trans fatty acids enter the human food chain? **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 18, n. 2, p. 133–135, 2007.

SCHULZ, M. et al. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 05, p. 942, 1 nov. 2008.

SEILER, A. et al. Obesity, Dietary Factors, Nutrition, and Breast Cancer Risk. **Current Breast Cancer Reports**, p. 1–14, 2018.

SHAHIDI, F.; SENANAYAKE, S. P. J. N. Modificación de Lípidos. In: BLOCK, J.; BARRERA-ARELLANO, D. (Eds.). . **Temas Selectos en Aceites y Grasas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2009.

SHARMA, M.; LOKESH, B. R. Modification of serum and tissue lipids in rats fed with blended and interesterified oils containing groundnut oil with linseed oil. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 220–230, abr. 2013.

SIERI, S. et al. Dietary fat intake and development of specific breast cancer subtypes. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 5, maio 2014.

SIMONSEN, N. et al. Adipose tissue Omega-3 and Omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, n. 4, p. 342–352, 15 fev. 1998.

- SMITH, B. K. et al. Trans-fatty acids and cancer: a mini-review. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 09, p. 1254, 7 nov. 2009.
- SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13–20, jan. 2016.
- SUNDRAM, K.; KARUPAIAH, T.; HAYES, K. C. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutrition and Metabolism**, v. 4, n. 3, p. 1–12, 2007.
- THILAKARATHNA, S. H. et al. Investigations of in vitro bioaccessibility from interesterified stearic and oleic acid-rich blends. **Food & Function**, v. 7, n. 4, p. 1932–1940, 2016.
- THOMPSON, A. K.; MINIHAINE, A.-M.; WILLIAMS, C. M. Trans fatty acids and weight gain. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 3, p. 315–324, 20 mar. 2011.
- THOMSON, C. A. Diet and breast cancer: Understanding risks and benefits. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 5, p. 636–650, 4 out. 2012.
- TURNER, L. B. A meta-analysis of fat intake, reproduction, and breast cancer risk: An evolutionary perspective. **American Journal of Human Biology**, v. 23, n. 5, p. 601–608, set. 2011.
- VALENZUELA, A.; MORGADO, N. Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. **Biological Research**, v. 32, n. 4, p. 273–287, 1999.
- VELASCO, P. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for trans fat in maternal diet can predispose obesity and inflammation in adult male offspring. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1, p. 29:754, 2015.
- VELASCO, P. C. et al. Maternal intake of trans-unsaturated or interesterified fatty acids during pregnancy and lactation modifies mitochondrial bioenergetics in the liver of adult offspring in mice. **British Journal of Nutrition**, n. 2017, p. 1–12, 2017.
- VIJAYAKUMAR, R. S.; SURYA, D.; NALINI, N. Antioxidant efficacy

of black pepper ( *Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. **Redox Report**, v. 9, n. 2, p. 105–110, 19 abr. 2004.

WANG, Y.; PROCTOR, S. D. Current issues surrounding the definition of trans-fatty acids: implications for health, industry and food labels. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 08, p. 1369–1383, 18 out. 2013.

WASSELL, P.; YOUNG, N. W. G. Food applications of trans fatty acid substitutes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 5, p. 503–517, maio 2007.

WHO. **Global strategy on diet, physical activity and health.** (WORLD HEALTH ORGANIZATION, Ed.)Fifty-seventh World Health Assembly. Anais...Geneva: 2004Disponível em: <[https://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy\\_english\\_web.pdf](https://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_english_web.pdf)>

WHO. **2013-2019 Plan of action for the prevention and control of noncommunicable diseases.** (W. H. ORGANIZATION, Ed.)Sixty-sixth World Health Assembly. Anais...Geneva: 2013

WHO. **Replace trans fat by 2023: An action package to eliminate industrially-produced trans fat from the global food supply.** Disponível em: <<https://www.who.int/nutrition/topics/replace-transfat>>. Acesso em: 20 set. 2004a.

WHO. **Replace trans fat: an action package to eliminate industrially-produce trans-fatty acids**World Health Organization, , 2018b. Disponível em: <<https://www.who.int/docs/default-source/documents/replace-transfats/replace-action-package.pdf>>

WHO. **Breast cancer.** Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

WILLETT, W. C. Dietary fats and coronary heart disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 1, p. 13–24, jul. 2012.

WIRFÄLT, E. et al. Food sources of fat and sex hormone receptor status of invasive breast tumors in women of the malmö diet and cancer cohort. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 5, p. 722–733, jul. 2011.



YIDA, Z. et al. High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 96, 24 dez. 2015.

YLI-JOKIPII, K. et al. Effects of palm oil and transesterified palm oil on chylomicron and VLDL triacylglycerol structures and postprandial lipid response. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 10, p. 1618–1625, 2001.

YLI-JOKIPII, K. M. et al. Chylomicron and VLDL TAG structures and postprandial lipid response induced by lard and modified lard. **Lipids**, v. 38, n. 7, p. 693–703, jul. 2003.

ZAMPELAS, A. et al. The effect of triacylglycerol fatty acid positional distribution on postprandial plasma metabolite and hormone responses in normal adult men. **British Journal of Nutrition**, v. 71, n. 03, p. 401, 17 mar. 1994.

ZHONG, H.; ALLEN, K.; MARTINI, S. Effect of lipid physical characteristics on the quality of baked products. **Food Research International**, v. 55, p. 239–246, jan. 2014.

ZOCK, P. L. et al. Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: Effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 48–55, 1 jan. 1995.

ZOCK, P. L.; MENSINK, R. P. Dietary trans-fatty acids and serum lipoproteins in humans. **Current Opinion in Lipidology**, v. 7, n. 1, p. 34–37, fev. 1996.



## CAPÍTULO 2

### **DIFERENTES GORDURAS MODIFICADAS NA DIETA E SEUS EFEITOS NO PESO CORPORAL, NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE EM CAMUNDONGOS**

#### RESUMO:

A gordura interesterificada tem sido usada em muitos produtos alimentícios, como substituta da gordura parcialmente hidrogenada, fonte de ácidos graxos trans. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de gorduras interesterificada, não interesterificada e parcialmente hidrogenada no peso corporal, nos parâmetros bioquímicos e nos biomarcadores hepático do estresse oxidativo e defesa antioxidante, em camundongos. Camundongos Balb-c foram divididos em quatro grupos (n=6) alimentados por 75 dias com diferentes dietas: um grupo recebeu dieta normolipídica (CG) e três grupos receberam dieta hiperlipídica (40% kcal), contendo gordura interesterificada comercialmente disponível (GGI), rica em ácido palmítico (39%); um *blend* não interesterificado (GGNI), com o mesmo perfil de ácidos graxos da gordura interesterificada, mas com 2 vezes menos ácidos graxos saturados na posição *sn*-2 dos triglicerídeos; ou gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH) também disponível comercialmente, fonte de ácido graxo trans (20%) e de ácido linolênico (6%). As dietas hiperlipídicas aumentaram o peso corporal dos animais. Camundongos dos grupos GGI e GGNI apresentaram resultados semelhantes em todos os parâmetros avaliados. Os parâmetros bioquímicos séricos e os marcadores de estresse oxidativo hepático e defesa antioxidante do grupo GGPH foram semelhantes aos do GC, exceto pelo aumento do colesterol total ( $p<0,05$ ). Em comparação com o GGPH, camundongos do grupo GGI apresentaram aumentos significativos nas concentrações séricas de colesterol total ( $p<0,01$ ), não-HDL-C ( $p<0,05$ ) e glicose ( $p<0,05$ ); e aumentos significativos na concentração hepática de glutathione reduzida - GSH (2,7 vezes,  $p<0,05$ ) e na atividade da glutathione redutase - GR (2,4 vezes,  $p<0,001$ ). Em conclusão, a modificação da estrutura dos triglicerídeos, causada pela interesterificação, não alterou os resultados dos parâmetros avaliados; e a gordura vegetal parcialmente hidrogenada apresentou resultados mais favoráveis que a gordura interesterificada rica em ácido palmítico. Mais estudos *in vivo* com gordura interesterificada

são necessários, visto que há um intenso movimento mundial para eliminação da gordura *trans*.

**Palavras-chave:** Gordura interesterificada. Gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Gordura *trans*. Ácido palmítico. Estresse oxidativo. Defesa antioxidante. Colesterol.

## ABSTRACT

Interesterified fat has been used in many food products and was introduced as a substitute for partially hydrogenated fat, the source of trans fatty acids. The objective of this study was to investigate the effects of different of interesterified, non - interesterified and partially hydrogenated fat supplementation on body weight, biochemical parameters and hepatic biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense in mice. Balb-c mice were divided into four groups (n = 6) fed 75 days with different diets: one group received a normolipid diet (CG) and three groups received a hyperlipidic diet (40% kcal) containing commercially available interesterified fat, rich in palmitic acid (39%) (IFG); a non-interesterified blend (NIFG), with the same fatty acid profile as interesterified fat, but with 2 times less saturated fatty acids at the sn-2 position of the triglycerides; or partially hydrogenated vegetable fat (PHFG) also commercially available, source of trans fatty acid (20%) and linolenic acid (6%). Hyperlipid diets increased the animals' body weight, but with no statistical difference. Mice of the IFG and NIFG presented similar results in all evaluated parameters. The serum biochemical analytes and hepatic oxidative stress biomarkers of the PHFG were similar to CG, except for increased total cholesterol (TC) (p <0.05). In comparison to PHFG, mice of IFG presented significant increases of serum TC (p<0.01), non-HDL-C (p<0.05), and glucose (p<0.05) and significant increases in hepatic glutathione reduced GSH (2.7 times, p <0.05) and glutathione reductase - GR activity (2.4 times, p <0.001). In conclusion, the modification of the structure of triacylglycerols, caused by interesterification, did not alter the results of the evaluated parameters; and the partially hydrogenated vegetable fat presented more favorable results than interesterified fat rich in palmitic acid. Further in vivo studies with interesterified fat are needed, as there is an intense worldwide movement to eliminate trans fat.

**Keywords:** Interesterified fat. Partially hydrogenated vegetable fat. Trans fat. Palmitic acid. Oxidative stress. Antioxidant defense. Cholesterol.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos alimentos ultraprocessados contêm gorduras modificadas em sua formulação, como gorduras parcialmente hidrogenadas e interesterificadas (MONTEIRO et al., 2016). Os alimentos ultraprocessados incluem por exemplo: pizzas e massas congeladas, *nuggets*, salgadinhos embalados, biscoitos, bombons, guloseimas, produtos de confeitaria e barras de cereais (MOODIE et al., 2013). Pesquisas têm alertado sobre o rápido aumento na produção e consumo desses produtos em todo o mundo e sua potencial associação com a atual pandemia de obesidade e outras doenças não transmissíveis relacionadas à dieta (MONTEIRO et al., 2016; MOODIE et al., 2013; MOUBARAC et al., 2017).

As gorduras modificadas são utilizadas com o objetivo de obter características sensoriais adequadas no produto final e melhorar a estabilidade oxidativa dos produtos alimentícios. As tecnologias de modificação de óleos e gorduras visam modificar a plasticidade, melhorando as características de cristalização e fusão das gorduras resultantes, tornando-as adequadas para a aplicação em alimentos, principalmente os industrializados (MENSINK et al., 2016a).

O processo de hidrogenação parcial de óleos altera a configuração de ácidos graxos insaturados de *cis* para *trans*. O consumo de ácidos graxos *trans* (AGT) tem sido associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (MENSINK; KATAN, 1990; ZOCK; MENSINK, 1996), diabetes mellitus tipo 2 (RISÉRUS, 2006; LIU et al., 2018) e câncer (CHAJÈS et al., 2008; HIRKO et al., 2018). Por esta razão, a ingestão de AGT produzidos por hidrogenação parcial de óleos tem sido desencorajada nos últimos anos e vários países adotaram ações para reduzi-los ou eliminá-los em alimentos processados. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou o programa "*Replace*", que tem por objetivo tornar o mundo livre de gordura *trans* até 2023 (GHEBREYESUS; FRIEDEN, 2018; WHO, 2018).

As gorduras interesterificadas têm sido amplamente utilizadas pela indústria de alimentos para substituir a gordura *trans* como uma alternativa economicamente viável, com propriedades funcionais desejáveis e com a vantagem de ser uma gordura zero-*trans*. Misturas de diferentes óleos e/ou gorduras e catalisadores químicos ou enzimáticos são utilizados na fabricação de gorduras interesterificadas. A interesterificação altera as propriedades físico-químicas da gordura. A composição de triacilglicerol (TAG) é modificada pela reorganização dos ácidos graxos na molécula do glicerol. No entanto, a composição inicial

de ácidos graxos é mantida (MENSINK et al., 2016; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

As gorduras interesterificadas tendem a ser ricas em ácidos graxos saturados (AGS) de cadeia longa, uma vez que apresentam em suas formulações gordura(s) com alto ponto de fusão, frequentemente fonte de ácido palmítico (16: 0) ou ácido esteárico (18: 0) (BERRY, 2009). Além disso, tendem a conter uma maior quantidade de AGS na posição *sn-2* do glicerol, ao contrário dos óleos vegetais não modificados. Acredita-se que os ácidos graxos (AG) presentes na posição *sn-2* possam ser melhor absorvidos pelo organismo humano, uma vez que as lipases pancreáticas hidrolisam especificamente as ligações nas posições *sn-1* e *sn-3*. Os AG livres oriundos das posições *sn-1* e *sn-3* podem formar sabões no ambiente intestinal e se perder nas fezes, ao contrário dos 2-monoacilgliceróis que são rapidamente absorvidos. Portanto, os efeitos dos AGs ocupantes da posição *sn-2* podem ser potencializados no organismo (ALFIERI et al., 2018; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Estudos anteriores abordaram o papel da gordura interesterificada no metabolismo, no entanto, as implicações nutricionais e de saúde do consumo de gordura interesterificada a longo prazo precisam ser melhor compreendidas (MENSINK et al., 2016a; MILLS; HALL; BERRY, 2017). Além disso, existem resultados controversos e de difícil interpretação, uma vez que as gorduras interesterificadas podem ser formuladas com diferentes combinações de óleos e gorduras. Do mesmo modo, em alguns estudos (NOAKES; CLIFTON, 1998; SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007) a comparação ocorreu entre uma gordura interesterificada e outra com composição diferente de AG, como por exemplo gordura fonte de gordura *trans*. Em outros estudos (REENA; LOKESH, 2012; SHARMA; LOKESH, 2013), a comparação foi realizada com a mesma gordura sem passar pelo processo de interesterificação, ou seja, com a mesma composição de AG. Porém, muitas vezes não disponíveis comercialmente

O alto consumo de alimentos processados, fontes de gordura modificadas (gordura parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada) e a limitada disponibilidade de estudos que investigaram os efeitos da ingestão, de longo prazo (mais de três semanas), de gorduras interesterificadas comercialmente disponíveis, justificam a presente pesquisa.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de i) gordura interesterificada rica em AGS comercialmente disponível, especialmente localizados na posição *sn-2* do TAG, ii) uma mistura com a mesma composição AG como a gordura

interesterificada, mas com menor quantidade de AGS na posição *sn*-2 e, iii) uma gordura vegetal parcialmente hidrogenada, fonte de AGT - nos perfis nutricional e bioquímico e nos biomarcadores do estresse oxidativo hepático de camundongos Balb-c.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. PRODUTOS QUÍMICOS E GORDURAS

Solução salina tamponada com fosfato ou *phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco; Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Albumina sérica bovina (BSA) e ácido tiobarbitúrico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). Os demais reagentes foram usados com grau de pureza atendendo as normas da American Chemical Society (ACS). Foram utilizados os kits colorimétricos da LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

A gordura interesterificada (GI) foi produzida por interesterificação química, específica para aplicação em produtos de panificação e que encontrava-se comercialmente disponível durante a realização desta pesquisa. A GI e a gordura não interesterificada (GNI) foram doadas pela Indústria Triângulo Alimentos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil) e segundo informações do fabricante, são compostas por óleo de palma, estearina de palma e óleo de soja totalmente hidrogenado. Destaca-se que a participação da Indústria Triângulo Alimentos Ltda. na presente pesquisa limitou-se à doação das gorduras. A gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH) foi adquirida no mercado local e foi formulada com uma mistura de óleo de soja e de palma.

### 2.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS GORDURAS

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram preparados seguindo o procedimento descrito por O'Fallon et al. (2007). Os perfis de AG das amostras foram determinados por cromatografia em fase gasosa, usando cromatógrafo GC-2014, Shimadzu® (Kyoto, Japão), equipado com coluna capilar (RTX® 2330, 105 m de comprimento, 0,25 milímetros de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura de filme; Restek®, Bellefont, USA). Condições operacionais: temperatura do injetor 250 °C, volume injetado de 1,0 µL, divisão 1:40, detector de ionização de chama (FID) a

260 °C, temperatura do forno: inicialmente a 130 °C / 5 min; seguido 130 a 180 °C (5 °C/min), 180 °C / 10 minutos, 180 a 240 °C (3 °C/min) e permanecendo 240 °C/13 min; gás auxiliar (*make up* gás): nitrogênio (30 mL/min); gás de arraste: hidrogênio (1 mL/min); volume injetado de 1 µL. A composição qualitativa foi determinada pela comparação dos tempos de pico de retenção com os respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi determinada pela normalização da área e expressa em porcentagem de massa. Os valores foram expressos em g de ácidos graxos / 100g de gordura.

