

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental

**Avaliação do efeito dos ácidos graxos *trans*
sobre o perfil dos lipídios teciduais de ratos
que consumiram diferentes teores de ácidos
graxos essenciais.**

Céphora Maria Sabarense

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Jorge Mancini Filho

São Paulo
2003

CÉPHORA MARIA SABARENSE

**Avaliação do efeito dos ácidos graxos
trans sobre o perfil dos lipídios
teciduais de ratos que consumiram
diferentes teores de ácidos graxos
essenciais.**

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
(Orientador/Presidente)

Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa

Profa. Dra. Ana Maria Pita Lottenberg

Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Porf. Dr. Luiz Antônio Gioielli

São Paulo
26 de junho de 2003

SUMÁRIO

	pág
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 HIDROGENAÇÃO	03
2.2 HIDROGENAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE	07
2.3 CONSUMO.....	08
2.4 ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i>	10
2.5 ÁCIDOS GRAXOS TRANS E O METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS	12
2.6 METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i>	16
2.6.1 β - OXIDAÇÃO	18
2.6.2 DESSATURAÇÃO E ALONGAMENTO	18
2.7 INCORPORAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> NOS TECIDOS	23
2.7.1 ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> E OS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS	26
2.8 ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> E MEMBRANAS	28
2.9 ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> E FOSFOLÍPIDIOS DAS MEMBRANAS MITOCONDRIAIS	30
2.9.1 FOSFATIDILCOLINA	31
2.9.2 FOSFATIDILETANOLAMINA	32

2.9.3 CARDIOLIPINA	33
2.10 ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i>	36
2.10.1 ANÁLISE DOS FOSFOLIPÍDIOS	39
2.11 OUTRAS CONSIDERAÇÕES	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 ANIMAIS	41
4.2 ENSAIOS	41
4.2.1 ENSAIO 1	41
4.2.2 ENSAIO 2	41
4.2.3 ENSAIO 3	42
4.3 RAÇÕES	42
4.4 ANÁLISE DOS LIPÍDIOS	43
4.4.1 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS	43
4.4.2 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS	45
4.4.3 ANÁLISE DOS ÉSTERES METÁLICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS	46
4.4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	46
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 PESO DOS ANIMAIS	52
5.1.1 ENSAIO 1	52

5.1.2 ENSAIO 2	53
5.1.3 ENSAIO 3	54
5.2 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS TECIDOS	58
5.2.1 TECIDO ADIPOSEO	59
5.2.2 PLASMA	66
5.2.3 TECIDO CEREBRAL	71
5.2.4 TECIDO CARDÍACO	77
5.2.5 FOSFOLÍPIDOS DO CÉREBRO E DO CORAÇÃO	81
5.2.5.1 FOSFATIDILETANOLAMINA	86
5.2.5.2 FOSFATIDILCOLINA	89
5.2.4.3 CARDIOLIPINA	97
5.2.6 TECIDO HEPÁTICO	97
5.2.6.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	103
6 CONCLUSÕES	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS DE 18 CARBONOS COM ISOMERIA GEOMÉTRICA <i>cis</i> E <i>trans</i>	04
FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS OLÉICO, ELAÍDICO E ESTEÁRICO COM SEUS RESPECTIVOS PONTOS DE FUSÃO	05
FIGURA 3 - ESQUEMA DA DESSATURAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS N-9, N-6 E N-3	19
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA FOSFATIDILCOLINA	31
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA FOSFATIDILETANOLAMINA	33
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CARDIOLIPINA	34
FIGURA 7 - EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS DO ENSAIO 1	53
FIGURA 8 - EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS DO ENSAIO 2	54
FIGURA 9 - EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS DO ENSAIO 3	55
FIGURA 10 - DEPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> NOS FOSFOLÍPIDIOS DO TECIDO CARDÍACO	85
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO EXTRATO LIPÍDICO DE TECIDO HEPÁTICO	104
FIGURA 12 - ESPECTRO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE EXTRATO LIPÍDICO DE TECIDO HEPÁTICO	105
FIGURA 13 - ESPECTRO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE EXTRATO LIPÍDICO DO TECIDO HEPÁTICO COM TODOS OS SINAIS IDENTIFICADOS NO CÁLCULO DO PERCENTUAL TOTAL DOS ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i>	108

LISTA DE QUADROS

	pág.
QUADRO 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS DOS EXPERIMENTOS	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES	42
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL APROXIMADA DAS DIETAS DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL	50
TABELA 3 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS DIETAS CONTROLE E EXPERIMENTAIS E SUAS RESPECTIVAS FONTES LIPÍDICAS	51
TABELA 4 - GANHO DE PESO E COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 2 E 3	56
TABELA 5 - TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> INCORPORADOS NOS TECIDOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 1, 2 E 3 EXPRESSOS EM % DA FRAÇÃO LIPÍDICA	58
TABELA 6 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 1, 2 E 3	62
TABELA 7 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO PLASMA DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 1, 2 E 3	68
TABELA 8 - PERFIL DE ÁCIDOS DO TECIDO CEREBRAL DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 1, 2 E 3	79
TABELA 9 - PERFIL DE ÁCIDOS DO TECIDO CARDÍACO DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 1, 2 E 3	82
TABELA 10 - PERFIL DE ÁCIDOS DA CARDIOLIPINA DAS MITOCÔNDRIAS DOS TECIDOS CARDÍACO E CEREBRAL DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 1	85
TABELA 11 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA FOSFATIDILETANOLAMINA DO TECIDO CARDÍACO DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 2 E 3	87
TABELA 12 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA FOSFATIDILCOLINA DO TECIDO CARDÍACO DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 2 E 3	91

TABELA 13 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA CARDIOLIPINA DO TECIDO CARDÍACO DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 2 E 3	94
TABELA 14 - PERFIL DE ÁCIDOS DO TECIDO HEPÁTICO DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS 1, 2 E 3	98
TABELA 15 - PORCENTAGEM (%) DE ÁCIDO ELAÍDICO DO EXTRATO DE TECIDO HEPÁTICO IDENTIFICADO POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	106
TABELA 16 - PERCENTUAL (%) DO TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS <i>trans</i> DO EXTRATO DE TECIDO HEPÁTICO IDENTIFICADO POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	108

RESUMO

Os ácidos graxos *trans* competem com os ácidos graxos essenciais inibindo as enzimas envolvidas na síntese dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. Quantidades adequadas de ácidos graxos essenciais na dieta minimizam este efeito. No entanto, pouco se conhece da ação dos isômeros *trans*, sob condições de restrição ou deficiência dietética dos ácidos graxos essenciais, sobre o percentual de deposição tanto dos próprios isômeros *trans*, como dos ácidos graxos polinsaturados nos lipídios dos tecidos. Foram avaliadas dietas ricas em ácidos graxos *trans* e com diferentes concentrações de ácidos graxos essenciais em ratos. A incorporação de ambos foi proporcional à concentração na dieta, mas variou entre os tecidos estudados. Verificou-se que as quantidades de ácidos graxos *trans* incorporadas pelo tecido adiposo foi a maior, enquanto que o cérebro incorporou a menor quantidade. A despeito da incorporação dos ácidos graxos *trans*, o perfil de ácidos graxos do cérebro manteve-se estável em relação às variações dietéticas. Não se observou acúmulo dos ácidos graxos *trans* em função do prolongamento do consumo da dieta. Os ácidos graxos essenciais incorporados aos tecidos também foram modulados pela dieta, e em concentrações adequadas influenciaram na menor deposição dos isômeros *trans* no tecido adiposo, plasma e tecido cardíaco. Avaliando-se a composição dos ácidos graxos nos fosfolipídios do tecido cardíaco, observou-se que a fosfatidiletanolamina incorporou a maior porcentagem dos isômeros *trans* seguida da fosfatidilcolina e da cardiolipina, respectivamente. Embora tenha incorporado quantidades intermediárias dos ácidos graxos *trans* a fosfatidilcolina teve uma maior alteração no perfil de ácidos graxos em comparação aos demais. A reduzida concentração de ácidos graxos *trans* incorporados na cardiolipina das mitocôndrias e no cérebro sugere a existência de um mecanismo protetor para a manutenção da composição lipídica necessária às atividades funcionais.

ABSTRACT

Trans fatty acids compete with essential fatty acids inhibiting the enzymes of the long chain polyunsaturated fatty acids synthesis. Appropriate amounts of dietary essential fatty acids minimize this effect. However, little is known about the action of *trans* isomers on the deposition percentage of these own *trans* isomers itself or as polyunsaturated fatty acids in tissue lipids, when under dietary restriction or deficiency conditions of essential fatty acids. Diets high in *trans* fatty acids and with different concentrations of essential fatty acids were assessed. The incorporation of *trans* isomers and of essential fatty acids was proportional to their dietary concentration, but varied among the tissues studied. It was verified that the adipose tissue incorporated the largest amount of *trans* fatty acids while the brain incorporated the smallest. In spite of the *trans* fatty acids incorporation, the profile of brain fatty acids was maintained stable in relation to dietary variations. No accumulative deposition of *trans* fatty acids was observed in relation to extended length of time of dietary consumption. Essential fatty acids incorporated in tissues were also modulated by diet and in moderate concentrations influenced the lower deposition of *trans* isomers in adipose tissue, blood plasma and heart. By assessing fatty acids composition in phospholipids of heart, it was verified that phosphatidylethanolamine incorporated the largest percentage of *trans* isomers followed by phosphatidylcholine and cardiolipin, respectively. Phosphatidylcholine presented the greatest change in fatty acids profile when compared to the others phospholipids, although incorporating intermediate amounts of *trans* isomers. The reduced concentration of *trans* fatty acids incorporated in cardiolipin and brain suggests that there is a protector mechanism for maintenance of the lipids composition required for functional activities.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de lípidos e seus efeitos sobre a saúde humana têm sido na atualidade um dos principais pontos de interesse da pesquisa em nutrição.

O homem apareceu há milhões de anos. A seleção genética e a adaptação foram influenciadas em grande parte pela disponibilidade de alimentos. A agricultura começou a produzir mudanças na dieta há cerca de 10.000 anos e talvez tenha sido a modificação mais drástica do padrão alimentar na evolução humana. Somente a partir da Revolução Industrial e particularmente nos últimos 150 anos, maiores mudanças ocorreram tanto na quantidade, como no tipo de gordura consumida (LICHENSTEIN, 1999).

Dentre as principais mudanças, destacam-se a maior eficácia na extração de óleos vegetais e a descoberta do processo de hidrogenação. Este tornou possível a produção de uma gordura vegetal, que se mantém sólida à temperatura ambiente, para substituir as gorduras de origem animal. Por conseguinte, ocasionou um aumento de isômeros geométricos (ácidos graxos *trans*) e isômeros de posição (ácidos graxos *cis*) na alimentação humana (SIMOPOULOS, 1996).