### 2.3 DISTRIBUIÇÃO POSICIONAL DOS ÁCIDOS GRAXOS NOS TRIGLICERÍDEOS DAS GORDURAS

Para verificar a distribuição regioespecífica dos ácidos graxos nas posições *sn-2* e *sn-1,3* dos TAG foi utilizado o método de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução do <sup>13</sup>C das carbonilas das cadeias acil. Foi analisada solução de 250 mg de gordura dissolvida em 0,5 mL de clorofórmio deuterado em Espectrômetro de RMN Bruker Advance DPX 300 MHz (Atibaia, SP, Brasil). A determinação de <sup>13</sup>C foi realizada com um probe multinuclear de 5 mm, operando a 30 °C, em frequência constante de 75,8 MHz, segundo metodologia descrita por Vlahov (1998). As análises foram realizadas no Laboratório de RMN da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

### 2.4 COMPOSIÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DAS GORDURAS INTERESTERIFICADA E NÃO INTERESTERIFICADA

Os TAG das amostras foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de fase reversa com base no número de carbono equivalente (NCE), segundo o método descrito por Segura et al. (2011). Foi utilizado um HPLC Shimadzu Prominence 20A (Shimadzu® Corporation, Kyoto, Japão), acoplado ao detector de dispersão de luz por evaporação (ELSD-LTII Shimadzu®), com duas colunas em série (Supelcosil™ C18; 25 cm x 4,6 mm × 5 µm) operando a 20 °C. Cada amostra (5 mg) foi primeiramente dissolvida em acetona (1 mL) e depois injetada (1 µL) utilizando acetona / acetonitrila (1: 1; v / v) como fase



móvel que apresentou fluxo constante (1mL / min). As amostras receberam aumento do gradiente de clorofórmio (20%), durante 60min., permanecendo nessas condições por 20 minutos, depois retornou a composição inicial e se manteve por 85 minutos. Os picos foram identificados usando padrões TAG puros e considerando a ordem de eluição de acordo com o NCE correspondente. Os resultados forma expressos em valores percentuais.

## 2.5. ESTUDO *IN VIVO*

Todas as etapas do estudo *in vivo* foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

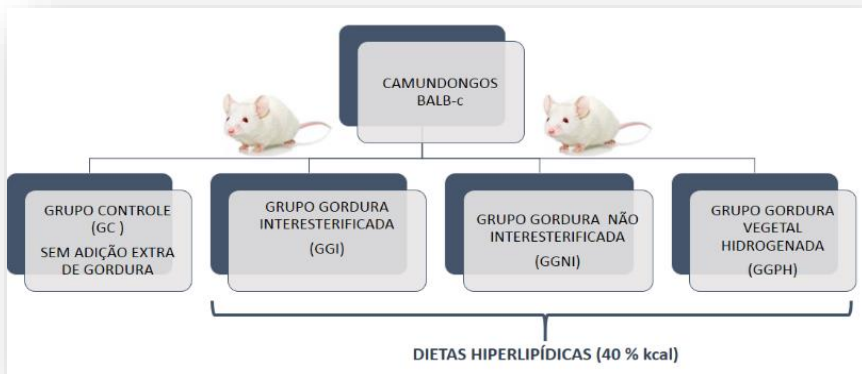
Camundongos isogênicos Balb-c fêmeas (60 dias;  $20,0 \pm 1,0$  g de peso corporal) foram mantidas em ambiente sob condições controladas (fotoperíodo de 12 h; temperatura  $22,0 \pm 2,0$  °C) mantendo a umidade do ar ( $53,0 \pm 2,0\%$ ). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (máximo de seis animais / gaiola) recebendo água e ração comercial ou formulada peletizada *ad libidum*. A manutenção e os tratamentos dos animais seguiram o protocolo aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA / UFSC PPOO784) e de acordo com as Diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH).

### 2.5.1 Delineamento experimental e dietas

Um total de 24 animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n= 6): controle (GC); gordura interesterificada (GGI); gordura não-interesterificada (GGNI) e gordura parcialmente hidrogenada (GGPH), conforme apresentado na Figura 2.1.

Cada grupo foi tratado com a ração específica por 75 dias. O GC recebeu ração comercial Bio Tec Camundongos e Ratos, fabricada pela empresa Bio Base® (Águas Frias, Santa Catarina, Brasil), composta por milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, óleo de soja degomado, mix de vitaminas, mix de sais minerais, aditivo adsorvente, aditivo antifúngico e aditivo antioxidante. O valor nutricional da ração está apresentado no Quadro 2.1.

Figura 2.1 - Grupos experimentais alimentados com diferentes dietas. Grupo Controle (GC) recebeu ração comercial normolipídica; Grupos



hiperlipídicos receberam ração comercial adicionada de diferentes gorduras: gordura interesterificada (GGI); gordura com a mesma formulação da gordura interesterificada, sem passar pelo processo de interesterificação (GGNI); e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH).

Quadro 2.1 - Valor nutricional da ração Linha Bio Tec Ratos e Camundongos (Bio Base®, Águas Frias, SC), segundo informações do fabricante.

<b>Nutrientes</b>	<b>Quantidades</b>
Proteína Bruta (Mín.)	220 g/kg
Extrato etéreo (Mín.)	40 g/kg
Carboidratos (por dedução)	592 g/kg
Matéria fibrosa (Máx.)	80 g/kg
Matéria mineral (Max.)	100 g/kg
Energia (Kcal/ Kg)	3.608 Kcal/Kg
Umidade (Max.)	120,0 g/Kg
Cálcio (Mín.)	10,0 mg/Kg
Cálcio (Máx.)	14,0 mg/Kg
Fósforo (Mín.)	8.000,0 mg/Kg
Sódio (Mín.)	2.000,0 mg/Kg
Lisina (Mín.)	12,00 g/kg
Metionina (Mín.)	4.600,0 mg/Kg
Vitamina A (Mín.)	25.000,0 UI/kg
Vitamina D3 (Mín.)	5.000,0 UI/kg
Vitamina E (Mín.)	60,0 UI/kg
Vitamina K3 (Mín.)	6,0 mg/Kg
Vitamina B1 (Mín.)	8,0 mg/kg
Vitamina B2 (Mín.)	30,0 mg/kg
Vitamina B6 (Mín.)	14,0 mg/kg
Vitamina B12 (Mín.)	40,0 mcg/kg
Biotina (Mín.)	0,1 mg/kg
Ácido Fólico (Mín.)	3,0 mg/kg
Ácido Nicotínico (Mín.)	80,0 mg/kg
Ácido Pantatênico (Mín.)	50,0 mg/kg
Colina (Mín.)	1.200,0 mg/kg
Iodo (Mín.)	2,0 mg/kg
Selênio (Mín.)	0,10 mg/kg
Ferro (Mín.)	50,0 mg/kg
Cobre (Mín.)	10,0 mg/kg
Zinco (Mín.)	70,0 mg/kg
Manganês (Mín.)	70,0 mg/kg
Cobalto (Mín.)	1,5 mg/kg

Legenda: Máx. – máximo; Mín. – mínimo

Cada grama de ração comercial continha 3,6 kcal/g (15,07 kJ); 10% de gordura (óleo de soja), 24% de proteína e 66% de carboidratos como fonte de energia. Os grupos GGI, GGNI e GGPH receberam a mesma ração (mesmo lote) do GC adicionada de uma das gorduras. As formulações hiperlipídicas (GGI, GGNI e GGPH) eram isocalóricas (5,4 kcal/g ou 22,61 kJ/g) e continham 40% de gordura, 15% de proteína e 45% de carboidratos como fonte de energia.

As rações hiperlipídicas foram preparadas de acordo com as seguintes etapas:

- a) A ração comercial foi triturada em processador de alimentos (Modelo PA-7, Skymesen<sup>®</sup>, Brusque / SC, Brasil) e peneirada.
- b) Para cada kg de ração triturada foram adicionados 200 g da gordura correspondente, conforme Gouk et al. (2014b). A gordura, que encontrava-se armazenada -18 °C, foi derretida (temperatura aproximada de 70 °C) e incorporada à ração triturada.
- c) A essa mistura foram adicionados 400 mL de água para formar uma massa capaz de refazer os *pellets* de igual espessura da ração comercial.
- d) A massa composta pela ração triturada, gordura e água foi homogeneizada e colocada em um moedor de carne (PSP-98T Inox, Skymesen<sup>®</sup>, Brusque/SC, Brasil), com adaptador de modelar/embutir linguça. A ração modelada foi cortada em pedaços de aproximadamente 4 cm, tal como a ração comercial.
- e) Os *pellets* acondicionados em formas de alumínio foram levados à estufa de secagem com circulação de ar (10027/04, Nova Etica<sup>®</sup>, São Paulo/SP, Brasil), no Laboratório de Óleos e Gorduras/CAL/UFSC. A secagem ocorreu em 48 h, sob temperatura de 40 °C.
- f) Os *pellets* secos, após resfriamento em temperatura ambiente, foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados e foram armazenados a -18 °C até a sua utilização.

Pequenas quantidades de cada tipo de ração eram periodicamente descongeladas, antes de serem ofertadas aos camundongos.

O consumo alimentar diário foi monitoramento três vezes por semana e resulta do cálculo da diferença entre o peso (g) de ração oferecida aos animais e o peso (g) da sobra, dividido pelo número de animais da gaiola e pelo número de dias correspondentes. O monitoramento do peso dos animais foi realizado semanalmente. A variação ponderal foi dada pela diferença entre o peso final (g) e o inicial (g) do experimento. A eficiência alimentar foi calculada pela divisão entre o ganho de peso (g) diário e o consumo energético (Kcal) diário.

## 2.5.2 Determinações bioquímicas

Após os 75 dias de tratamento, os animais foram submetidos a um período de 8 horas de jejum. Os camundongos foram então anestesiados (15 mg/Kg de xilasina e 90 mg/Kg de cetamina) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Imediatamente após, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Na sequência, os fígados foram cirurgicamente removidos, lavados em solução salina (0,9% NaCl) gelada e secos em papel filtro. A estratégia experimental está esquematizada na Figura 2.2.

### a) Concentrações séricas de lipídios e glicose

O soro centrifugado (3000 rpm/10 min) foi usado para quantificar os parâmetros lipídicos e lipoproteicos, glicose e transaminases.

As concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol total foram quantificadas via reação de Tindler (ALLAIN et al., 1974; BUCOLO; DAVID, 1973). O HDL-C foi determinado pelo método homogêneo direto (SUGIUCHI et al., 1995) com um kit colorimétrico comercial. As concentrações de não-HDL-C foram estimadas pela diferença entre o colesterol total (CT) e o HDL-C. A glicose sérica foi medida por método enzimático colorimétrico (TRINDER, 1969). Todas as medições foram realizadas usando leituras de placas de múltiplos poços com o TECAN Infinity M200<sup>®</sup>. Os valores foram expressos em mg / dL

### b) Atividade das enzimas transaminases séricas

A atividade das enzimas séricas transaminases, aspartato amina transferase (AST) e alanina amina transferase (ALT) foram medidas pelo método cinético a 340 nm (REJ; HORDER, 1983), utilizando o kit comercial LABTEST<sup>®</sup>. As medições foram realizadas usando leituras de placas de múltiplos poços com o TECAN Infinity M200<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos em unidade / L.

### c) Defesa antioxidante e biomarcadores de estresse oxidativo hepáticos

Uma fração de tecido hepático de aproximadamente 90 mg foi retirada e precipitada em ácido tricloroacético - TCA 12% (1:5, p/v), para a determinação do conteúdo de GSH. Outra fração de aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi homogeneizada em tampão (pH 7,4)

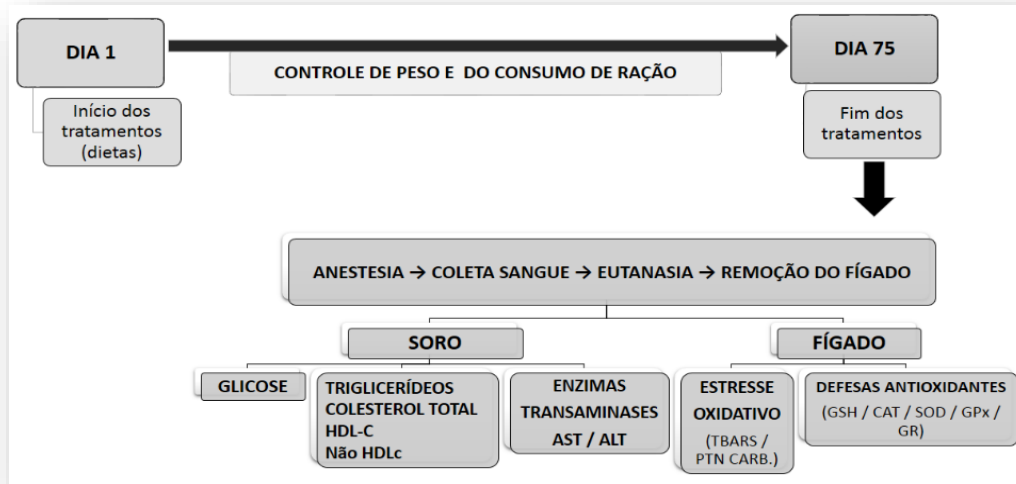
contendo fosfato de sódio (100 mM), NaCl (150 mM) e Triton X-100 a 0,1% (1:9 p/v), para os ensaios de TBARS, proteína carbonilada e das enzimas antioxidantes. Foi utilizado um homogeneizador de pistão Teflon (Tecnal<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil), até a completa mistura dos conteúdos. Os *ependorfs* com as amostras permaneceram submersas em gelo até o momento das análises.

Os homogenatos hepáticos foram centrifugados por 5 minutos, em 5.000 rpm e o sobrenadante utilizado. As análises de GSH e de TBARS foram realizadas no mesmo dia da coleta do material (fígado). As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), que utiliza curva padrão de albumina. Imediatamente após, as amostras foram acondicionadas a -18 °C, até a realização dos demais ensaios.

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi determinado pelo método descrito por Beutler e colaboradores (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963). A peroxidação lipídica foi estimada através da medida da formação de malondialdeído (MDA) usando o método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (BIRD; DRAPER, 1984). O dano oxidativo às proteínas foi quantificado avaliando-se as concentrações de proteína carbonilada (LEVINE et al., 1990). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida conforme descrito por Misra e Fridovich (1972). A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada cineticamente através do método descrito por Aebi (1984). A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinada de acordo com Carberg e Mannervik (1985). A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi realizada conforme descrito por Flohé e Günzler (1984). Um resumo das metodologias utilizadas nas análises dos biomarcadores de estresse oxidativo e da defesa antioxidante e está apresentado na Figura 2.3.

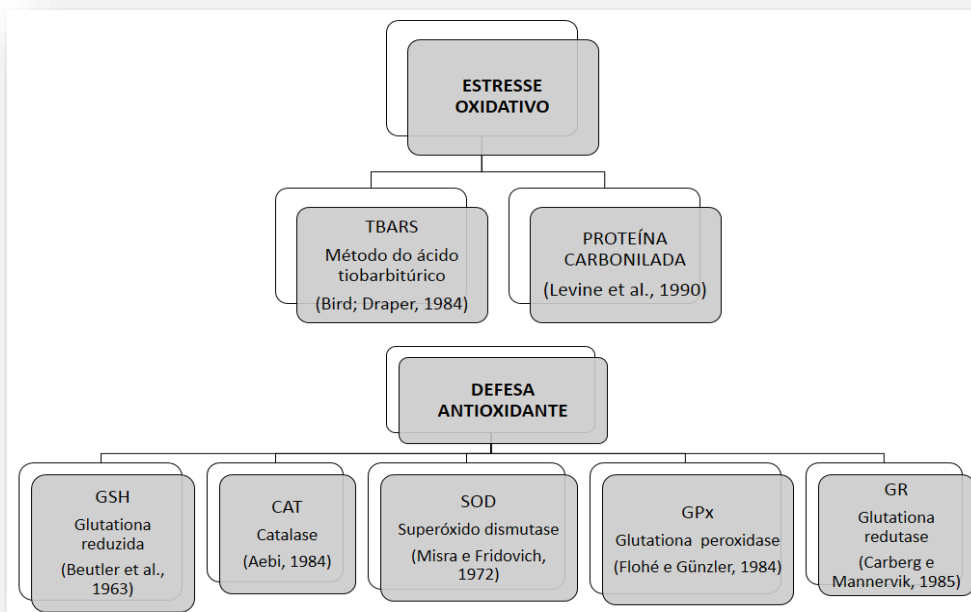
As determinações espectrofotométricas foram realizadas com leitor de microplacas (TECAN Infinity M200<sup>®</sup>), com uso de placas de 96 poços. A leitura da atividade da catalase foi realizada em multileitora Spectramax<sup>®</sup> (Paradigm; Molecular Devices, EUA), em placas de 96 poços UV-vis. Todas as leituras foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos e Biologia (LAMEB), no CCB da UFSC.

Figura 2.2 - Estratégia experimental



Legenda: ALT - Alanina transaminase; AST - Aspartato transaminase; CAT – Catalase; GPx – glutatona peroxidase; GR – glutatona redutase; GSH - glutatona reduzida; HDL-C – Lipoproteína de alta densidade; GR - Glutatona Redutase; Não HDLc - lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) + lipoproteína de densidade intermediária (IDL) + remanescentes de quilomícrons + lipoproteína (a) [Lp (a)] + lipoproteína de baixa densidade (LDL); PTN. CARB. – proteína carbonilada; SOD - superóxido dismutase; TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Figura 2.3 - Metodologias utilizadas nas análises dos biomarcadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante hepáticos



Legenda: TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.



## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvios padrão. Os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As comparações foram feitas usando o software GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, DISTRIBUIÇÃO POSICIONAL DOS ÁCIDOS GRAXOS NOS TRIGLICERÍDEOS E COMPOSIÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DAS GORDURAS

A composição em ácidos graxos das GI, GNI e GVPH estão apresentadas na Tabela 2.1 e a distribuição regioespecífica de ácidos graxos nas posições *sn-1,3* e *sn-2* dos triglicerídeos estão apresentadas na Tabela 2.2. Como esperado, a GI e a GNI apresentaram o mesmo perfil de ácidos graxos. Ambas são gorduras ricas em AGS (especialmente ácido palmítico) e livres de AGT. A GI apresentou o dobro da quantidade de AGS na posição *sn-2* do triglicerídeo quando comparado à GNI. Quanto à GVPH, o ácido oleico foi o AG em maior concentração (mais de 40%), destaca-se também a presença de 19,9% de AGT (principalmente ácido eláidico) e quase 6% de ácido linolênico e ausência de AGS na posição *sn-2*.

O efeito da interesterificação sobre a composição de triglicerídeos está exposto na Tabela 2.3. Quando comparado à GNI, a GI apresentou menor quantidade de triglicerídeos trissaturados (especialmente SSS) e dissaturados (especialmente PPO) (3,5 vezes e 1,3 vezes, respectivamente) e uma quantidade maior (4 vezes) de triglicerídeos tri-insaturados (especialmente OOO).



Tabela 2.1 - Composição de ácidos graxos (g / 100 g de gordura) da gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GNI) e gordura parcialmente gordura hidrogenada (GVPH).

<b>Ácidos graxos</b>	<b>GI</b>	<b>GNI</b>	<b>GVPH</b>
Ácido láurico (C 12:0)	2,05 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,95 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>b</sup>
Ácido mirístico (C 14:0)	1,45 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>b</sup>
Ácido palmítico (C 16:0)	39,15 ± 0,42 <sup>a</sup>	38,90 ± 0,14 <sup>a</sup>	11,65 ± 0,21 <sup>b</sup>
Ácido esteárico (C 18:0)	15,10 ± 0,14 <sup>a</sup>	15,25 ± 0,35 <sup>a</sup>	13,25 ± 0,49 <sup>b</sup>
Ácido oléico (C18:1 n9c)	33,2 ± 0,71 <sup>a</sup>	33,60 ± 0,64 <sup>a</sup>	41,20 ± 0,57 <sup>b</sup>
Ácido linoléico (C 18:2 n6c)	8,15 ± 0,21 <sup>a</sup>	8,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	8,05 ± 0,07 <sup>a</sup>
Ácido linolênico (C 18:3 n3c)	0,20 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,28 <sup>a</sup>	5,60 ± 0,85 <sup>b</sup>
Ácido elaídico (C18:1 n9t)	0,10 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,14 <sup>a</sup>	17,00 ± 0,57 <sup>b</sup>
Ácido linolelaídico (C 18:2 n6t)	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,69 <sup>b</sup>
Outros	0,60	0,75	0,00

Média ± S.D. Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os grupos experimentais (p<0,05).

Tabela 2.1 - Composição de ácidos graxos (g / 100 g de gordura) da gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GNI) e gordura parcialmente gordura hidrogenada (GVPH) (continuação).

<b>Ácidos graxos</b>	<b>GI</b>	<b>GNI</b>	<b>GVPH</b>
Total AGS	57,70 ± 0,0 <sup>a</sup>	57,40 ± 0,49 <sup>a</sup>	25,30 ± 0,28 <sup>b</sup>
Total AGMS	33,20 ± 0,71 <sup>a</sup>	33,60 ± 0,64 <sup>a</sup>	41,20 ± 0,57 <sup>b</sup>
Total AGPS	8,35 ± 0,07 <sup>a</sup>	8,20 ± 0,28 <sup>a</sup>	13,65 ± 0,92 <sup>b</sup>
Total AGT	0,10 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,14 <sup>a</sup>	19,89 ± 1,26 <sup>b</sup>
AGPS n-6/n-3 relação	40,75	40	1,44

Legenda: AGS - ácidos graxos saturados; AGMS - ácidos graxos monoinsaturados; AGPS - ácidos graxos poliinsaturados; AGT - ácidos graxos trans. Média ± S.D. Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2.2 - Distribuição regiospecífica de ácidos graxos nas posições *sn-1,3* e *sn-2* dos triglicerídeos da gordura interesterificada (GI), gordura não interesterificada (GNI) e gordura parcialmente hidrogenada (GVPH).

<b>Posição dos ácidos graxos</b>	<b>GI</b>	<b>GNI</b>	<b>GVPH</b>
AGS ( <i>sn-1,3</i> )	59,90	72,60	41,20
AGS ( <i>sn-2</i> )	61,20	28,10	0,00
AGMS ( <i>sn-1,3</i> )	31,20	20,40	52,00
AGMS ( <i>sn-2</i> )	21,30	50,60	49,10
AGPS ( <i>sn-1,3</i> )	8,90	7,00	6,80
AGPS ( <i>sn-2</i> )	17,50	21,30	50,90

Legenda: AGS: ácidos graxos saturados; AGMS: ácidos graxos monoinsaturados; AGPS: ácidos graxos poliinsaturados; AGT: ácidos graxos trans.

Tabela 2.3 - Composição de triglicerídeos (TAG) da gordura interesterificada (GI) e da gordura não-interesterificada (GNI), expressos em percentual.

TAG (%)	NCE	GI	GNI
PPP	48	4,72	4,30
PSS	52	1,64	2,90
SSS	54	0,00	15,20
<b>Trissaturados</b>		<b>6,36</b>	<b>22,40</b>
PPL	46	8,01	6,10
PPO	48	5,73	31,00
POS	50	13,70	1,6
SOS	52	1,60	0,00
<b>Dissaturados</b>		<b>29,04</b>	<b>38,7</b>
PLL	44	1,58	0,00
PLO	46	1,51	0,00
POO	48	19,19	22,80
SOO	50	7,35	4,20
<b>Monossaturados</b>		<b>29,63</b>	<b>27,00</b>
LLO	44	2,21	0,00
LOO	46	9,73	6,7
OOO	48	15,32	0,00
<b>Tri-insaturados</b>		<b>27,26</b>	<b>6,7</b>
Outros		7,71	5,2

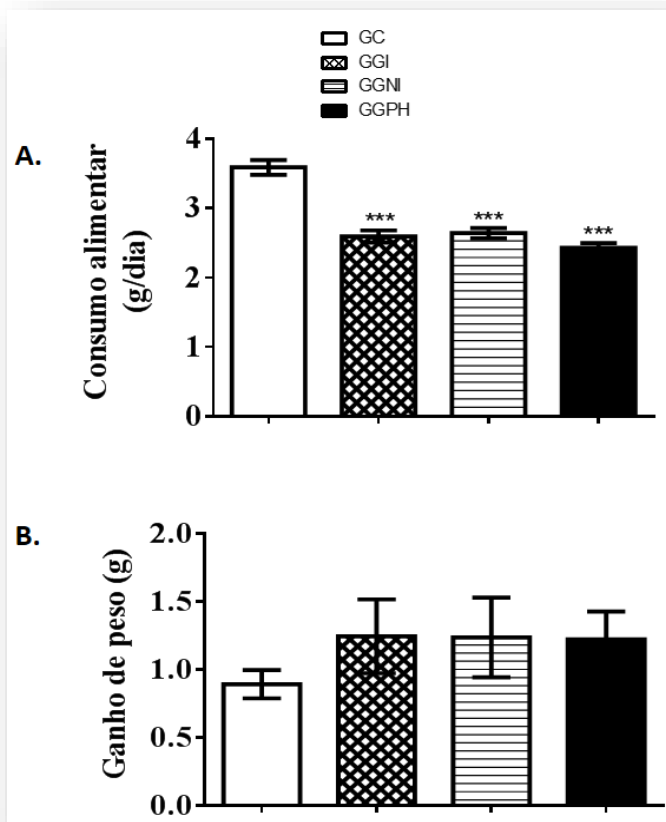
Legenda: L: ácido linoléico; NCE: número de carbono equivalente; O: ácido oleico; P: ácido palmítico; S: ácido esteárico;

### 3.2 INGESTÃO ALIMENTAR, GANHO DE PESO CORPORAL E CONSUMO ENERGÉTICO

Os dados da ingestão alimentar revelaram que os animais expostos as dietas hiperlipídicas (GGI, GGNI e GGPH) tiveram menor ingestão alimentar ( $p < 0,001$ ; Fig. 2.4A) em comparação ao grupo controle (GC). Apesar do maior consumo de energia dos animais do GGI, GGNI e GGPH ( $p < 0,001$ ; Fig. 2.4C), não foi observada diferença significativa em relação ao ganho de peso corporal entre os grupos experimentais (Fig. 2.4B), nem em relação a eficácia alimentar (Fig. 2.4D). Entretanto, deve-se ressaltar que as dietas hiperlipídicas (GGI, GGNI e GGPH) contribuíram para o aumento do peso corporal dos animais desses grupos (em quase 40% em comparação ao GC), embora sem diferença estatística, provavelmente devido à alta variação de dados. Os animais dos grupos hiperlipídicos (GGI, GGNI e GGPH) apresentaram também deposição de gordura no abdômen, como mostra a Figura 2.6, diferentemente dos animais do GC.

A progressão do peso dos animais dos grupos experimentais e a média do consumo durante os 75 dias de experimento podem ser observados na Figura 2.5. Eles indicam um perfil semelhante entre os grupos hiperlipídicos (GGI, GGNI e GGPH).

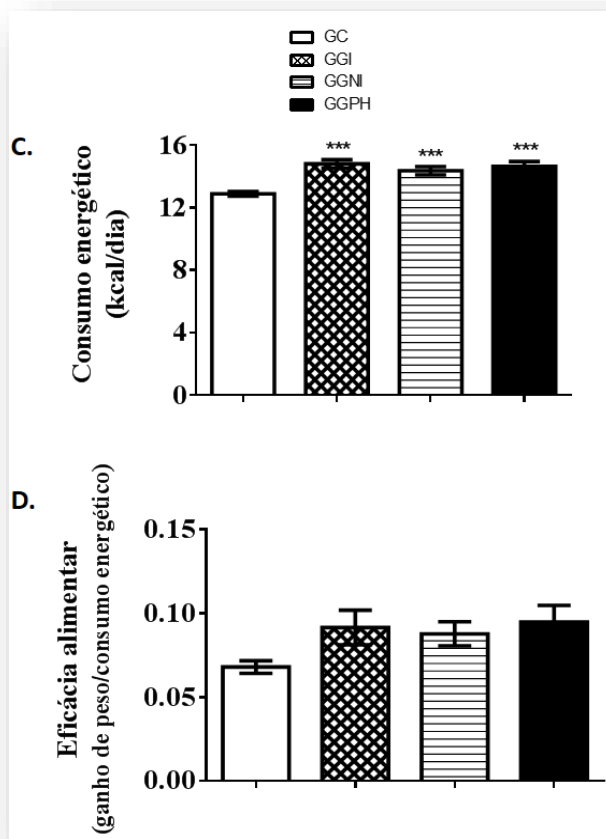
Figura 2.4 - Efeitos da gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH) após 75 dias de dieta A. Ingestão alimentar (g/dia), B. Ganho de peso (g), C. Consumo energético (kcal / dia), D. Eficácia alimentar (ganho de peso em g / consumo energético em kcal).



Legenda: GG – Grupo controle; GGI – Grupo gordura interesterificada; GGNI – Grupo gordura não interesterificada; GGPH – Grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6). \*\*\* denotam diferença estatística em relação ao controle (GC) quando  $p < 0,001$ .



Figura 2.4 - Efeitos da gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH) após 75 dias de dieta A. Ingestão alimentar (g/dia), B. Ganho de peso corporal (g), C. Consumo energético (kcal / dia), D. Eficácia alimentar (ganho de peso em g / consumo energético em kcal) (continuação).

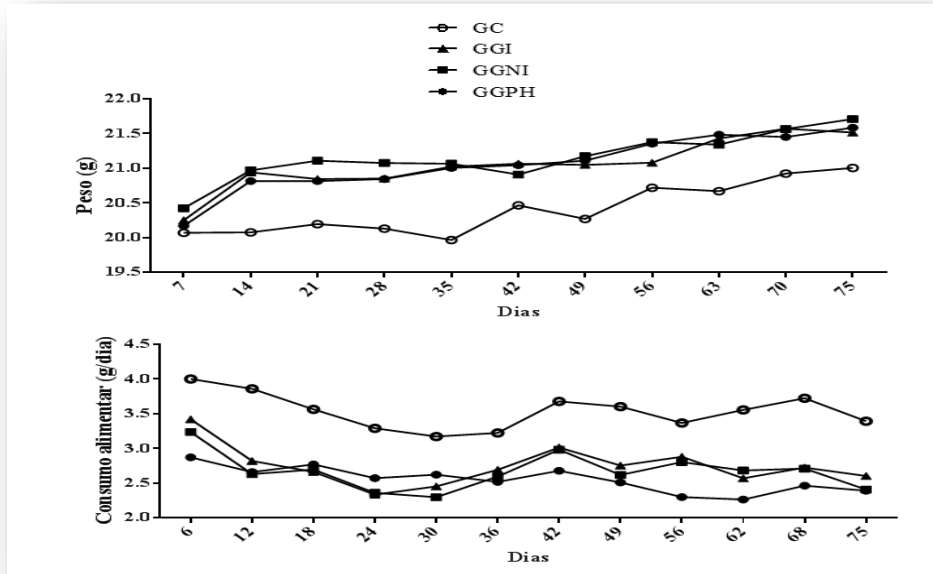


Legenda: GG – Grupo controle; GGI – Grupo gordura interesterificada; GGNI – Grupo gordura não interesterificada; GGPH – Grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6). \*\*\* denotam diferença estatística em relação ao controle (GC) quando  $p < 0,001$

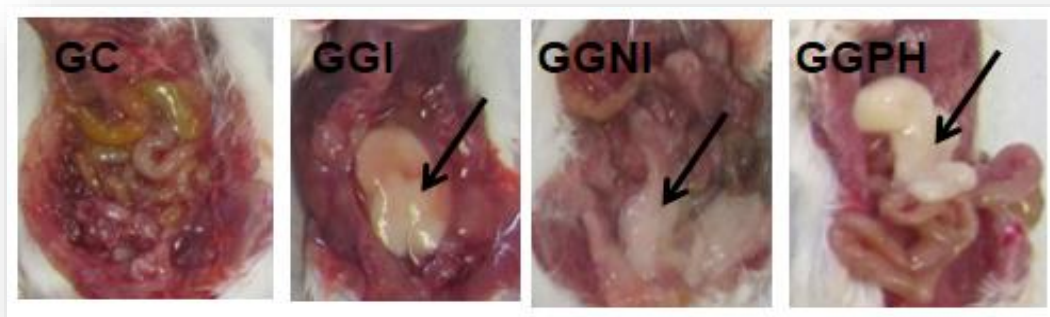


Figura 2.5 – Peso corporal e consumo alimentar dos grupos experimentais, durante os 75 dias de tratamento. A. Progressão do peso (g). B. Média do consumo alimentar (g / dia).



Legenda: Grupos: controle (GC), gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH). Os valores são expressos como média. (n = 6).

Figura 2.6 - Deposição gordurosa abdominal.

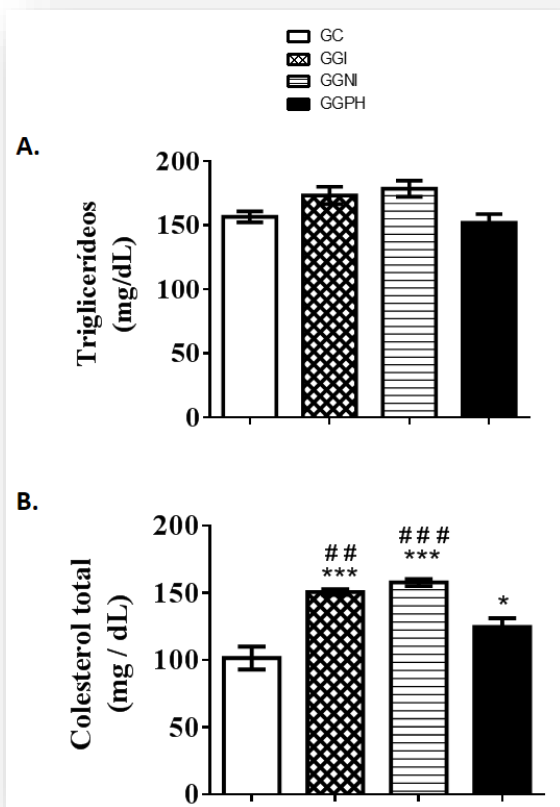


O depósito de gordura (indicado pela seta preta) não foi observado no grupo Controle (GC), mas foi encontrado nos grupos hiperlipídicos: gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH).

### 3.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS

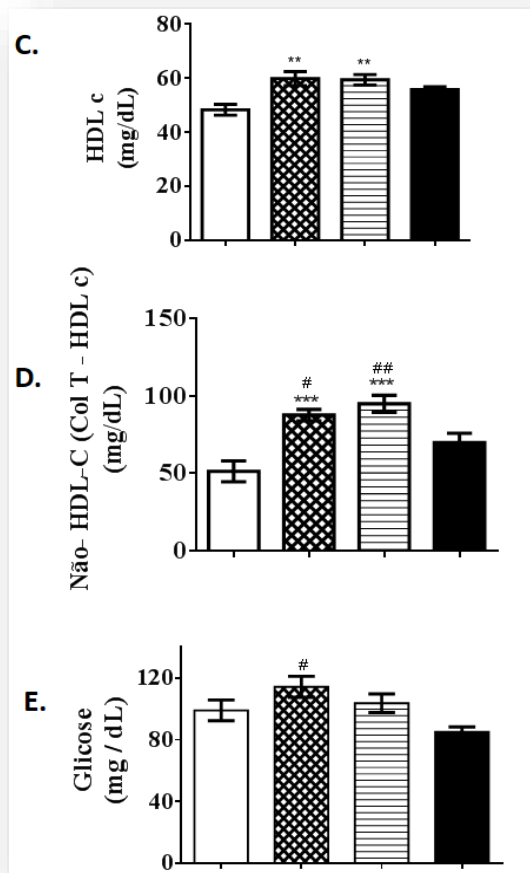
Os dados revelaram perfil semelhante de concentração de triglicerídeos (Fig. 2.7A) em todos os grupos testados, indicando que as diferentes dietas não foram capazes de alterar as concentrações séricas deste parâmetro. Em contraste, o colesterol total (Fig. 2.7B) foi aumentado nos camundongos Balb-c expostos às dietas hiperlipídicas, GGI e GGNI ( $p < 0,001$ ) e GGPH ( $p < 0,05$ ) em comparação ao GC. Os GGI e GGNI tiveram aumento mais expressivo ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com o GGPH. A determinação de HDL-C mostrou que somente os GGI e GGNI tiveram as concentrações aumentadas, quando comparados com o GC ( $p < 0,01$ ; Fig. 2.7C). No entanto, não foram observadas diferenças significativas de HDL-C entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica (GGI, GGNI e GGPH). Quanto as concentrações séricas de não-HDL-C (Fig. 2.7D), o GGI e o GGNI apresentaram aumentos significativos desse parâmetro em comparação ao GC ( $p < 0,001$ ) e ao GGPH ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente). As concentrações séricas de glicose foram estatisticamente elevadas apenas no GGI em comparação com o GGPH ( $p < 0,05$ ; Fig. 2.7E). As enzimas plasmáticas da função hepática, AST e ALT (Fig. 2.7F e G, respectivamente), não se alteraram com os diferentes tratamentos.