A popularização do processo de hidrogenação ocorreu com o desenvolvimento da margarina. No entanto, a maior parte dos isômeros *trans* consumidos não é necessariamente veiculada pelas margarinas, mas por meio de óleos vegetais parcialmente hidrogenados utilizados pela indústria de alimentos (SEMMA, 2002).

Os primeiros estudos relacionando modificações na estrutura molecular dos lípidos com alterações nos seus efeitos biológicos e conseqüentemente sobre a saúde dos indivíduos foram realizados por SPRITZ & MISHKEL (1969). Apesar disso, o papel dos ácidos graxos *trans* no metabolismo humano ainda não está completamente estabelecido (MANCINI FILHO, 2001).

Evidências experimentais e estudos epidemiológicos sugerem que o consumo elevado desses ácidos graxos através da dieta pode induzir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MEIJER, 2001).

Os ácidos graxos *trans* são ainda um campo fértil para a pesquisa, considerando que muitas controvérsias ainda persistem quanto à estimativa de consumo, metabolismo, métodos de análise e os efeitos dos ácidos graxos na fisiologia e metabolismo humano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HIDROGENAÇÃO

No processo de hidrogenação, o óleo aquecido é exposto sob pressão ao hidrogênio em presença de um catalisador, em geral o níquel. Este composto é agitado para dispersar o hidrogênio no óleo e produzir uma mistura uniforme entre o catalisador e o óleo. O resultado da incorporação do hidrogênio pelas duplas ligações dos ácidos graxos é uma mudança do estado líquido para o estado semi-sólido e uma maior estabilidade oxidativa do produto (McDONALD & MOSSOBA, 1995).

O conteúdo de ácido α -linolênico (C18:3) no óleo de soja causa instabilidade e contribui para o ranço oxidativo. Com o processo de hidrogenação sua concentração é diminuída. Três modificações ocorrem na molécula: 1) a dupla ligação pode ser modificada para uma ligação simples 2) a localização da dupla pode se movimentar ao longo da molécula do ácido graxo e/ou 3) a configuração *cis* da dupla ligação poderá passar para uma configuração *trans* (SIMOPOULOS, 1996).

O óleo de soja é um dos óleos mais empregados para a hidrogenação. Durante o processo de hidrogenação, o conteúdo de ácido linoléico C18:2 9c,12c é reduzido e são produzidos o ácido oléico C18:1 9c, o ácido elaídico C18:1 9t e o ácido esteárico C18:0 (ACKMAN & MAG, 1998).

A **Figura 1** apresenta estruturas de ácidos graxos monoinsaturados com 18 átomos de carbono com isomeria geométrica *cis/trans*.

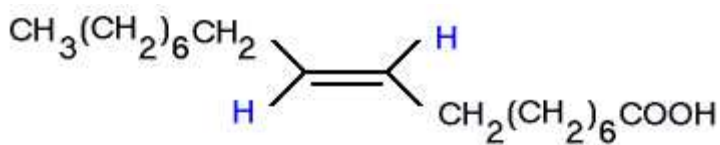
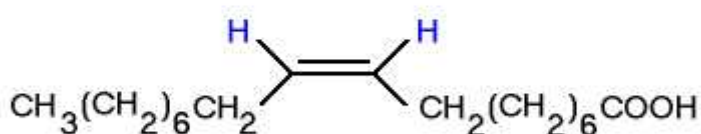
**Ácido eláidico****C18:1 9 *t*****Ácido oléico****C18:1 9 *c***

Figura 1 – Estrutura química dos ácidos graxos com 18 átomos de carbono com isomeria geométrica *cis* e *trans*. Na estrutura *cis*, os átomos de hidrogênio da dupla ligação encontram-se do mesmo lado da molécula, enquanto que na estrutura *trans* estão em lados opostos.

O ácido oléico possui uma dupla ligação na configuração *cis*, onde os dois átomos de hidrogênio encontram-se no mesmo plano na dupla ligação. Esta disposição dos átomos de hidrogênio introduz uma “dobra” na molécula, dificultando a formação de cristais, o que explica porque os óleos são líquidos à temperatura ambiente. Já no ácido eláidico, os átomos de hidrogênio correspondentes à dupla ligação, apresentam-se em lados opostos (**Figura 1**), tornando o empacotamento da molécula mais facilitado, apresentando característica física semelhante às gorduras saturadas, por isso a sua presença em misturas solidifica a gordura à temperatura ambiente. As propriedades adquiridas pelos ácidos graxos em função da presença da estrutura espacial *trans* estão entre as propriedades dos ácidos graxos saturados e a dos ácidos

graxos insaturados *cis* e, como resultado, tem-se um ponto de fusão intermediário, tornando a mistura semi-sólida (**Figura 2**).