Figura 2.7 - Avaliação do perfil bioquímico sérico. Análise de: A. Triglicerídeos, B. Colesterol total, C. HDL-C, D. Não-HDL-C, E. Glicose, F. AST: aspartato amina transferase e G. ALT: alanina amina transferase.



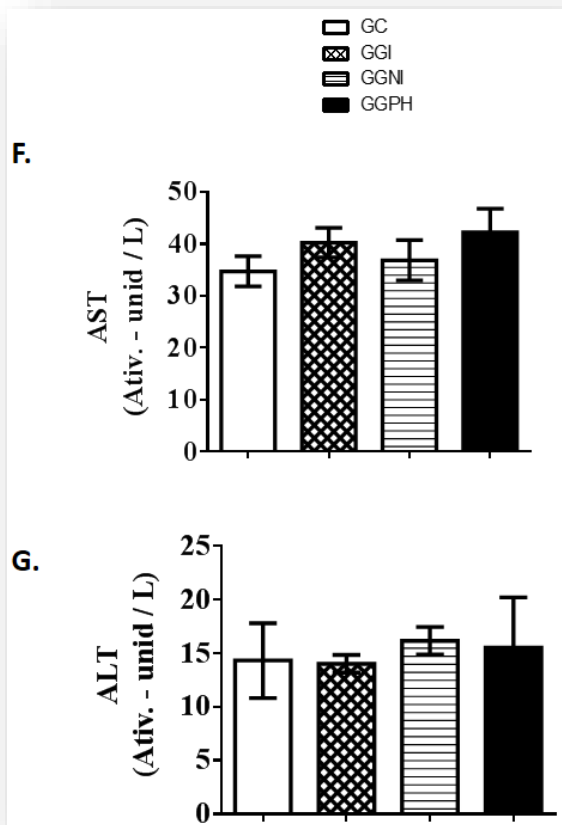
Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6). \* e \*\*\* denotam diferença estatística em relação ao grupo controle (GC), quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. ## e ### denotam diferença estatística entre os grupos gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH), quando  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

Figura 2.7 - Avaliação do perfil bioquímico sérico. Análise de: A. Triglicerídeos, B. Colesterol total, C. HDL-C, D. Não-HDL-C, E. Glicose, F. AST: aspartato amina transferase e G. ALT: alanina amina transferase (continuação).



Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6). \*\* e \*\*\* denotam diferença estatística em relação ao grupo controle (GC), quando  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. # e ## denotam diferença estatística entre os grupos gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH), quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Figura 2.7 - Avaliação do perfil bioquímico sérico. Análise de: A. Triglicerídeos, B. Colesterol total, C. HDL-C, D. Não-HDL-C, E. Glicose, F. AST: aspartato amina transferase e G. ALT: alanina amina transferase (continuação).



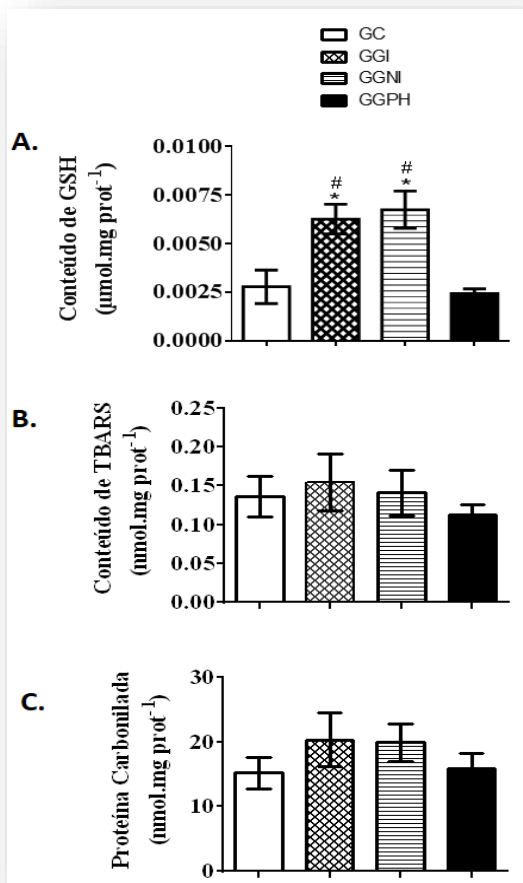
Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6).



### 3.4 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

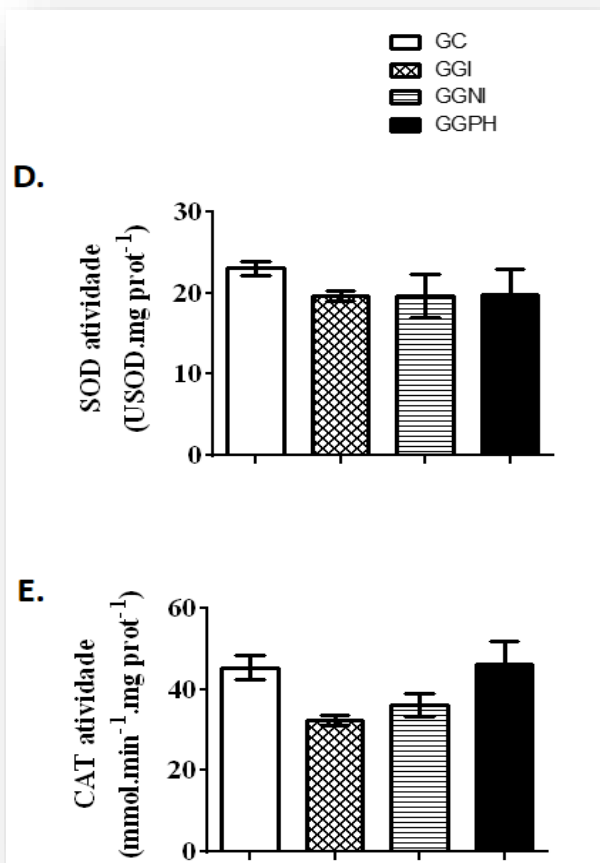
O conteúdo de GSH hepático detectado (Fig. 2.8A) foi mais elevado nos grupos GGI e GGNI (aproximadamente 2,3 e 2,7 vezes, respectivamente) comparado ao GC e GGPH ( $p < 0,05$ ). O conteúdo de GSH no GGPH foi semelhante ao GC. Os marcadores oxidativos, TBARS (Fig. 2.8B) e proteína carbonilada (Fig. 2.8C), não apresentaram diferenças significativas entre os quatro grupos. Perfil semelhante foi identificado para algumas enzimas antioxidantes, como CAT (Fig. 2.8D), SOD (Fig. 2.8E) e GPx (Fig. 2.8G), que se mantiveram semelhantes ao GC. Por outro lado, foi observado um aumento de aproximadamente 3,5 vezes na atividade de GR (Fig. 2.8F) nos grupos GGI e GGNI em comparação ao GC, enquanto a atividade da GR no GGPH foi semelhante ao GC.

Figura 2.8 - Avaliação da modulação do estresse oxidativo hepático. A. Análise do conteúdo de GSH, B. Conteúdo de TBARS, C. Conteúdo de proteína carbonilada, D. Atividade da superóxido desmutase (SOD), E. Atividade da catalase (CAT), F. Atividade da glutiona redutase (GR), G. Atividade da glutiona peroxidase (GPx).



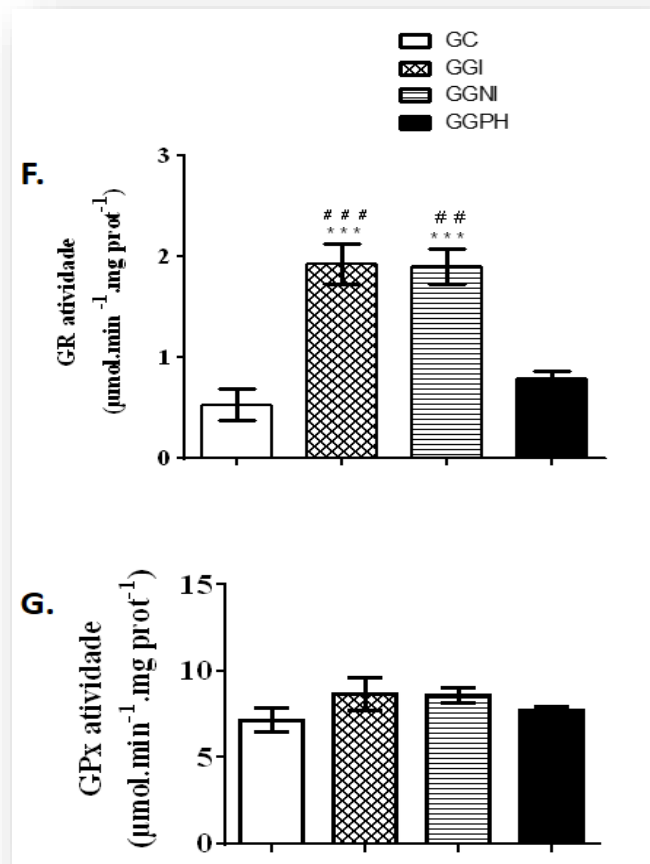
Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6). \* denota diferença estatística em relação ao grupo controle (GC), quando  $p < 0,05$  e # denota diferença estatística entre os grupos gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH), quando  $p < 0,05$ .

Figura 2.8 - Avaliação da modulação do estresse oxidativo hepático. A. Análise do conteúdo de GSH, B. Conteúdo de TBARS, C. Conteúdo de proteína carbonilada, D. Atividade da superóxido desmutase (SOD), E. Atividade da catalase (CAT), F. Atividade da glutatona redutase (GR), G. Atividade da glutatona peroxidase (GPx) (continuação).



Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6).

Figura 2.8 - Avaliação da modulação do estresse oxidativo hepático. A. Análise do conteúdo de GSH, B. Conteúdo de TBARS, C. Conteúdo de proteína carbonilada, D. Atividade da superóxido desmutase (SOD), E. Atividade da catalase (CAT), F. Atividade da glutiona redutase (GR), G. Atividade da glutiona peroxidase (GPx) (continuação).



Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. (n = 6). \*\*\* denota diferença estatística em relação ao grupo controle (GC), quando  $p < 0,001$  e ### denota diferença estatística entre os grupos gordura interesterificada

(GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH), quando  $p < 0,001$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Um dos objetivos deste trabalho foi investigar os efeitos da modificação da estrutura dos triglicerídeos, promovida pela interesterificação química, sobre os marcadores nutricionais e metabólicos, em camundongos Balb-c. A análise de AG indicou similaridade entre as duas gorduras (GI e GNI), compostas por aproximadamente 60% de AGS de cadeia longa, principalmente de ácido palmítico. Esses resultados já eram esperados, pois a interesterificação não altera o perfil de AG. Além disso, óleo de palma ou frações de óleo de palma, como estearina de palma (fração sólida, obtida por fracionamento) são frequentemente utilizadas na fabricação de gorduras interesterificadas (MENSINK et al., 2016b; MILLS; HALL; BERRY, 2017). Ambas as gorduras são ricas em ácido palmítico, o óleo de palma contém 40-48% e a estearina de palma 48-74% de ácido palmítico (AAOC, 1999). As gorduras vegetais, como o óleo de palma, têm tipicamente altas proporções de AGS nas posições *sn-1* e *sn-3* (MILLS; HALL; BERRY, 2017). A interesterificação aumentou a quantidade de AGS na posição *sn-2*, como esperado. Neste estudo, a GI apresentou o dobro da quantidade de AGS na posição *sn-2* do TAG. Soares et al. (2009) reportaram resultados semelhantes para uma mistura de 60:40 de estearina e oleína de palma.

Aqui, comparamos também os efeitos metabólicos de um GI com uma GVPH, ambas disponíveis comercialmente e com a mesma aplicação em alimentos. A quantidade de AGT (19,9%) encontrada no GVPH deste estudo indica que a indústria de alimentos implementou novas tecnologias para produzir gorduras parcialmente hidrogenadas com quantidades relativamente baixas de AGT. Nos anos de 1990 e 2000, o teor de AGT foi expressivamente superior, variando de 30 a 60% nas gorduras hidrogenadas (BLOCK; BARRERA-ARELLANO, 1994; COSTALES; FERNÁNDEZ, 2009; MOZAFFARIAN; STAMPFER, 2010). Mensink e Katan (1990) em seu estudo clássico, por exemplo, identificaram quantidade de 45,8% de AGT na margarina utilizada. Deve-se notar que o GVPH que foi usada no presente estudo apresentou ácido graxo essencial ômega-3, o ácido linolênico (5,6%). A presença de ácido linolênico no GVPH confirma a informação do fabricante, que essa

gordura foi produzida com óleo de soja, que contém 5,5-9,5% deste AG em sua composição (AOAC, 1999).

Durante os 75 dias de tratamento, os animais que receberam as dietas hiperlipídicas (GGI, GGNI e GGPH) apresentaram menor consumo alimentar ( $p < 0,001$ ) e maior consumo de energia ( $p < 0,001$ ). Resultados semelhantes também foram observados por Lamas et al. (LAMAS et al., 2015) em seu estudo com camundongos atímicos Balb / c (Nu / Nu). No entanto, deve-se notar que, apesar da menor ingestão alimentar, as dietas hiperlipídicas aumentaram o ganho de peso em cerca de 40% (embora não significativo), também observado na pesquisa de Nishikawa et al. (2012). Esse achado pode ser devido ao acúmulo de tecido adiposo visceral como demonstrado aqui. Por outro lado, ao contrário do que foi descrito na literatura (AFONSO et al., 2016; GOUK et al., 2013), no presente estudo a gordura interesterificada não promoveu ganho de peso significativo e maior aumento de gordura adiposa visceral, em comparação com as dietas não interesterificada e *trans*, possivelmente devido ao tempo de exposição à dieta. Gouk et al. (2013) e Afonso et al. (2016) observaram maior ganho de peso em animais alimentados com gordura interesterificada após 15 e 16 semanas de tratamento, respectivamente. Magri et al. (2015) e Velasco et al. (2015) avaliaram ganho de peso e adiposidade em camundongos C57BL-6 cujas mães receberam gordura interesterificada durante gestação e lactação. Os autores concluíram que a ingestão materna interesterificada e/ou de gordura de palma pode predispor a prole ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta, quando comparada ao grupo alimentado com gordura parcialmente hidrogenada. Em camundongos C57BL-6, o consumo de gordura interesterificada também levou à desregulação na expressão de proteínas envolvidas na ingestão de alimentos (BISPO et al., 2015).

No presente estudo, dietas hiperlipídicas - independentemente da composição - não alteraram as concentrações séricas de triglicédeos. Estudos anteriores relataram resultados controversos para os triglicédeos plasmáticos após o consumo de gordura interesterificada. Um estudo com leitões indicou aumento de triglicédeos após 12 semanas de consumo de oleína de palma enzimaticamente interesterificada (PONNAMPALAM et al., 2011). Por outro lado, estudos com ratos Wistar mostraram redução após o consumo de gorduras interesterificadas compostas de óleos insaturados (REENA; LOKESH, 2007; SHARMA; LOKESH, 2013).

No entanto, no presente estudo, as dietas GI e GNI aumentaram significativamente os níveis séricos de colesterol total, HDL-C e não-HDL-C, enquanto a dieta contendo AGT (GVPH) aumentou apenas o

colesterol total. Com base nesses resultados, podemos concluir que alterar a distribuição posicional do ácido palmítico não altera as concentrações séricas das lipoproteínas. Resultados semelhantes foram observados em humanos (BERRY, 2009; MENSINK et al., 2016). De acordo com Berry (2009), as evidências sugerem que a estrutura dos triglicerídeos não tem efeito sobre a digestibilidade ou sobre a lipemia de jejum, não provocando uma resposta metabólica diferente quando comparada com suas contrapartes nativas. Por outro lado, tem sido relatado que gorduras interesterificadas (20% de energia como gordura) administradas a ratos Wistar por um período de 60 dias, reduzem as concentrações de colesterol total e LDL-C (NAGARAJU; LOKESH, 2007; REENA; GOWDA; LOKESH, 2011; REENA; LOKESH, 2007, 2012; SHARMA; LOKESH, 2013). No entanto, esses estudos usaram misturas compostas de óleos insaturados, como linhaça, farelo de arroz, gergelim, amendoim e azeite - muito diferentes das gorduras interesterificadas disponíveis comercialmente, na quais os AGS predominam. Em camundongos LDLr-KO alimentados por 16 semanas com dieta hiperlipídica (40% de energia como gordura), o processo de interesterificação não alterou as concentrações plasmáticas de lipídios (AFONSO et al., 2016). Porém, esse mesmo estudo concluiu que a gordura interesterificada rica em ácido palmítico acelerou o desenvolvimento da aterosclerose, promovendo o acúmulo de colesterol nas partículas de LDL e nas células macrofágicas, ativando o processo inflamatório.

O não-HDL-C inclui as concentrações das lipoproteínas que contribuem para a aterosclerose: lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), remanescentes de quilomícrons, lipoproteína (a) [Lp (a)], e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BLAHA et al., 2008). Assim, pode-se inferir que os efeitos de dietas ricas em AGS, especialmente de ácido palmítico (GI e GNI), sobre as lipoproteínas foram mais deletérios do que a dieta contendo GVPH, fonte de gordura *trans* e também do ácido linolênico. Embora a dieta contendo AGT não tenha aumentado o não-HDL-C nos camundongos Balb-c, a literatura científica tem mostrado que o consumo de AGT aumenta as concentrações de não-HDL-C em humanos (MENSINK; KATAN, 1990; ZOCK; MENSINK, 1996). Outros estudos indicaram que o ácido palmítico também aumentou a concentração de colesterol total e LDL (MENSINK et al., 2003; SUN et al., 2015), enquanto o ácido linolênico pode contribuir para a redução do LDL-C (RODRIGUEZ-LEYVA et al., 2010). Esses achados indicam que as respostas lipídicas plasmáticas frente à dieta contendo GI, GNI ou

gordura trans podem ser específicas, lembrando que os resultados em animais de laboratório devem ser interpretados com cautela.

No presente estudo as dietas GI e GNI não alteraram a glicose plasmática. Entretanto, em humanos, foram observados no plasma níveis aumentados de glicose em jejum e diminuição na insulina (SUNDRAN et al., 2007). Filippou et al. (2014) também encontraram diminuição nas concentrações de polipeptídeo insulínico (GIP) pós-prandial dependente de glicose, com o consumo de oleína de palma interesterificada. Em ratos Wistar foi observado aumento da glicemia de jejum e diminuição da tolerância à glicose em resposta ao consumo de óleo de soja interesterificado após 16 semanas, mas não após 8 semanas de consumo (MIYAMOTO et al., 2018). No presente estudo, um aumento significativo na glicose sérica foi observada nos animais GGI, em comparação ao GGPH. Conforme observado por Miyamoto (2018), o tempo de exposição à dieta com gordura interesterificada pode ser determinante para o aumento da glicose plasmática.

Dietas hiperlipídicas podem levar a danos no fígado, incluindo lesões de base oxidativa (MASARONE et al., 2018). No presente estudo, 75 dias de tratamento não afetaram as atividades da AST e ALT, principais marcadores da função hepática. Embora a relação entre o estresse oxidativo e o consumo de dietas ricas em AGT seja bem conhecida (DHIBI et al., 2011; MONGUCHI et al., 2017), a dieta contendo gordura *trans* não alterou os valores dos biomarcadores do estresse oxidativo no fígado. Além disso, não encontramos diferenças entre as dietas GI e GNI, semelhante a um estudo com ratos Wistar (NAGARAJU; LOKESH, 2007). No entanto, as dietas fontes de ácido palmítico (GI e GNI), promoveram aumento significativo dos valores de GSH e GR. Estudos tem demonstrado que o ácido palmítico apresenta lipotoxicidade sobre vários tipos de células, entre eles os hepatócitos (GUO et al., 2007; ZHANG et al., 2011). Portanto, o aumento da atividade da GR associado à ausência de indução do estresse oxidativo, explicitado pelos marcadores TBARS e proteína carbonilada, podem explicar a elevação nas concentrações de GSH observados nos GGI e GGNI, indicando uma potencial proteção contra os danos induzidos por radicais livres no fígado. É bem conhecido que o sistema redox da GSH é importante protetor contra o estresse oxidativo. O GSH, um eliminador de radicais, é convertido em glutathione oxidada (GSSG) e o GR converte continuamente GSSG de volta em GSH (YAO; LEONARD; REDDY, 2006). Além disso, o aumento nas concentrações do GSH hepático pode estar relacionado ao aumento do colesterol total, HDL-C e não-HDL-C, observados nos grupos GGI e GGNI. Isso porque o GSH é considerado



um ativador da enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase), uma enzima da via metabólica do mevalonato, que produz o colesterol (GUSTAFSSON et al., 1990).

Convém destacar que camundongos fêmeas apresentam proteção hormonal contra alterações metabólicas causadas por dietas hiperlipídicas (CARLSSON et al., 2012). Assim, os efeitos do consumo de tais gorduras poderiam ser ainda mais visíveis se este estudo fosse realizado com camundongos machos.

O resumo gráfico deste estudo está apresentado na Figura 2.9.

## 5. CONCLUSÃO

No contexto das dietas hiperlipídicas (40% kcal), os camundongos Balb-c que receberam a dieta com gordura interesterificada apresentaram resultados semelhantes aos que receberam gordura com o mesmo perfil de ácidos graxos, mas com uma quantidade menor (2 vezes) de ácidos graxos saturados na posição *sn-2* do triglicerídeo (gordura não interesterificada), em todos os parâmetros avaliados. Portanto, pode-se inferir que a modificação da estrutura dos triglicerídeos, causada pela interesterificação, não levou a diferentes alterações metabólicas.

Por outro lado, os camundongos que receberam gordura interesterificada, contendo 39% de ácido palmítico, apresentaram maiores concentrações séricas de colesterol total, não-HDL-C e glicose, e resposta ao estresse oxidativo hepático diferente do grupo que recebeu gordura vegetal parcialmente hidrogenada, contendo 20% de AGT e 6% de ácido linolênico. Pode-se concluir que a gordura vegetal parcialmente hidrogenada apresentou resultados mais favoráveis que a gordura interesterificada rica em ácido palmítico.

Estudos adicionais de longo prazo *in vivo* que investiguem os efeitos do consumo das gorduras interesterificadas são necessários, uma vez que essa gordura está sendo amplamente utilizada para substituir as gorduras *trans*.



Figura 2.9 – Resumo gráfico do estudo



Figura 2.9 – Resumo gráfico do estudo (continuação).

Legenda: AGS – Ácidos graxos saturados; AGT - Ácidos graxos trans; GC - grupo controle; GGI - grupo gordura interesterificada; GGNI - grupo gordura não interesterificada (GGNI); GGPH - grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada; #, ## e ### denotam diferença estatística entre os grupos gordura interesterificada (GGI), gordura não interesterificada (GGNI) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH), quando  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1984. v. 105p. 121–126.
- AFONSO, M. S. et al. Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 32, p. 91–100, 2016.
- ALFIERI, A. et al. Effects of plant oil interesterified triacylglycerols on lipemia and human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2018.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470–475, 1974.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes**. Washington, DC: US FDA, 1999.
- BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: An overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2009.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, p. 882–890, 1963.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1984. v. 105p. 299–305.
- BISPO, K. P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. **Journal of Physiological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 131–138, 2015.

BLAHA, M. J. et al. The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 2, n. 4, p. 267–273, 2008.

BLOCK, J M; BARRERA-ARELLANO, D. Produtos hidrogenados no Brasil: Isômeros trans, características físico-químicas e composição em ácidos graxos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 94, n. 4, p. 281–285, 1994.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 476–482, 1973.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1985. v. 113p. 484–490.

CARLSSON, P. et al. Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue. **PLoS One**. v. 7, n. 9, 2012.

CHAJÈS, V. et al. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC study. **American Journal of Epidemiology**, v. 167, n. 11, p. 1312–1320, 2008.

COSTALES, R.; FERNÁNDEZ, A. Hidrogenación e Interesterificación. In: BLOCK, J.; BARRERA-ARELLANO, D. (Eds.). **Temas Selectos en Aceites y Grasas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2009.

DHIBI, M. et al. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 65, 2011.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1984. v. 105p. 114–120.

GHEBREYESUS, T. A.; FRIEDEN, T. R. REPLACE: a roadmap to make the world trans fat free by 2023. **The Lancet**, v. 391, n. 10134, p. 1978–1980, 2018.

GOUK, S.-W. et al. Stearic acids at sn-1, 3 positions of TAG are more efficient at limiting fat deposition than palmitic and oleic acids in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 07, p. 1174–1180, 29 abr. 2014.

GOUK, S. W. et al. Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 11, p. 1987–1995, 12 dez. 2013.

GUO, W. et al. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 2, p. E576–E586, 2007.

GUSTAFSSON, J. et al. Cholesterol synthesis in patients with glutathione deficiency. **European Journal of Clinical Investigation**, n. 20, p. 470–474, 1990.

HIRKO, K. A. et al. Erythrocyte membrane fatty acids and breast cancer risk: a prospective analysis in the nurses' health study II. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 6, p. 1116–1129, 2018.

LAMAS, B. et al. Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 1, p. 58–71, jan. 2015.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1990. v. 186p. 464–478.

LIU, B. et al. Association between plasma trans-fatty acid concentrations and diabetes in a nationally representative sample of US adults. **Journal of Diabetes**, v. 10, n. 8, p. 653–664, 2018.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAGRI, T. P. R. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 904–910, out. 2015.

MASARONE, M. et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 9547613, 2018.

MENSINK, R. P. et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins : a meta-analysis of 60. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1–26, 2003.

MENSINK, R. P. et al. The Increasing Use of Interesterified Lipids in the Food Supply and Their Effects on Health. **Advances in Nutrition**, v. 7, p. 719–729, 2016.

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 7, p. 439–445, 16 ago. 1990.

MILLS, C. E.; HALL, W. L.; BERRY, S. E. E. What are interesterified fats and should we be worried about them in our diet? *Nutrition Bulletin*, v. 42, n. 2, p. 153–158, 2017.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

MIYAMOTO, J. É. et al. Interesterified soybean oil promotes weight gain, impaired glucose tolerance and increased liver cellular stress markers. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, p. 153–159, 2018.

MONGUCHI, T. et al. Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. **Journal of Cardiology**, v. 70, n. 2, p. 121–127, 2017.

MONTEIRO, C. et al. NOVA. The star shines bright. The Food System. Food classification. Public health. **World Nutrition**, v.7, n. 1–3, p. 28–38, 2016.



MOODIE, R. et al. Non-Communicable Diseases 4 Profits and pandemics : prevention of harmful effects of tobacco , alcohol , and ultra-processed food and drink. **The Lancet**, v. 6736, n. 12, p. 1–10, 2013.

MOUBARAC, J. et al. Consumption of ultra-processed foods predicts diet quality in Canada. **Appetite**, v. 108, p. 512–520, 2017.

MOZAFFARIAN, D.; STAMPFER, M. J. Removing industrial trans fat from foods. **BMJ (Online)**, v. 340, n. 7756, p. 1094, 2010.

NAGARAJU, A.; LOKESH, B. R. Interesterified coconut oil blends with groundnut oil or olive oil exhibit greater hypocholesterolemic effects compared with their respective physical blends in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 9, p. 580–586, set. 2007.

NISHIKAWA, S. et al. Gene Expression in Livers of BALB/C and C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 1, p. 71–82, 2012.

NOAKES, M.; CLIFTON, P. M. Oil blends containing partially hydrogenated or interesterified fats: differential effects on plasma lipids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 242–247, 1 ago. 1998.

O'FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 1 jun. 2007.

PONNAMPALAM, E. N. et al. Differential effects of natural palm oil, chemically- and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 53, 18 dez. 2011.

REENA, M. B.; GOWDA, L. R.; LOKESH, B. R. Enhanced hypocholesterolemic effects of interesterified oils are mediated by upregulating LDL receptor and cholesterol 7- $\alpha$ - hydroxylase gene expression in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 24–30, 1 jan. 2011.

REENA, M. B.; LOKESH, B. R. Hypolipidemic effect of oils with balanced amounts of fatty acids obtained by blending and

interesterification of coconut oil with rice bran oil or sesame oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10461–10469, dez. 2007.

REENA, M. B.; LOKESH, B. R. Effect of blending and lipase catalyzed interesterification reaction on the cholesterol lowering properties of palm oil with rice bran oil in rats. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 1, p. 203–209, jan. 2012.

REJ, R.; HORDER, M. Aspartate aminotransferase. In: BERGMAYER, H. U.; BERGMAYER, J.; GRASSL, M. (Eds.). **Methods of Enzymatic Analysis**. 3. ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. p. 416–433.

RISÉRUS, U. Trans fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 161–165, 2006.

RODRIGUEZ-LEYVA, D. et al. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid , alpha-linolenic acid. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, n. 9, p. 489–496, 2010.

SEGURA, N. et al. Valorization of beef tallow by lipase-catalyzed interesterification with high oleic sunflower oil. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 12, p. 1945–1954, 2011.

SHARMA, M.; LOKESH, B. R. Modification of serum and tissue lipids in rats fed with blended and interesterified oils containing groundnut oil with linseed oil. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 220–230, abr. 2013.

SOARES, A. F. S. D. M. et al. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of blends of palm stearin and palm olein. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1287–1294, nov. 2009.

SUGIUCHI, H. et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated  $\alpha$ -cyclodextrin. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 717–723, fev. 1995.

SUN, Y. et al. Palm oil consumption increases LDL cholesterol compared with vegetable oils low in saturated fat in a Meta-Analysis of clinical trials. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 7, p. 1549–1558, 1 jul. 2015.

SUNDRAM, K.; KARUPAIAH, T.; HAYES, K. C. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutrition and Metabolism**, v. 4, n. 3, p. 1–12, 2007.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine**, v. 6, n. 1, p. 24–27, 1 jan. 1969.

VELASCO, P. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for trans fat in maternal diet can predispose obesity and inflammation in adult male offspring. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1, p. 29:754, 2015.

VLAHOV, G. Regiospecific analysis of natural mixtures of triglycerides using quantitative <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance of acyl chain carbonyl carbons. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 359–362, maio 1998.

WHO. **World Health Organization**. Replace trans fat: an action package to eliminate industrially-produced trans-fatty acids. 2018b. Disponível em: <<https://www.who.int/docs/default-source/documents/replace-transfats/replace-action-package.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2019.

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered Glutathione Redox State in Schizophrenia. **Disease Markers**, v. 22, n. 1–2, p. 83–93, 2006.

ZHANG, Y. et al. Effect of  $\alpha$ -linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 122, 2011.

ZOCK, P. L.; MENSINK, R. P. Dietary trans-fatty acids and serum lipoproteins in humans. **Current Opinion in Lipidology**, v. 7, n. 1, p. 34–37, fev. 1996.



### CAPÍTULO 3

## EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE GORDURA INTERESTERIFICADA, NÃO INTERESTERIFICADA E PARCIALMENTE HIDROGENADA EM CAMUNDONGOS C57BL-6 COM TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich

### RESUMO:

A interesterificação tem substituído a hidrogenação parcial de óleos, por produzir gorduras livres de ácidos graxos *trans*. Por outro lado, gera novos triacilgliceróis ricos em gordura saturada, ocupando prioritariamente a posição sn-2. A relação entre gordura interesterificada e o desenvolvimento de câncer não foi estudada até o momento, sendo este estudo pioneiro. O objetivo foi investigar os efeitos da suplementação de diferentes gorduras modificadas no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Camundongos fêmeas CB57-BL-6 foram divididos em quatro grupos (n=16) e alimentados durante todo o experimento com dieta normolipídica (GC) ou hiperlipídica (40 kcal%), contendo gordura interesterificada (GGI); ou *blend* não interesterificado (GGNI); ou uma gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GGPH). Após 70 dias de tratamento os camundongos receberam intraperitonealmente células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Após 10 dias o tumor foi avaliado (n=6) e até 35 dias após o implante do TAE a sobrevida dos animais foi avaliada (n=10). Após os tratamentos, os camundongos do GGI e GGNI apresentaram resultados semelhantes em todos os parâmetros avaliados. Os animais do GGPH apresentaram resultados semelhantes aos do GC, quanto ao crescimento do tumor (%), percentual de células apoptóticas e biomarcadores do estresse oxidativo. Em comparação ao GC, camundongos dos GGI e GGNI apresentaram redução na sobrevida, menor percentual de células apoptóticas (3 vezes menos), elevados níveis de peroxidação lipídica (TBARS) ( $p < 0,01$ ) e conteúdo depletado de glutathiona reduzida (GSH) ( $p < 0,01$ ) nas células tumorais. O estresse oxidativo observado nas células tumorais não foi suficiente para prolongar a vida dos animais desses grupos. Em suma, o percentual de

gordura na dieta influenciou menos no desenvolvimento do TAE, do que o tipo de gordura utilizada; a quantidade aumentada de ácidos graxos saturados na posição *sn-2* dos TAG, ocasionada pela interesterificação, não afetou o desenvolvimento do tumor; dieta com ácido palmítico (gordura interesterificada) parece favorecer mais ao desenvolvimento do TAE do que dieta contendo ácidos graxos *trans* e ácido linolênico (gordura vegetal parcialmente hidrogenada). Mais estudos *in vivo* com gordura interesterificada são necessários para avaliar o potencial carcinogênico desta gordura, cujo consumo tem aumentado.

**Palavras-chave:** Gordura interesterificada. Gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Gordura *trans*. Ácido palmítico. Câncer. Tumor Ascítico de Ehrlich. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Interesterification has replaced partial hydrogenation of oils by producing *trans* fatty acid free fats. On the other hand, it generates new triacylglycerols rich in saturated fat, occupying primarily the *sn-2* position. The relationship between interesterified fat and the development of cancer has not been studied to date, being this one a pioneering study. The objective was to investigate the effects of supplementation of different modified fats on the development of Ehrlich ascites carcinoma (EAC). CB57-BL-6 female mice were divided into four groups ( $n = 16$ ) and fed throughout the experiment with either normolipid (CG) or hyperlipid (40 kcal%) diet containing interesterified fat (IFG); or non-interesterified blend (NIFG); or a partially hydrogenated vegetable fat (PHFG). After 70 days of treatment, the mice received Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells intraperitoneally. After 10 days, the tumor was evaluated ( $n = 6$ ) and up to 35 days after the EAC implantation, the survival of the animals was evaluated ( $n = 10$ ). After the treatments, IFG and NIFG mice presented similar results in all evaluated parameters. PHFG animals presented similar results to CG, regarding tumor growth (%), percentage of apoptotic cells and biomarkers of oxidative stress. In contrast to CG, IFG and NIFG mice had a reduction in survival, a lower

percentage of apoptotic cells (3 times less), high levels of lipid peroxidation (TBARS) ( $p < 0.01$ ) and reduced glutathione (GSH) depleted content ( $p < 0.01$ ) in tumor cells. The oxidative stress observed in tumor cells was not sufficient to prolong the life of the mice in these groups. In summary, the percentage of fat in the diet influenced less in the development of the EAC, than the type of fat used; the increased amount of saturated fatty acids at the sn-2 position of TAG, caused by interesterification, did not affect tumor development; diet with palmitic acid (interesterified fat) seems to favor more the development of EAC than the diet containing trans fatty acids and linolenic acid (partially hydrogenated vegetable fat). Further in vivo studies with interesterified fat are needed to evaluate the carcinogenic potential of this fat, whose consumption has increased.

**Keywords:** Interesterified fat. Partially hydrogenated vegetable fat. Trans fat. Palmitic acid. Cancer. Ehrlich ascites Carcinoma. Oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

As gorduras desempenham um papel muito importante em uma grande variedade de alimentos processados, como *shortenings*, margarinas, chocolates, produtos de panificação e confeitaria, óleos de fritura, entre outros (MILLS; HALL; BERRY, 2017). Na indústria de alimentos, os óleos vegetais em suas formas originais têm aplicações limitadas. Propriedades funcionais desejáveis relacionadas ao comportamento de fusão, teor de gordura sólida, plasticidade e estabilidade oxidativa, podem ser alcançadas usando tecnologias de modificação de óleos e gorduras. A hidrogenação, a interesterificação, o fracionamento e a mistura (*blending*) de óleos e gorduras são frequentemente utilizados pela indústria de alimentos para melhorar as características dos alimentos processados (MENSINK et al., 2016).