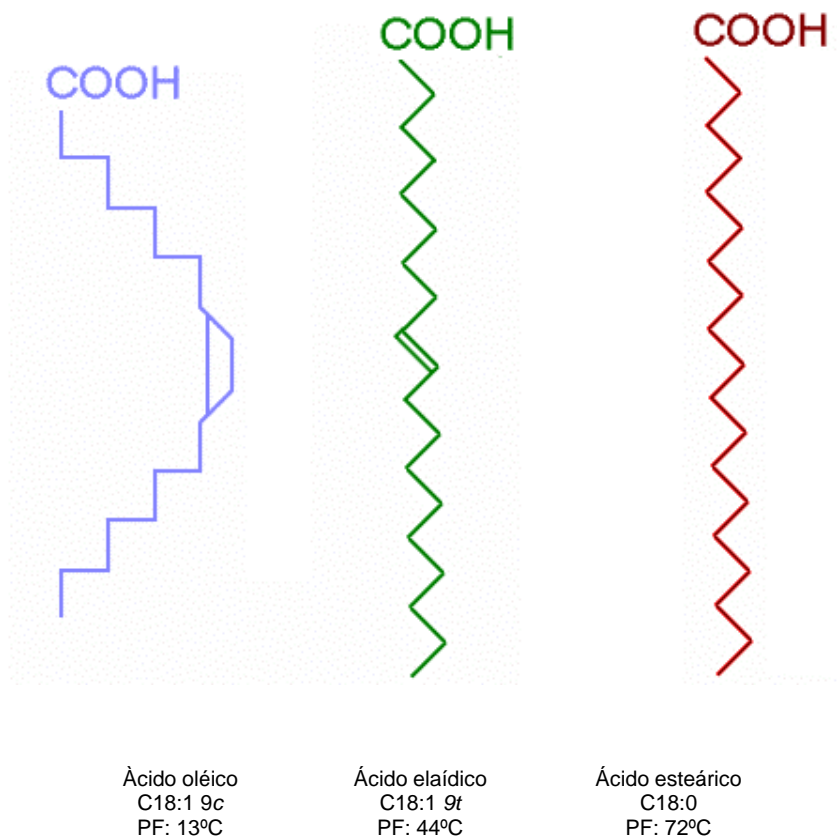


Figura 2 – Estruturas dos ácidos oléico, elaídico e esteárico com seus respectivos pontos de fusão.

Outros ácidos graxos *trans* monoinsaturados são formados durante a hidrogenação pela modificação da posição da insaturação ao longo da molécula e na maioria das vezes comportam-se biologicamente como o ácido elaídico (SIMOPOULOS, 1996).

Além do ácido oléico e do ácido elaídico, é também formado como resultante do processo de hidrogenação, porém em pequenas quantidades, o ácido esteárico, um ácido graxo saturado.

A modificação nas propriedades físico-químicas dos óleos permite que os mesmos sejam utilizados como matéria prima para elaboração de gordura para frituras, margarina e gorduras técnicas (“*shortenings*”). Estes são fundamentais na produção de biscoitos e bolos, entre outros produtos de panificação, conferindo-lhes maciez.

A concentração de ácidos graxos *trans* varia com a extensão e o tipo de processamento do óleo. Geralmente, margarinas contêm menor concentração de ácidos graxos *trans* do que as gorduras técnicas. Um dos fatores envolvidos nesta variabilidade é a escolha dos ingredientes. No Brasil, as misturas de óleos mais comuns para hidrogenação contêm óleo de soja, de palma e de algodão e o conteúdo total de isômeros *trans* nas margarinas varia de 12,3 a 38,1%, nos cremes vegetais de 15,9 a 25,1% e nas gorduras técnicas de 30 a 40% (BLOCK & BARRERA-ARELLANO, 1994).

Em estudo mais recente, BASSO, ALMEIDA-GONÇALVES & MANCINI-FILHO (1999) verificaram que os teores de ácidos graxos *trans* das gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas variam de 10% a 50% e argumentam que tal variação está relacionada aos óleos empregados no processamento. O óleo de soja é o mais utilizado no Brasil, quando escasso o óleo de milho ou o de algodão são os seus principais substitutos; dificultando, deste modo, a padronização do perfil de ácidos graxos *trans* nas gorduras e nos alimentos que utilizam a gordura hidrogenada como matéria prima.

Durante o processo de hidrogenação, a isomerização dos ácidos graxos insaturados reduz proporcionalmente as concentrações de ácidos graxos essenciais. No entanto, a mistura de óleos hidrogenados e não hidrogenados promove aumento no ponto de fusão e uma funcionalidade que contribuem para elevar o nível de ácidos graxos polinsaturados e reduzir o teor de ácidos graxos *trans* (ACKMAN & MAG, 1998). Considerando-se, portanto, uma alternativa para a produção de margarinas com menos isômeros *trans*.

Outros fatores que determinam a composição em ácidos graxos das gorduras são as condições empregadas durante o processo de hidrogenação.

Seletividade é o termo utilizado para descrever as condições utilizadas. Quando a seletividade é baixa forma-se um pouco ou quase nenhum ácido graxo *trans*, porque todos os ácidos graxos são hidrogenados na mesma proporção. Contudo, forma-se um produto rico em ácido esteárico, isto é, muito saturado e com um ponto de fusão muito alto. Quando condições de alta seletividade são utilizadas, tais como aumento da temperatura, limitação da quantidade de hidrogênio, redução da pressão e agitação e aumento da concentração do catalisador, os ácidos graxos contendo mais de duas duplas ligações são hidrogenados primeiro promovendo a modificação desejada, todavia com diminuta formação de ácido esteárico (McDONALD & MOSSOBA, 1995).

A seletividade pode influenciar na formação de ácido graxo *trans* ou isômeros de posição e que por razões de funcionalidade são desejáveis. No entanto, sob o ponto de vista nutricional muito se tem debatido a respeito dos efeitos que os mesmos podem causar ao organismo.

2.2 HIDROGENAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE

Variações nos procedimentos de hidrogenação produzirão misturas de isômeros *trans* diferentes nas posições das duplas ligações ao longo da cadeia de carbono das moléculas de ácidos graxos (EMKEN, 1995).

O uso do óleo de peixe para hidrogenação, comum em alguns países da Europa e América do Sul, para produção de margarinas e gorduras técnicas mais baratas (MORGADO e col., 1999), resultará em ácidos graxos *trans* de cadeias com 20 e 22 átomos de carbono ao invés de 18 átomos predominantes nos óleos vegetais hidrogenados (EMKEN, 1995).

Além disso, os óleos marinhos contêm uma concentração elevada de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa n-3, a maioria deles com 5 e 6 duplas ligações, dentre os quais o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) estão presentes em maior concentração. Estes ácidos graxos são também suscetíveis à oxidação, a qual pode ser reduzida pelas condições de hidrogenação seletiva que promovem uma maior

estabilidade ao óleo, embora ocorra a formação de uma maior variedade de isômeros, quando comparado com os óleos vegetais hidrogenados, principalmente o de soja (ACKMAN & MAG, 1998).

2.3 CONSUMO

Os ácidos graxos *trans* são encontrados no leite, carne e gordura de mamíferos ruminantes, resultantes da biohidrogenação de ácidos graxos polinsaturados por bactérias do rúmen. O mais comum é o ácido *trans*-vacênico, 18:1 11-*t* que em geral apresenta-se nas concentrações de 2 a 7% (PRECHT & MOLKENTIN, 1996).

Embora o consumo destes isômeros possa ocorrer pela ingestão de produtos lácteos ou que contenham gordura e carne de origem bovina e/ou caprina, foi com a maior variedade de produtos à base de gordura parcialmente hidrogenada no mercado que então, se verificou um aumento no consumo de ácidos graxos *trans* (BAYARD, 1995).

Outra razão para o aumento no consumo dos isômeros, nos primeiros anos da década de 30, foi a tendência em substituir a manteiga e outros produtos animais pela margarina (fonte mais importante de ácidos graxos *trans*), principalmente por pessoas que tiveram algum comprometimento coronário, como por exemplo, angina ou infarto do miocárdio (KRIS-ETHERTON & YU, 1997).

Estima-se que o consumo nos EUA varie de 2,6 g/dia a 12,8 g/dia (FELDMAN, KRIS-ETHERTON, KRITHEVISKY *et al.*, 1996) da gordura dietética diária e no Canadá de aproximadamente 8 g/dia (RATNAYAKE, PELLETIER, HOLLYWOOD, *et al.*, 1998). Já na Europa apresenta-se um valor menor, estimado entre 0,1 g/dia a 5.5 g/dia (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2001). A diminuição no consumo destes isômeros na Europa vem ocorrendo desde que foram descritos efeitos desfavoráveis em relação aos ácidos graxos *trans* da dieta sobre as lipoproteínas séricas (KATAN, ZOCK & MENSINK, 1995) e as possíveis associações destes com doenças cardíacas coronarianas.

No Japão, foi estimado um consumo *per capita* de 1,56 g/dia. É um valor baixo quando comparado com os dados das demais regiões, o que se justifica pelos hábitos alimentares tradicionais da população japonesa (SEMMA, 2002).

Num estudo multicêntrico realizado na Europa (“*TRANSFAIR Study*”) envolvendo 14 países, foram coletadas e analisadas, no período de 1995 a 1996, amostras de alimentos que corresponderiam a 95% do total de gordura ingerida de cada país. Os resultados indicaram que o consumo de ácidos graxos *trans* através da margarina é menor, uma vez que há uma tendência em reduzir as concentrações destes ácidos graxos *trans*, substituindo-os por ácidos graxos saturados com 12 a 16 carbonos na cadeia e/ou por ácidos graxos insaturados *cis* (ARO, VAN AMELSCOORT, BEEKER *et al.*, 1999; VAN POPPEL, VAN ERP-BAART, LETH *et al.*, 1999).

No Canadá, também foi observada esta redução. Apenas 11% do total de isômeros *trans* consumidos são derivados de margarinas. O maior consumo, portanto, tem origem nas gorduras “invisíveis” dos produtos de panificação e alimentos do tipo “*fast food*” (RATNAYAKE, PELLETIER, HOLLYWOOD, *et al.*, 1998).

Estas estimativas são controvertidas, pela falta de padronização das técnicas de coleta de informação da ingesta (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2001), técnicas de análise e as próprias variações individuais e populacionais (WOLFF, COMBE, DESTAILLATS, *et al.* 2000).

Entretanto o tecido adiposo é um importante indicador do consumo de ácidos graxos *trans*. O “*turnover*” dos ácidos graxos neste tecido é de aproximadamente 3 anos, possibilitando desta maneira, uma avaliação do consumo em longo prazo (BEYNEN, HERMUS & HAUTUAST, 1980; MOORE, ALFIN-SLATER & AFTERGOOD, 1980).

GARLAND, SACKS, COLDITZ *et al.* (1998) estudando o tecido adiposo subcutâneo, aspirado de 197 participantes do “*Nurses’ health study*”,

verificaram que foram incorporados ácidos graxos polinsaturados e ácidos graxos *trans* provenientes da dieta.