A hidrogenação parcial de óleos vegetais tem sido amplamente utilizada no último século, uma vez que foi desenvolvida como uma alternativa mais barata e mais saudável às gorduras animais (MENSINK et al., 2016). Entretanto, a hidrogenação parcial altera a configuração isomérica de ácidos graxos insaturados de *cis* para *trans*. A gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH) representa a principal fonte de ácidos graxos *trans* na dieta humana (SUNDRAM et al., 2007). A ingestão de ácidos graxos *trans* (AGT) tem sido associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (MENSINK; KATAN, 1990; ZOCK; MENSINK, 1996), diabetes mellitus tipo 2 (RISÉRUS, 2006; LIU et al., 2018) e câncer (CHAJÈS et al., 2008; HIRKO et al., 2018). Por essa razão vários países têm adotado medidas para reduzir ou eliminar os AGT de alimentos processados. Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o Programa "*Replace*", cujo objetivo é tornar o mundo livre de gordura *trans* até 2023 (GHEBREYESUS; FRIEDEN, 2018; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A interesterificação vem substituindo a hidrogenação parcial de óleos vegetais, por alcançar propriedades funcionais desejáveis, sem produzir AGT (MILLS; HALL; BERRY, 2017). A interesterificação de um óleo ou de uma gordura, ou de uma mistura de óleos e gorduras, é o processo que consiste em quebra simultânea das ligações éster existentes e formação de novas ligações nas moléculas do glicerol. A interesterificação promove rearranjo na distribuição dos AG, intra e entre os TAG, formando novos TAG, alterando assim as propriedades físicas e funcionais da gordura resultante. Diferentemente do perfil de TAG, o perfil de AG é mantido. Para este processo são necessários catalisadores



químico ou enzimático. A interesterificação química ainda é mais frequentemente utilizada pela indústria de alimentos. (MENSINK et al., 2016; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Uma gordura interesterificada geralmente é produzida a partir de misturas (*blends*) compostos por gorduras com alto ponto de fusão e óleo(s) líquido(s). Por esta razão, tendem a ser ricas em AGS. O processo de interesterificação faz aumentar a quantidade de AGS na posição *sn-2* das moléculas de TAG, alterando as propriedades físicas e metabólicas da gordura (MENSINK et al., 2016; MILLS; HALL; BERRY, 2017). Os óleos vegetais geralmente exibem ácidos graxos saturados (AGS) nas posições *sn-1* e 3 dos TAG. Tem sido relatado que os AG da posição *sn-2* são melhor digeridos, absorvidos e utilizados pelos tecidos. A lipase pancreática e lipoproteica preferencialmente hidrolisam AG nas posições *sn-1* e *sn-3* do TAG. AG livres são capazes de formar sabões insolúveis de cálcio ou magnésio, devido ao ambiente intestinal alcalino e podem ser eliminados pelas fezes. Por outro lado, os 2-monoacilgliceróis são rapidamente absorvidos (ALFIERI et al., 2018; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Estudos epidemiológicos e experimentais utilizando modelos animais têm associado o elevado consumo de gorduras com o risco de desenvolvimento do câncer de mama (GU et al., 2011; LAMAS et al., 2015; SCHULZ et al., 2008; SIERI et al., 2014; TURNER, 2011). Adicionalmente, outros estudos têm associado o aumento do risco de câncer de mama, principalmente à alta ingestão de AGS (DANDAMUDI et al., 2018; FASANO et al., 2017; HIRKO et al., 2018; SEILER et al., 2018) e também de AGT de alimentos processados (CHAJÈS et al., 2008; HIRKO et al., 2018; SEILER et al., 2018). O câncer de mama, a forma mais comum de câncer entre as mulheres, é também o que apresenta a maior mortalidade por câncer em todo o mundo (SEILER et al., 2018).

O elevado consumo de alimentos ultraprocessados, muitas vezes ricos em gorduras modificadas, portanto, com teores elevados de gorduras *trans* ou saturadas (MOODIE et al., 2013; MOUBARAC et al., 2017; STEELE et al., 2016); a progressiva substituição das GVPH por GI em todo o mundo (MILLS; HALL; BERRY, 2017) e a necessidade de estudos que investiguem a relação do consumo de GI com o desenvolvimento do câncer, justificam a realização da presente pesquisa.

Neste estudo, os efeitos do consumo de dietas suplementadas com (i) gordura interesterificada rica em AGS, especialmente localizadas na posição *sn-2* do esqueleto do TAG, (ii) uma mistura com a mesma composição AG da gordura interesterificada, mas com menor quantidade de AGS na posição *sn-2*, e (iii) gordura vegetal parcialmente hidrogenada

rica em AGT, no desenvolvimento de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos C57BL6 foram investigados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PRODUTOS QUÍMICOS E GORDURAS

Os produtos químicos e as gorduras utilizados neste estudo foram os mesmos descritos no Capítulo 2 (item 2.1) desta tese.

### 2.2 ESTUDO *IN VIVO*

Camundongos isogênicos (*inbred*) da linhagem C57BL-6, fêmeas (60 dias;  $21,0 \pm 2,0$  g) foram tratadas de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA / UFSC PPOO784) e em conformidade com as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). Os camundongos C57BL-6 foram alojados em gaiolas plásticas (máximo de seis animais / gaiola) e receberam água e ração comercial ou formulada peletizada *ad libidum*. As condições do ambiente foram controladas (fotoperíodo de 12 h; temperatura  $22,0 \pm 2,0$  °C), com umidade do ar em torno de 53% ( $\pm 2,0$ ).

Todas as etapas do estudo *in vivo* foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

#### 2.2.1 Delineamento experimental e dietas

Os camundongos ( $n = 64$ ) foram distribuídos em quatro grupos ( $n = 16$ ): grupo controle (GC); grupo gordura interesterificada (GGI); grupo gordura não interesterificada (GGNI) e grupo gordura parcialmente hidrogenada (GGPH), conforme apresentado na Figura 3.1. As características e a formulação das dietas recebidas por cada grupo experimental foram detalhados no capítulo 2 desta tese. Os animais receberam as referidas dietas ao longo de todo o experimento. O consumo alimentar - dado pela diferença entre a quantidade de ração colocada nas gaiolas (em g) e a sobra (em g), dividida pelo número de animais presentes na gaiola - foi monitorado e registrado três vezes por semana.

A estratégia experimental está resumida na Figura 3.2.

Figura 3.1 - Grupos experimentais alimentados com diferentes dietas.

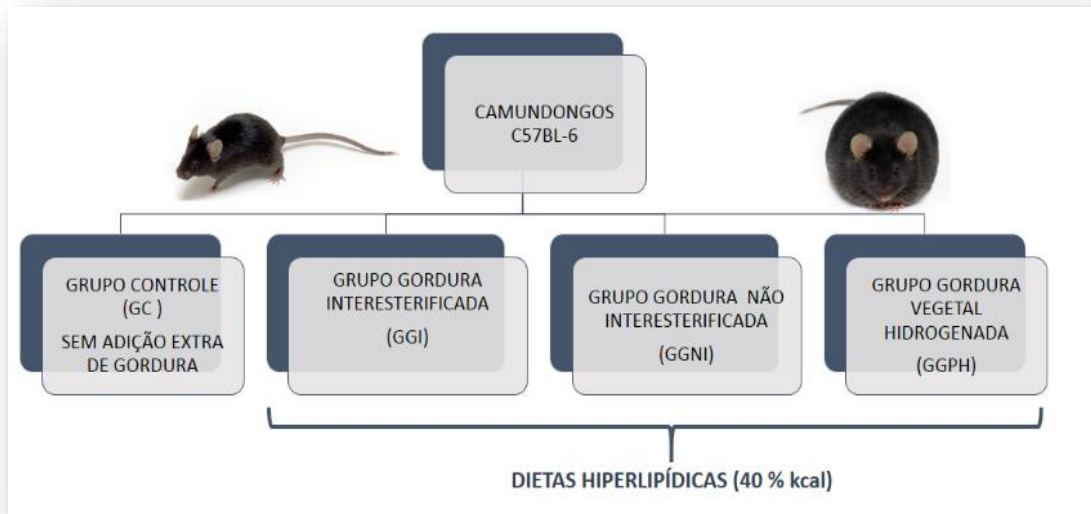
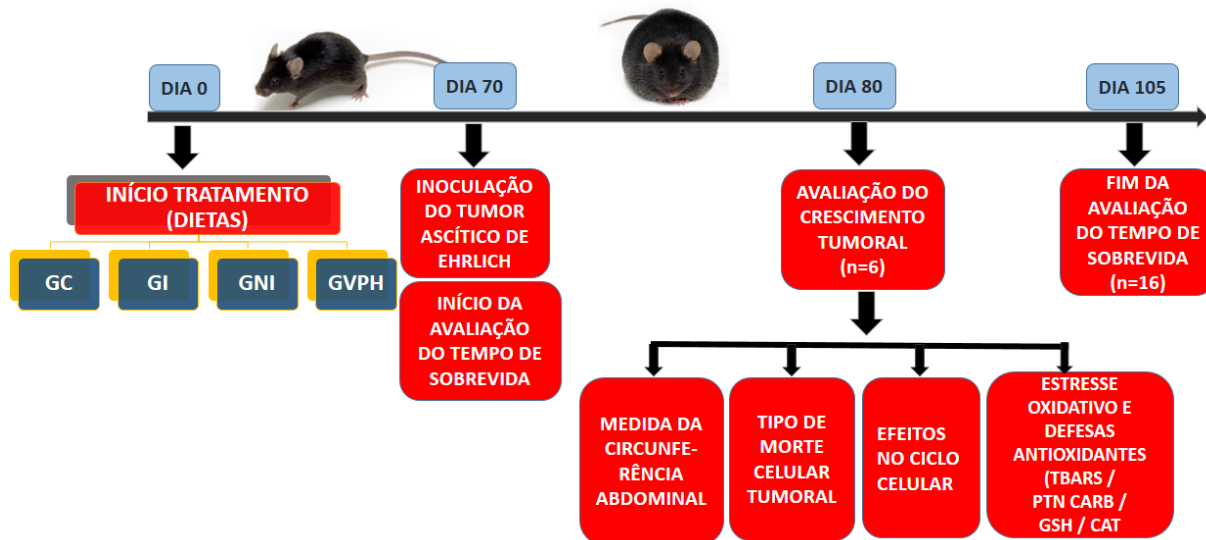


Figura 3.2 – Resumo da estratégia experimental



Legenda: CAT: Catalase; GC: grupo controle; GGI: grupo gordura interesterificada; GGNI: grupo gordura não interesterificada; GGPH: grupo gordura parcialmente hidrogenada; GSH: glutatona reduzida; Ptn Carb.: proteína carbonilada; Tbars: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

### **2.2.2 Peso corporal e avaliação do crescimento tumoral e da sobrevida dos animais**

O peso corporal dos animais foi mensurado semanalmente. Após 70 dias de tratamento com as dietas específicas, todos os camundongos receberam intraperitonealmente células do TAE suspensas em solução salina isotônica estéril (200 mL;  $5 \times 10^6$  células). O crescimento do tumor foi avaliado com base nas medidas de circunferência abdominal dos camundongos (cm) antes da inoculação do TAE (dia 70) e no final do tratamento para alguns animais (dia 80). O crescimento do tumor (%) foi calculado pela fórmula:

**Crescimento do tumor (%)** = [variação da circunferência abdominal (final – inicial) x 100] / circunferência abdominal antes da inoculação com TAE.

Após dez dias da implantação do TAE (dia 80), alguns camundongos de cada grupo de tratamento ( $n = 6$ ) foram anestesiados (15 mg/Kg de xilasina e 90 mg/Kg de cetamina), o líquido tumoral foi coletado na íntegra e os animais foram submetidos à eutanásia. Células do TAE foram utilizadas para determinações bioquímicas, estudos citológicos para análise de citotoxicidade induzida e efeitos no ciclo celular. Os animais remanescentes de cada grupo ( $n = 10$ ) foram mantidos vivos para a avaliação da sobrevida. O dia 105, ou seja, 35 dias após a inoculação do TAE, foi considerado como limite máximo para a avaliação da sobrevida. A sobrevida foi monitorada ao longo do tempo e foi estimada através da curva de Kaplan-Meier (KAPLAN, EL; MEIER, 2016), por meio do programa GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA).

### **2.2.3 Avaliação do tipo de morte e análise do ciclo celular das células do tumor ascítico de Ehrlich**

A análise do tipo de morte celular induzida pelos tratamentos foi realizada de acordo com Mcgahon et al. (1995). As células do TAE ( $5 \times 10^6$ ) coletadas do líquido ascítico de cada camundongo foram lavadas e coradas com solução fluorescente (iodeto de propídio 100  $\mu\text{g}$  / mL e laranja de acridina 100  $\mu\text{g}$  / mL - 1: 1). Então, as imagens de fluorescência de 300 células foram capturadas com filtros vermelho e verde. A aquisição de imagens foi feita em triplicata para cada amostra. As

alterações nucleares das células do TAE (necrose e apoptose) foram identificadas através da sobreposição dos filtros vermelho e verde.

A análise da parada no ciclo celular no TAE foi realizada utilizando o kit de solução de iodeto de propídio / RNase da Immunostep (Salamanca, Espanha) seguindo o protocolo do fabricante. As células de tumor ( $5 \times 10^5$ ) foram recolhidas, lavadas antes de serem fixadas com etanol (70%) e mantidas durante a noite a  $-20^\circ\text{C}$ . Depois, cada sedimento foi descongelado, lavado e recebeu a solução de iodeto de propídio / RNase. As amostras foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente a ocorrência de 10.000 eventos foram analisadas pelo citômetro de fluxo (BDFACS Canto II; BD Biosciences). Os dados foram processados usando o *Software Flowing* versão 2.5.1 (Turku, Finlândia).

#### **2.2.4 Biomarcadores de danos oxidativos e defesa antioxidante no tumor ascítico de Ehrlich**

Para estas determinações foram empregadas amostras de líquido ascítico coletado da cavidade intraperitoneal dos animais. A peroxidação lipídica foi estimada pela formação de malondialdeído (MDA) pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (BIRD; DRAPER, 1984). O dano oxidativo às proteínas foi quantificado avaliando-se os níveis de proteína carbonilada (LEVINE et al., 1990). O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi determinado pelo método descrito por Beutler et al. (1963). A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada cineticamente através do método descrito por Aebi (1984) e a leitura foi realizada em multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, EUA). As demais determinações espectrofotométricas foram realizadas com leitor de microplacas (TECAN Infinity M200). Todas as leituras foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos e Biologia (LAMEB), no CCB da UFSC.

### **2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

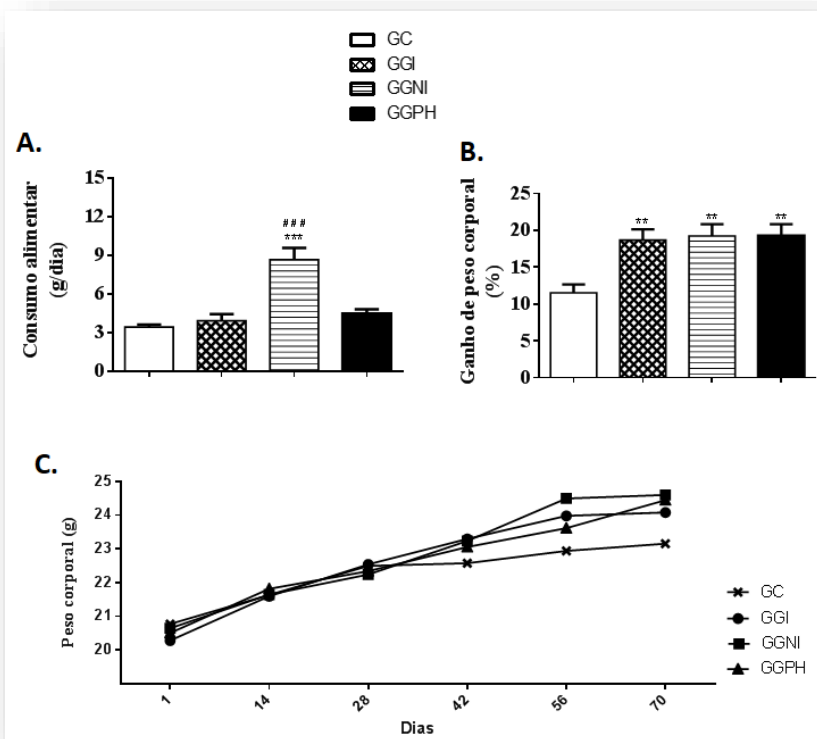
Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como médias e desvios padrão. Os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As comparações foram feitas usando o software GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A Figura 3.3 mostra a ingestão alimentar (A), o ganho de peso corporal (B) e o peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo dos 70 dias iniciais do experimento, anterior à inoculação do TAE. Um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) no peso corporal foi observado nos grupos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (GGI, GNI e GGPH), quando comparados ao grupo que recebeu dieta normolipídica (CG). Entre os grupos hiperlipídicos não foram observadas diferenças significativas (Fig. 3.3B). A Figura 3.3C mostra que a diferença no ganho de peso entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica (GGI, GGNI e GGPH) e o GC teve início em torno do dia 42.

Figura 3.3 (A) Consumo alimentar em gramas (B) ganho de peso corporal em porcentagem e (C) peso corporal em gramas ao longo dos 70 dias primeiros dias do experimento, anteriores a inoculação do TAE.



Legenda: Os valores representam a média e o desvio padrão de  $n = 6$ . GC: grupo controle; GGI: grupo gordura interesterificada; GGNI: grupo gordura não interesterificada; GGPH: grupo gordura parcialmente hidrogenada. TAE: tumor ascítico de Ehrlich. (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em relação ao GC quando  $p < 0,001$  e (\*\*)  $p < 0,01$ ; (###) denotam diferenças estatísticas comparando GGI, GGNI e GGPH ( $p < 0,001$ ).