Utilizando a composição em ácidos graxos do tecido adiposo de mulheres francesas como indicador bioquímico do consumo “exógeno” de ácidos graxos *trans*, BOUÉ, COMBE, BILLEUAUD *et al.* (2000) observaram que o C18:1 11 *trans* (ácido *trans* vacênico) foi o de maior concentração entre os isômeros identificados. Este isômero é, freqüentemente, encontrado em gorduras de ruminantes. Como resultado de uma estimativa, num estudo de correlação, foi verificado que 55% dos isômeros *trans* são oriundos da gordura de ruminantes e os outros 45% do consumo de gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas. Este padrão é contrário aos valores identificados nos Estados Unidos e no Canadá, que têm como maior fonte de ácidos graxos *trans* os óleos vegetais parcialmente hidrogenados dos produtos de panificação, alimentos do tipo “*fast food*” e salgadinhos para coquetel (RATNAYAKE, PELLETIER, HOLLYWOOD, *et al.*, 1998; ELIAS & INNIS, 2002).

Tanto em estudos com animais, bem como em humanos, os ácidos graxos *trans* da dieta são digeridos, absorvidos e incorporados em triacilgliceróis plasmáticos, ésteres de colesterol, fosfolipídios, lipoproteínas, tecidos e plaquetas da mesma maneira que os seus correspondentes *cis*. No entanto, há ainda uma grande controvérsia entre os estudos com ácidos graxos *trans* que propõem estabelecer não somente relações causais com doenças, mas também identificar as concentrações que poderiam ser consideradas impróprias (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2001).

2.4 ÁCIDOS GRAXOS *trans*

Há uma relação entre a concentração de ácidos graxos saturados da dieta e a aterogênese (NICOLOSI, 1997; ASCHERIO & WILLET, 1997; HU, STAMPFER, MANSON *et al.*, 1999). A concentração do colesterol sanguíneo aumenta duas vezes quando o consumo de ácidos graxos saturados é maior do

que o consumo de ácidos polinsaturados. Já os ácidos graxos monoinsaturados têm um efeito hipocolesterolêmico intermediário (KRIS-ETHERTON & YU, 1997).

Os ácidos graxos *trans* possuem semelhanças nas suas propriedades físicas com as dos ácidos graxos saturados (SIMOPOULOS, 1995), mas com efeitos biológicos diferentes. Neste sentido, estudos epidemiológicos foram conduzidos a fim de verificar se o consumo de ácidos graxos *trans* e as alterações dos níveis séricos de lipídios poderiam ter relação com o risco de aterogênese (MANN, 1994). As evidências mais diretas desta relação foram detectadas em um estudo prospectivo realizado com mulheres americanas para avaliar o consumo de nutrientes o “*Nurses’ Health Study*” no qual foi detectada uma relação linear entre a estimativa de energia consumida de ácidos graxos *trans* e o risco de doença coronariana (ALLISON, 1993).

Um outro estudo foi realizado em 10 centros da Europa (*EURAMIC Study*) que avaliou a presença de C18:1*t* em homens que haviam sobrevivido ao primeiro infarto do miocárdio. Os resultados não foram unânimes entre os centros, não encontrando evidências convincentes de que os ácidos graxos *trans* são mais uma causa importante para a doença coronariana cardíaca, embora seja possível que em níveis elevados de consumo eles interajam com outros fatores de risco da doença (ALLISON, 1995; ASCHERIO, HENNEKENS, BURNING *et al.*, 1995).

Utilizando os mesmos questionários do “*The Nurses’ Health Study*” coletados no ano de 1984 HU, STAMPER, MANSON *et al.* (1999) demonstraram que o consumo de ácido α -linolênico tem uma ação protetora contra o infarto do miocárdio e, ainda, atenua os efeitos do risco causado pelos ácidos graxos *trans*, confirmando dados encontrados experimentalmente.

Embora tais resultados tenham apresentado uma correlação positiva entre os isômeros *trans* e o risco de enfarto do miocárdio, uma crítica deve ser feita: o consumo foi estimado através de questionários de frequência alimentar

e as concentrações dos ácidos graxos foram calculadas utilizando tabelas de composição química de alimentos (*USDA handbook no. 8*), com uma lacuna de quase duas décadas entre os questionários e os resultados obtidos dos cálculos. Outro fator de relevância é que os dados de composição obtidos por essas tabelas não são os mais adequados, uma vez que neste período a cromatografia gasosa ainda não havia sido considerada como um método adequado para estas análises, pois até então, utilizavam-se colunas empacotadas com menor definição do que as colunas capilares longas que começaram a ser utilizadas somente a partir de 1995 (HU, MANSON, WILLET, 2001).

Conquanto, em estudo mais recente, BAYLIN, KABAGAMBE, ASCHERIO *et al.* (2003) demonstraram que o total de ácidos graxos *trans* do tecido adiposo tem uma correlação positiva com o infarto do miocárdio. Todavia o ácido graxo com maior efeito foi o C18:2 *trans* e que o C18:1 *trans* não apresentou nenhuma correlação. Portanto, somente quando for esclarecido exatamente qual ou quais ácidos graxos têm influência efetiva no desenvolvimento de doenças cardíacas as recomendações diárias máximas poderão ser identificadas.

2.5 ÁCIDOS GRAXOS *trans* E O METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

Os ácidos graxos por sua natureza hidrofóbica necessitam de lipoproteínas para tornar possível o seu transporte através dos fluidos e tecidos dos organismos.