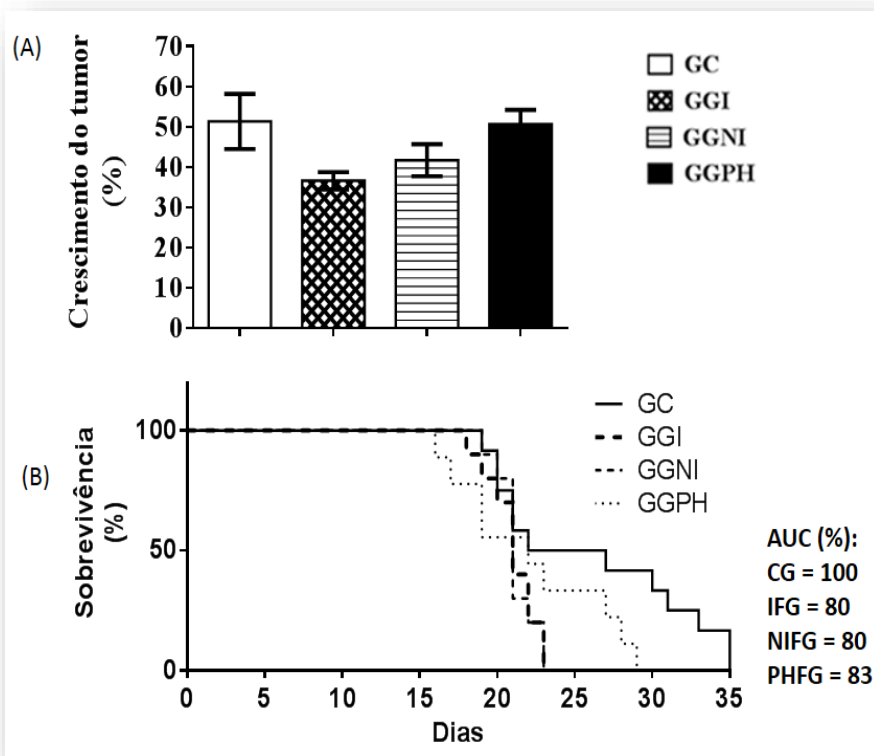
### 3.2 CRESCIMENTO TUMORAL E SOBREVIDA

Não foram observadas diferenças significativas no crescimento do TAE nos camundongos alimentados com as diferentes dietas administradas por 80 dias (70 dias antes e 10 dias pós inoculação) (Figura 3.4A). Quanto ao tempo de sobrevivência dos animais após a inoculação do TAE, a maior área sob a curva (AUC) observada foi a do GC (100), seguido do GGPH (83) e GGI e GGNI (ambos 80). Os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram menor sobrevivência, quando comparado ao GC.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE DE CÉLULAS DO TUMOR

A Figura 3.5 indica o tipo de morte celular possivelmente induzida pelas diferentes dietas. O percentual de células do TAE em necrose foi similar para todos os grupos ( $8 \pm 4$ ;  $9 \pm 5$ ;  $10 \pm 2$  e  $11 \pm 5\%$ , GC, GGI, GGNI e GGPH, respectivamente). No entanto, pode-se observar que os grupos com maior sobrevivência (GC e GGPH) também apresentaram maiores percentuais de células do TAE em apoptose ( $29 \pm 9$  e  $22 \pm 13\%$ , respectivamente), quando comparados aos grupos GGI e GGNI ( $10 \pm 4$  e  $9 \pm 3$ , respectivamente). Logo, o percentual de células do TAE viáveis foi menor para os grupos GC e GGPH ( $63 \pm 15$  e  $68 \pm 18\%$ , respectivamente), do que para os grupos GGI e GGNI ( $80 \pm 5$  e  $82 \pm 4\%$ , respectivamente). Porém, não foram encontradas diferenças significativas.

Figura 3.4 (A) Crescimento do tumor ascítico de Ehrlich com base na variação da circunferência abdominal, n=6, 10 dias após a inoculação do tumor e (B) sobrevida dos camundongos de acordo com a curva de Kaplan-Meier, n = 10, até 35 dias após a inoculação do tumor.



Legenda: Os valores representam a média e o desvio padrão (A). GC: grupo controle; GGI: grupo com gordura interesterificada; GGNI: grupo adiposo não interesterificado; GGPH: grupo de gorduras parcialmente hidrogenadas.

Figura 3.5 Morfologia das células do TAE e o tipo de morte celular induzida pelas diferentes dietas administradas por 80 dias (70 dias antes do implante e 10 dias após). Avaliação pelo método de coloração com brometo de etídio / laranja de acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência (aumento = 400 ×); As manchas vermelhas, laranjas e verdes indicam células necróticas, apoptóticas e viáveis, respectivamente.

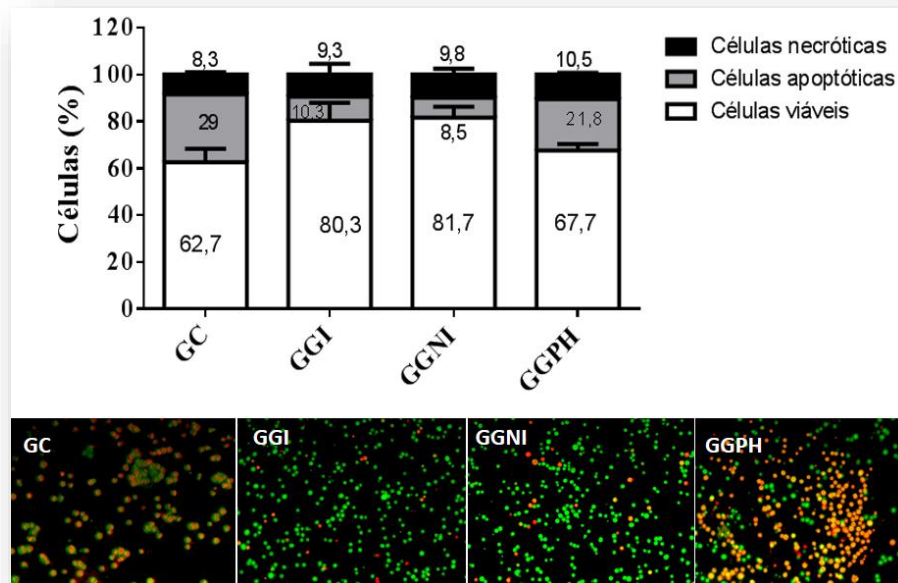


Figura 3.5 Morfologia das células do TAE e o tipo de morte celular induzida pelas diferentes dietas administradas por 80 dias (70 dias antes do implante e 10 dias após). Avaliação pelo método de coloração com brometo de etídio / laranja de acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência (aumento = 400 ×); As manchas vermelhas, laranjas e verdes indicam células necróticas, apoptóticas e viáveis, respectivamente (continuação).

Legenda: Os valores representam a média. GC: grupo controle; GGI: grupo gordura interesterificada; GGNI: grupo gordura não interesterificada; GGPH: grupo gordura parcialmente hidrogenada.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS DO TUMOR

As células tumorais dos camundongos tratados com diferentes dietas foram classificadas de acordo com a fase do ciclo celular (Fig. 3.6A / B). O GC apresentou porcentagem considerável de células do TAE na fase Sub-G1,  $19,6 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,001$ ), em relação aos grupos GGI, GGNI e GGPH ( $0,6 \pm 0,3$ ;  $0,4 \pm 0,1$  e  $0,5 \pm 0,3\%$ , respectivamente). Por outro lado, os grupos hiperlipídicos (GGI, GGNI e GGPH) apresentaram maior percentual de células na fase G1 ( $38,1 \pm 3$ ;  $39,8 \pm 0,5$  e  $46,2 \pm 2\%$ , respectivamente), comparado ao GC ( $23,3 \pm 2\%$ ),  $p < 0,001$ ). O grupo GGPH apresentou maior porcentagem de células na fase G1 que GGI ( $p < 0,001$ ) e GGNI ( $p < 0,01$ ). Não foram encontradas diferenças significativas na fase S entre os grupos GC, GGI, GGNI e GGPH ( $18,0 \pm 1,9$ ;  $16,8 \pm 3,1$ ;  $14,6 \pm 1,1$  e  $16,2 \pm 2,0\%$ , respectivamente). Os grupos GGI ( $44,3 \pm 3,4\%$ ) e GGNI ( $45,6 \pm 1,1\%$ ) apresentaram maior percentual de células em G2 / M que o GGPH ( $36,7 \pm 4,1\%$ ),  $p < 0,05$ .

### 3.5 BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS E DEFESA ANTIOXIDANTE NO TUMOR

A Figura 3.7 mostra os biomarcadores do estresse oxidativo e defesa antioxidante medidas nas células do TAE. Ambas as dietas (GGI e GGNI) causaram estresse oxidativo nas células tumorais, observado nos resultados da avaliação da peroxidação lipídica usando a metodologia TBARS ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), (3.7A). Uma redução no conteúdo de GSH ( $p < 0,001$ ) também foi observada nesses mesmos grupos (3.7C).



Figura 3.6 (A) Histograma e (B) porcentagem de células tumorais nas fases Sub-G1, G1, S e M do ciclo celular do TAE, dos animais tratadas com diferentes dietas por 80 dias, analisadas por citometria de fluxo.

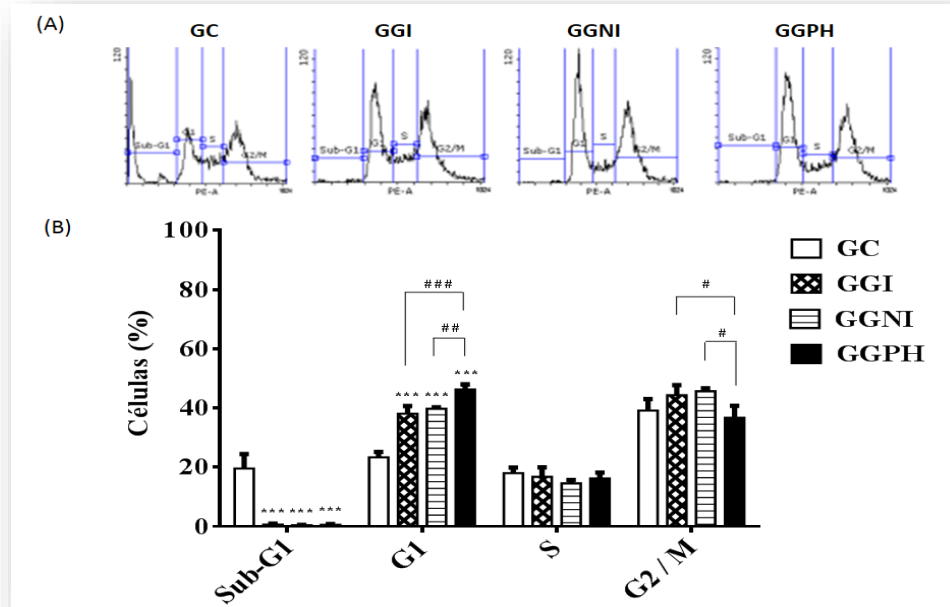
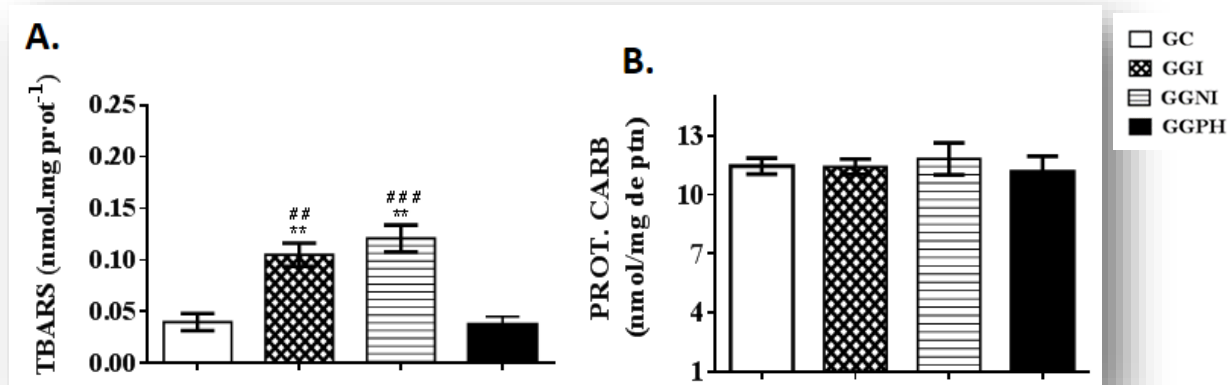


Figura 3.6 (A) Histograma e (B) porcentagem de células tumorais nas fases Sub-G1, G1, S e M do ciclo celular do TAE, dos animais tratadas com diferentes dietas por 80 dias, analisadas por citometria de fluxo (continuação).

Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 6. Os valores representam a média e o desvio padrão (A). GC: grupo controle; GGI: grupo gordura interesterificada; GGNI: grupo gordura não interesterificada; GGPH: grupo gordura parcialmente hidrogenada. Sub-G1: células em quiescência; G1: células que não apresentam duplicação de DNA; S: células apresentando conteúdo intermediário de DNA; G2 / M: células apresentando DNA duplicado. (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em relação ao GC quando  $p < 0,001$ . (#), (# #) e (# # #) denotam diferenças estatísticas comparando GGI, GGNI e GGPH ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

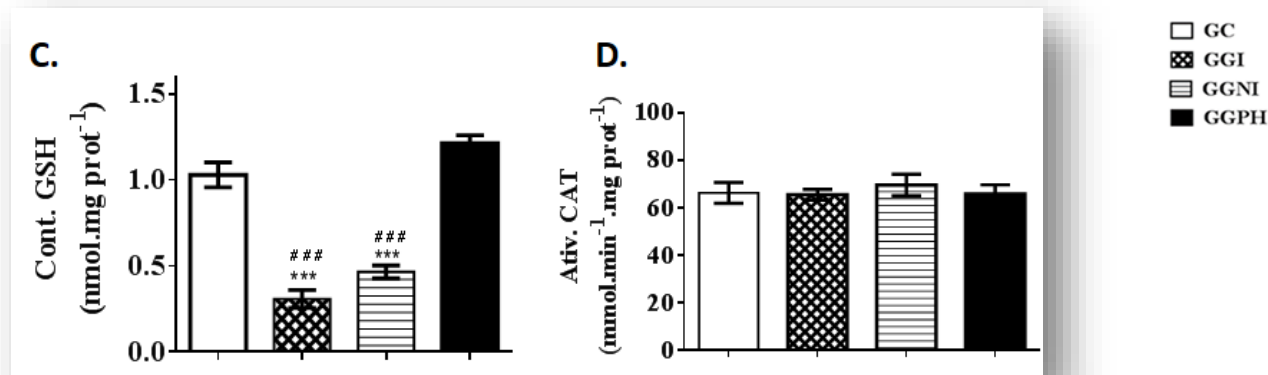


Figura 3.7 Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes medidas em células do TAE tratadas com diferentes dietas por 80 dias. (A) Níveis de peroxidação lipídica (TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (B) Marcador de dano proteico (Proteínas carboniladas) (C) Conteúdo de glutatona reduzida (GSH). (D) Atividade da enzima catalase.



Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ . GC: grupo controle; GGI: grupo gordura interesterificada; GGNI: grupo gordura não interesterificada; GGPH: grupo gordura parcialmente hidrogenada. (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em relação ao controle quando  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. (##) e (###) denotam diferenças estatísticas comparando GGI, GGNI e GGPH ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

Figura 3.7 Biomarcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes medidas em células do TAE tratadas com diferentes dietas por 80 dias. (A) Níveis de peroxidação lipídica (TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (B) Marcador de dano protéico (Proteínas carboniladas) (C) Conteúdo de glutatona reduzida (GSH). (D) Atividade da enzima catalase (continuação).



Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ . GC: grupo controle; GGI: grupo gordura interesterificada; GGNI: grupo gordura não interesterificada; GGPH: grupo gordura parcialmente hidrogenada. (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em relação ao controle quando  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. (# #) e (###) denotam diferenças estatísticas comparando GGI, GGNI e GGPH ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

#### 4. DISCUSSÃO

O consumo alimentar dos animais do GGNI foi superior ( $p < 0,001$ ) quando comparado aos demais grupos. Embora ambas as gorduras (GI e GNI) tenham sido elaboradas com a mesma mistura de óleos e gorduras, sabe-se que a interesterificação modifica as propriedades químicas e físicas da gordura e conseqüentemente sua funcionalidade no produto alimentício (MENSINK et al., 2016). A razão do GGNI apresentou-se quebradiça, causando perdas no momento do consumo. Por esta razão, não é possível afirmar que o consumo desse grupo foi maior que os demais grupos.

Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (GGI, GGNI e GGPH) apresentaram maior ganho de peso corporal ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo normolipídico (GC). Como já reportado, dietas ricas em gorduras podem induzir obesidade em humanos e roedores (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de dieta hiperlipídica, diferentemente do observado em outros experimentos, nos quais os animais que receberam gordura interesterificada apresentaram maior ganho de peso (GOUK et al., 2013; AFONSO et al., 2016) ou sua prole (MAGRI et al., 2015; VELASCO et al., 2015). O tempo de exposição à dieta contendo gordura interesterificada pode explicar essa divergência. Gouk et al. (2013) e Afonso et al. (2016) observaram maior ganho de peso após 15 e 16 semanas de tratamento, respectivamente. No presente estudo o tempo de exposição foi 10 semanas.

Quanto ao desenvolvimento do tumor, experimentos de modelos animais têm encontrado relação positiva entre o consumo de dietas hiperlipídicas com o câncer de mama. No estudo de Lamas et al. (2015), os autores relataram que uma dieta hiperlipídica (60% kcal) composta principalmente por banha, por 6 meses, estimulou o crescimento de câncer de mama humano ER (receptores de estrógenos) positivo, reduziu a expressão do hormônio receptor do tumor e diminuiu a citotoxicidade de células NK (do inglês, *Natural Killer*) em camundongos Balb-c atômicos nus implantados com MCF -7, células de câncer de mama. Em outro estudo, dieta rica em gordura (60% kcal) por 12 semanas promoveu angiogênese tumoral e progressão do câncer de mama, os autores sugerem que seja pelo aumento da massa de tecido adiposo e adipocinas como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GU et al., 2011). Neste estudo, apesar do menor tempo de experimento (11,4 semanas), quando comparado ao estudo de Lamas et al. (2015) e da menor proporção de lipídeos (40% kcal), podemos observar que o grupo que recebeu gordura

*trans* (GGPH) apresentou resultados similares ao grupo normolipídico (GC), quanto ao desenvolvimento do tumor.