A gordura da dieta é absorvida sob a forma de ácidos graxos e monoacilgliceróis, estes são reesterificados a triacilgliceróis nos enterócitos, os quais são levados até os tecidos periféricos pelos quilomícrons. Durante a

passagem dos quilomícrons remanescentes pelo plasma são formadas as LDL (lipoproteínas de baixa densidade) que levarão o colesterol ao fígado. Este processo ocorre por endocitose através de receptores de LDL. Quando a concentração destes receptores está diminuída, a LDL se acumula no plasma; aumentando, assim, o risco de ocorrência de doença cardíaca coronariana. O colesterol e os ácidos graxos saturados causam o aumento da LDL porque diminuem a atividade do receptor, que é sensível à ação direta de algum nutriente específico ou de efeitos genéticos (LÖI e *col.*, 2000).

O colesterol é considerado o maior intermediário entre as gorduras da dieta e as doenças cardíacas coronarianas (KATAN, 2000). Os dados experimentais do efeito hipercolesterolemizante do ácido graxo *trans* em relação ao seu correspondente *cis*, segundo MENSINK & KATAN (1990), é que eles elevam a concentração de LDL num grau semelhante aos ácidos graxos saturados. Por outro lado, diferentemente de outras gorduras, os isômeros *trans* diminuem também as concentrações de HDL - lipoproteína de alta densidade (DENKE, 1995; DIETSCHY, 1995).

A HDL atua primeiramente na remoção do excesso de colesterol dos tecidos periféricos, levando-o para o fígado para ser excretado. O mecanismo responsável pela captação hepática do colesterol transportado pela HDL pode estar relacionado com a CETP (*colesteril-ester transferase*), que atua transferindo o colesterol esterificado da HDL para a LDL e VLDL as quais serão captadas pelos receptores da LDL no fígado (LÖI, CHARDGNY, ALMANZA *et al.*, 2000, GATTO, LYONS, BROWN *et al.*, 2002).

No entanto, em espécies que têm pouca quantidade de CETP, como ocorre com os coelhos, partículas de HDL encontram-se reduzidas na presença de isômeros *trans*, sugerindo que exista mais de um mecanismo que justifique esta diminuição (GATTO, LYONS, BROWN *et al.*, 2001).

A evidência de que o aumento da CETP possa promover a aterosclerose está relacionada diretamente à elevada atividade desta enzima com conseqüente redução da HDL, quando a dieta é rica em ácido graxo *trans*. A mudança na concentração de HDL tem um efeito maior na aterogênese do que somente a própria LDL aumentada, é capaz de promover (BERDEAUX, CHARDGNY, SÉBÉDIO *et al.*, 1996).

Outra enzima pode estar relacionada com a redução da HDL em presença de ácido graxo *trans*, isto é, a LCAT (*lecitina-colesterol acil transferase*), que é uma glicoproteína responsável pela produção da maioria do colesterol esterificado no plasma humano. Esta reação consiste de duas etapas: a fosfolipase A₂, enzima específica para a hidrólise do ácido graxo esterificado na posição *sn*-2 da fosfatidilcolina (lecitina), forma um intermediário (lisofosfatidilcolina) e em seguida, o ácido graxo hidrolisado é transferido para o colesterol, esta segunda etapa é catalisada pela LCAT. A reação é ativada pela apoproteína A-I, (maior apoproteína da HDL). Sendo assim, a atividade da LCAT é importante para a concentração de HDL no plasma, e estando deficiente acarreta a redução da concentração da HDL (NTAMBI, 1999).

Em estudos com animais e humanos verificou-se que a LCAT é estéreo-específica. Esta especificidade é alterada quando usada a fosfatidilcolina esterificada com ácidos graxos *trans* como substrato para a formação de colesterol esterificado. A inibição da LCAT produz colesterol esterificado com ácidos graxos saturados que são mais aterogênicos, tendo também como conseqüência uma diminuição na fluidez da membrana da partícula de HDL, uma vez que a fosfatidilcolina é um dos principais fosfolipídios que compõem a monocamada da membrana lipídica da HDL (KATAN *et al.*, 1995).

A maioria dos dados nesses estudos foi obtida com o uso misturas de isômeros ou especificamente o ácido elaídico, C18:1 9*t*. Utilizando os seguintes

ácidos graxos C16:0, C16:1c e C16:1t, C18:0, C18:1c e C18:1t VAN GREENVENBROEK, ROBERTUS-TEUMISSEN, ERKELENS *et al.*, (1998) demonstraram que os efeitos dos diferentes isômeros variam com o tamanho da cadeia e a posição das duplas ligações sobre a secreção de lipoproteínas intestinais.

A incorporação dos ácidos graxos *trans* nos quilomícrons representa o primeiro passo de uma sucessão de eventos metabólicos para o transporte e incorporação dos ácidos graxos *trans* no organismo e tendo, portanto, influências sobre o perfil das lipoproteínas. VAN GREENVENBROEK, ROBERTUS-TEUMISSEN, ERKELENS *et al.* (1998) utilizaram como modelo experimental células Caco-2 com propriedades semelhantes ao enterócito humano. Estes autores demonstraram, utilizando como controle o C18:0 e comparando os efeitos do C18:1t e C18:1c, que havia a ocorrência de um aumento da secreção de triacilglicerol quando era utilizado o ácido graxo *trans* e que o aumento de apo-B48 e apo-B100 foi semelhante para ambos. Já, para o C16:1c, nas mesmas condições, não houve alterações nem na secreção de triacilgliceróis, nem na concentração de apo-B. Os resultados permitiram concluir que os quilomícrons ricos em triacilgliceróis, induzidos pelo C18:1t, podem ser hidrolisados de maneira ineficiente causando dificuldade no “*clearance*” pós-prandial. Retardar a secreção dos quilomícrons ricos em triacilgliceróis pode contribuir na redução de HDL e no aumento da concentração de triacilgliceróis, como já observado em alguns experimentos.