Estudos anteriores relataram a associação do consumo de AGT com o desenvolvimento de câncer de mama (CHAJÈS et al., 2008; HIRKO et al., 2018; SEILER et al., 2018) e a redução da sobrevida em camundongos tumores ascítico de Ehrlich, alimentados com ácido elaidico (AWAD, 1981). No entanto, no presente estudo esta relação não foi evidenciada. Ao comparar os resultados dos grupos GC aos do GGPH podemos observar semelhanças, quanto ao desenvolvimento do tumor (%), sobrevida (%), percentual de células apoptóticas e biomarcadores do estresse oxidativo. Os resultados indicam que a maior sobrevida dos animais desses grupos se deu provavelmente pelo aumento da apoptose, confirmada pelo número de células na fase sub-G1 para o GC ( $p < 0,001$ ) e parada celular na fase G1 para o GGPH ( $p < 0,001$ ). A fase sub-G1 do ciclo celular corresponde à área de detritos e células mortas e a fase G1 à células sem duplicação de DNA (SAGAR; GREEN, 2009). A expressão da proteína p53, uma proteína pró-apoptótica, pode estar envolvida na parada celular na fase G1 (DIMRI, 2005). Li e cols. (2017) relataram em um estudo com células endoteliais de veia umbilical humana, que o ácido elaidico também aumentou o número de células apoptóticas e a população de células na fase G1. Além disso, os resultados dos marcadores de dano oxidativo e de defesas antioxidantes dos grupos GC e GGPH indicam que a apoptose observada nos animais destes grupos não foi ocasionada por estresse oxidativo das células tumorais.

A presença de ácido linolênico na GVPH pode ter tido algum efeito protetor, quanto ao desenvolvimento do tumor. Hirko et al. (2018) e Zanoaga et al. (2017) relataram associações inversas significativas de ácido linolênico com câncer de mama. Segundo Liu e Ma (2014) o ácido linolênico pode inibir o desenvolvimento do tumor mamário e alterar a composição dos ácidos graxos da membrana celular, o que pode inibir a produção de eicosanóides e influenciar a sinalização das vias transcripcionais para inibir a proliferação celular e induzir a apoptose.

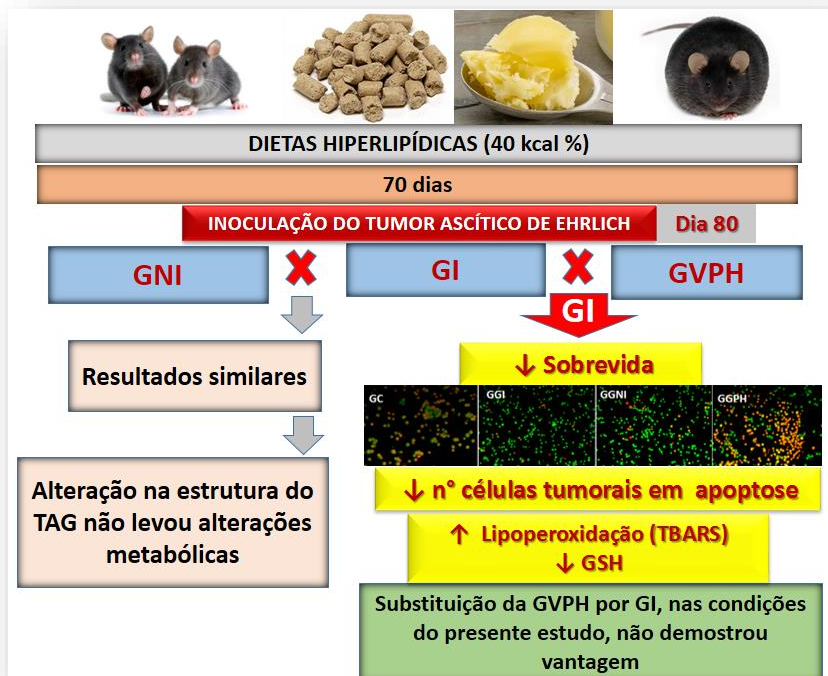
O desenvolvimento do tumor se deu de forma semelhante entre os animais dos grupos GGI e GGNI, em todos os parâmetros avaliados. Em comparação ao GC, esses grupos apresentaram menor sobrevida (20% a menos); menor percentual de células em apoptose (3 vezes menos) e consequentemente maior proporção de células tumorais viáveis. Contraditoriamente, os grupos GGI e GGNI apresentaram níveis elevados de peroxidação lipídica ( $p < 0,01$ ) e níveis depletados de glutathiona reduzida (GSH) ( $p < 0,001$ ). O estresse oxidativo observado nas células

tumorais não foi suficiente para prolongar a vida dos camundongos desses dois grupos.

O principal ácido graxo do GGI e GGNI é o ácido palmítico. Efeitos antitumorais e inibitórios da peroxidação lipídica já foram atribuídos ao ácido palmítico (BOUBAKER et al., 2018). Porém, estudos revelaram que elevadas quantidades de ácido palmítico estavam associadas a um risco aumentado de câncer de mama (MANCINI et al., 2015). Estudos mostraram que o ácido palmítico causa lipotoxicidade em vários tipos de células. A acumulação de ácido palmítico e seus metabólitos dentro das células produz lipotoxicidade o que pode levar a significativa disfunção celular e lesão (WEINBERG, 2006). Demonstrou-se que a lipotoxicidade envolve tanto o estresse de retículo endoplasmático quanto a morte celular apoptótica em células  $\beta$  pancreáticas (BEEHARRY et al., 2003), pré-adipócitos (GUO et al., 2007), cardiomiócitos (BORRADAILE et al., 2006), hepatócitos (GUO et al., 2007; ZHANG et al., 2011), neurônios (ALMAGUEL et al., 2009) e células de Sertoli (HU et al., 2018). Desta forma, sugere-se que ácido palmítico esteja envolvido na lipoperoxidação observada nos grupos GI e GNI. Possivelmente o estresse oxidativo seja generalizado, afetando assim, a defesa orgânica contra o câncer e contribuindo para o surgimento de comorbidades.

O resumo gráfico deste estudo está apresentado na Figura 3.8.

Figura 3.8 Resumo gráfico do estudo



Legenda: GI: gordura interesterificada; GNI: gordura não interesterificada; GVPH: gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

## 5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento tumoral se deu de forma similar entre os animais que receberam dieta com gordura interesterificada (GGI) e com gordura não interesterificada (GGNI). Ou seja, a presença de duas vezes mais AGS na posição *sn-2* dos TAG (GGI) não resultou em efeitos diferentes em todos os parâmetros avaliados.

O grupo que recebeu dieta contendo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, com AGT (20%) e ácido linolênico (6%) (GGPH) apresentou resultados semelhantes ao grupo que recebeu dieta normolipídica (GC), quanto ao desenvolvimento do tumor (%), percentual de células apoptóticas e biomarcadores do estresse oxidativo. A apoptose observada nesses grupos está relacionada ao número de células na fase sub-G1 para o GC e à parada celular na fase G1 para o grupo GGPH. A presença de ácido linolênico na GVPH pode ter apresentado efeito protetor no desenvolvimento do TAE.

Quando comparado ao GC, os grupos que receberam dieta contendo ácido palmítico (GGI e GGNI) apresentaram menor sobrevida, menor percentual de células apoptóticas, elevados níveis de peroxidação lipídica e conteúdo depletado de glutatona reduzida (GSH) nas células tumorais. Esses resultados indicam que o estresse oxidativo observado entre as células tumorais dos grupos GGI e GGNI não contribuiu para a sobrevida desses animais. A lipotoxicidade do ácido palmítico demonstrado para diversos tipos celulares pode ter contribuído para esses resultados. Assim, Destaca-se a necessidade de mais pesquisas *in vivo*.

Em suma, o percentual de gordura na dieta influenciou menos no desenvolvimento do TAE, do que o tipo de gordura utilizada; a quantidade aumentada de ácidos graxos saturados na posição *sn-2* dos TAG, ocasionada pela interesterificação, não afetou o desenvolvimento do tumor; dieta com ácido palmítico (gordura interesterificada) parece favorecer mais ao desenvolvimento do TAE do que dieta contendo ácidos graxos *trans* e ácido linolênico (gordura vegetal parcialmente hidrogenada). Mais estudos *in vivo* com gordura interesterificada são necessários para avaliar o potencial carcinogênico desta gordura, cujo consumo tem aumentado.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1984. v. 105p. 121–126.

AFONSO, M. S. et al. Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 32, p. 91–100, 2016.

ALFIERI, A. et al. Effects of plant oil interesterified triacylglycerols on lipemia and human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2018.

ALMAGUEL, F. G. et al. Activation and reversal of lipotoxicity in PC12 and rat cortical cells following exposure to palmitic acid. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 5, p. 1207–1218, abr. 2009.

AWAD, A. B. Trans fatty acids in tumor development and the host survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 67, n. 1, p. 189–192, 1981.

BEEHARRY, N. et al. Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 530, n. 1–2, p. 27–33, 2003.

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: An overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2009.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, p. 882–890, 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. [35] Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 299–305, 1984.



BORRADAILE, N. M. et al. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 12, p. 2726–2737, 2006.

BOUBAKER, J. et al. Antitumoral Potency by Immunomodulation of Chloroform Extract from Leaves of *Nitraria retusa*, Tunisian Medicinal Plant, via its Major Compounds  $\beta$ -sitosterol and Palmitic Acid in BALB/c Mice Bearing Induced Tumor. **Nutrition and Cancer**, v. 70, n. 4, p. 650–662, 2018.

BUETTNER R; SCHÖLMERICH J; BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.

CHAJÈS, V. et al. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC study. **American Journal of Epidemiology**, v. 167, n. 11, p. 1312–1320, 2008.

DANDAMUDI, A. et al. Dietary Patterns and Breast Cancer Risk: A Systematic Review. **Anticancer Research**, v. 38, n. 6, p. 3209–3222, 2018.

DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v.7, p. 505-512, 2005.

FASANO, E. et al. Long-chain n-3 PUFA against breast and prostate cancer: Which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2245–2262, 2017.

GHEBREYESUS, T. A.; FRIEDEN, T. R. REPLACE: a roadmap to make the world trans fat free by 2023. **The Lancet**, v. 391, n. 10134, p. 1978–1980, 2018.

GOUK, S.-W. et al. Stearic acids at sn-1, 3 positions of TAG are more efficient at limiting fat deposition than palmitic and oleic acids in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 07, p. 1174–1180, 29 abr. 2014.

GOUK, S. W. et al. Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 11, p. 1987–1995, 12 dez. 2013.

GU, J.-W. et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 10, p. 910–917, 15 maio 2011.

GUO, W. et al. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 2, p. E576–E586, 2007.

HIRKO, K. A. et al. Erythrocyte membrane fatty acids and breast cancer risk: a prospective analysis in the nurses' health study II. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 6, p. 1116–1129, 2018.

HU, X. et al. Effects of saturated palmitic acid and omega-3 polyunsaturated fatty acids on Sertoli cell apoptosis. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 00, n. 00, p. 1–13, 2018.

KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457–481, 2016.

LAMAS, B. et al. Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 1, p. 58–71, 2015.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 1990. v. 186p. 464–478.

LI, J. et al. Linolelaidic acid induces apoptosis, cell cycle arrest and inflammation stronger than elaidic acid in human umbilical vein endothelial cells through lipid rafts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 7, p. 1–10, 2017.

LIU, B. et al. Association between plasma trans-fatty acid concentrations and diabetes in a nationally representative sample of US adults. **Journal of Diabetes**, v. 10, n. 8, p. 653–664, 2018.

LIU, J.; MA, D. The Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 5184–5223, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAGRI, T. P. R. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 904–910, out. 2015.

MANCINI, A. et al. Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: Effects on health. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17339–17361, 2015.

MCGAHON, A. J. et al. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. **Methods in Cell Biology**, v. 46, n. C, p. 153–185, 1995.

MENSINK, R. P. et al. The Increasing Use of Interesterified Lipids in the Food Supply and Their Effects on Health. **Advances in Nutrition**, v. 7, p. 719–729, 2016.

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 7, p. 439–445, 16 ago. 1990.

MILLS, C. E.; HALL, W. L.; BERRY, S. E. E. What are interesterified fats and should we be worried about them in our diet? **Nutrition Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 153–158, 2017.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

MOODIE, R. et al. Non-Communicable Diseases 4 Profits and pandemics : prevention of harmful effects of tobacco , alcohol , and ultra-processed food and drink. **The Lancet**, v. 6736, n. 12, p. 1–10, 2013.

MOUBARAC, J. et al. Consumption of ultra-processed foods predicts diet quality in Canada. **Appetite**, v. 108, p. 512–520, 2017.

O'FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 2007.

RISÉRUS, U. Trans fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 161–165, 2006.

SAGAR, S.; GREEN, I. R. Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines. **Cancer Letters**, v. 285, n. 1, p. 23–27, 2009.

SCHULZ, M. et al. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 5, p. 942–946, 2008.

SEILER, A. et al. Obesity , Dietary Factors , Nutrition , and Breast Cancer Risk. **Current Breast Cancer**, v. 10, n. 1, p. 14–27, 2018.

SIERI, S. et al. Dietary fat intake and development of specific breast cancer subtypes. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 5, 2014.

STEELE, E. M. et al. Ultra-processed foods and added sugars in the US diet: Evidence from a nationally representative cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 6, n. 3, p. 1–8, 2016.

TURNER, L. B. A meta-analysis of fat intake, reproduction, and breast cancer risk: An evolutionary perspective. **American Journal of Human Biology**, v. 23, n. 5, p. 601–608, 2011.

VELASCO, P. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for trans fat in maternal diet can predispose obesity and inflammation in adult male offspring. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1, p. 29:754, 2015.

WEINBERG, J. M. Lipotoxicity. **Kidney International**, v. 70, n. 9, p. 1560–1566, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Replace trans fat Free 2018, 2018.

ZANOAGA, O. et al. Implications of dietary  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids in breast cancer (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 1167–1176, 2017.

ZHANG, Y. et al. Effect of  $\alpha$ -linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 122, 2011.

## CONCLUSÕES DA TESE

Considerando os resultados obtidos com as análises das gorduras modificadas utilizadas neste estudo foi possível observar que a gordura interesterificada disponível comercialmente, como era esperado, apresentou grande quantidade de ácidos graxos saturados, especialmente de cadeia longa, com destaque para o ácido palmítico; a interesterificação dobrou a quantidade de ácidos graxos saturados na posição *sn-2* dos triglicerídeos; a quantidade encontrada de ácidos graxos *trans* na gordura vegetal parcialmente hidrogenada foi consideravelmente inferior à relatada em estudos anteriores; essa mesma gordura apresentou ácido linolênico, tipo de ômega 3, em sua composição.

A gordura interesterificada não ocasionou maior ganho de peso ou maior depósito de gordura abdominal nos camundongos Balb-c, nem nos C57BL-6, quando comparada com as gorduras não interesterificada e parcialmente hidrogenada.

Os camundongos Balb-c que receberam gordura *trans* (GGPH) apresentaram resultados semelhantes ao grupo que recebeu dieta normolipídica, quanto aos parâmetros bioquímicos plasmáticos e biomarcadores do estresse oxidativo hepático, exceto pelo aumento do colesterol total. Os camundongos C57BL-6 do GGPH também apresentaram resultados semelhantes aos do GC, quanto ao crescimento do tumor (%), percentual de células apoptóticas e biomarcadores do estresse oxidativo. A única divergência encontrada diz respeito ao ciclo celular. Já os camundongos Balb-c que receberam dietas contendo ácido palmítico (GIE e GGNI) apresentaram aumentos significativos nos valores de colesterol total, não-HDL-c e glicose plasmáticos e uma resposta diferente quanto aos biomarcadores do estresse oxidativo hepático, em comparação com o PHFG. Por outro lado, os camundongos C57BL-6 alimentados com dietas ricas em ácido palmítico, apresentaram redução significativa na sobrevivência, menor percentual de células apoptóticas, elevados níveis de peroxidação lipídica e conteúdo depletado de glutatona reduzida (GSH) nas células tumorais, em comparação ao GC. Em suma, esses resultados indicam que o percentual de gordura na dieta não foi tão impactante quanto o tipo de gordura utilizada e que as dietas contendo ácido palmítico podem apresentar resultados mais deletérios para a saúde do que a dieta contendo AGT e ácido linolênico. Desta forma, substituir a GVPH por GI não representou benefício à saúde, quanto aos parâmetros aqui avaliados.

A modificação da estrutura dos triacilgliceróis causada pela interesterificação, não levou a alterações metabólicas distintas nos

camundongos Balb-c, nem afetou de forma diferente o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos C57BL-6. Desta forma, pode-se inferir que os resultados não tão favoráveis encontrados, relacionados ao consumo da gordura interesterificada utilizada neste estudo, estão relacionados à matéria-prima utilizada e não ao processo de interesterificação em si.

Os resultados sugerem a necessidade de cautela no uso de gorduras interesterificadas tais como esta utilizada neste estudo e a necessidade urgente de mais estudos *in vivo* com gorduras interesterificadas, especialmente em humanos.

## PERSPECTIVAS

Os resultados indicam necessidade de investigações mais detalhadas sobre as alterações metabólicas ocasionadas pela gordura interesterificada, com tempo maior de experimentação e utilização de camundongos machos e mais estudos em humanos.

Investigar melhor os efeitos do consumo dessa gordura sobre o metabolismo de lipídios e glicose, respostas inflamatórias e parâmetros hemostáticos.

Uma vez que foi observado aumento da GSH destaca-se a necessidade de maiores investigações sobre as alterações metabólicas que possam estar relacionadas.

Continuar estudando outros tipos de gorduras interesterificadas, formuladas com menor quantidade de AGS e de ácido palmítico.

No estudo do desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich investigar no líquido ascítico as atividades das enzimas Gr e GPx e também o perfil lipídico e inflamatório.

Realizar pesquisa semelhante com gorduras também usadas em produtos de panificação e confeitaria, tais como manteiga e banha.