Outras hipóteses foram avaliadas a fim de determinar o mecanismo pelo qual os ácidos graxos *trans* podem alterar as concentrações das lipoproteínas plasmáticas. Em contrapartida ao que foi postulado por MENSINK & KATAN (1990) com relação a uma alteração na atividade dos receptores de LDL, DASHTI, FENG, FREEMAN, *et al.* (2002) num estudo “*in vitro*” verificaram que os efeitos adversos dos ácidos graxos *trans* estão relacionados com a composição e concentração das Apo A-I e apo B.

Outro fator potencialmente aterogênico é a lipoproteína [a] que é um complexo macromolecular constituído de LDL que tem uma glicoproteína extra, denominada apoproteína [a]. Apesar da semelhança estrutural entre a lipoproteína [a] e a LDL, a concentração no organismo é bem diferente. A lipoproteína [a] é resistente às manipulações por meio da dieta, podendo apresentar diferenças geneticamente determinadas. Parece que os ácidos graxos *trans* são um dos raros fatores que é capaz de influenciar os níveis de lipoproteína [a] (NESTEL, NOAKES, BELLING *et al.*, 1992; KATAN, ZOCK & MENSINK, 1995).

Em síntese, os efeitos dos ácidos graxos *trans* sobre o desenvolvimento de doenças cardíacas coronarianas em comparação aos efeitos dos ácidos graxos saturados, podem modular o perfil das lipoproteínas séricas, promovendo um aumento da LDL e uma redução da HDL (KATAN, 2000).

Apesar de pesquisas mais recentes indicarem que a redução da HDL possa estar mais relacionada com o conteúdo de ácidos graxos saturados da dieta do que ácidos graxos *trans* propriamente (LICHTENSTEIN, JAUHAINEN, MCGLADDERY *et al.*, 2001), os mecanismos que geram a alteração no perfil das lipoproteínas plasmáticas ainda não estão totalmente esclarecidos e portanto, as recomendações de consumo ainda não podem ser estabelecidas. Contudo, é senso comum entre os pesquisadores que se faz necessária a redução de ambas as gorduras no consumo diário.

2.6 METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS *trans*

Os ácidos graxos *trans* monoinsaturados com 18 átomos na cadeia carbônica são primariamente incorporados nos fosfolípidios e triacilgliceróis do plasma, fígado, rim, coração, tecido adiposo e células sanguíneas. Logo, os isômeros do octadecadienoato (cadeia carbônica com dezoito átomos e duas

duplas ligações com pelo menos uma na configuração *trans*) se acumulam nos triacilgliceróis do plasma fígado, rim, coração e tecido adiposo e pequenas quantidades são encontradas nos fosfolipídios dos tecidos e nos ésteres de colesterol. Além de serem depositados nestes órgãos e tecidos são também metabolizados, uma vez que com a descontinuidade da dieta somente pequenas quantidades de ácidos graxos *trans* são encontradas nestes tecidos, com exceção do tecido adiposo (MOORE, ALFIN-SLATER & AFTERGOOD, 1980). Por isto este último tecido é considerado um bom marcador para estudos de consumo dos isômeros *trans* em longo prazo.

Os isômeros *trans* do C18:3 são produzidos durante o aquecimento de óleos vegetais em tratamentos como desodorização e fritura (SEBÉDIO, GRANDGIRARD & PRÉVOST, 1988). Assim como seus correspondentes *cis* também são encontrados somente em pequenas quantidades na alimentação humana. São incorporados e metabolizados produzindo uma alteração completa no perfil de ácidos graxos presentes na dieta mesmo em pequenas concentrações, de apenas 0,2 g/100g da dieta (LOÏ, CHARDGNY, ALMANZA *et al.*, 2000).

A digestibilidade das gorduras hidrogenadas pode variar de 79 a 98% dependendo do ponto de fusão da gordura. A digestão dos triacilgliceróis contendo ácido elaídico pelas enzimas pancreáticas, não apresentou diferenças quando comparada com triacilgliceróis esterificados com outros ácidos graxos nem para a localização nas diferentes posições na molécula do triacilglicerol. Após a absorção, os isômeros são transportados para vários tecidos para deposição ou catabolismo (HOLMER, 1998).

2.6.1 β - OXIDAÇÃO

A degradação oxidativa dos ácidos graxos se dá principalmente na matriz mitocondrial pela via da β -oxidação, porém os ácidos graxos de cadeia longa podem também ser degradados pela oxidação peroxissomal em que a primeira etapa é catalisada por uma flavoproteína, a acil-CoA oxidase. Além disso, ao contrário da oxidação mitocondrial, esta reação produz peróxidos de hidrogênio que são prontamente destruídos pela catalase. As demais etapas ocorrem de maneira semelhante à oxidação mitocondrial (SINGH, 1997).

Os primeiros estudos avaliando a oxidação dos ácidos graxos *trans* demonstraram a existência de certa equivalência oxidativa ao seu correspondente de configuração *cis* (KINSELLA, BRUCKNER, MAI *et al.*, 1981). Em homogenato de coração humano, foram verificadas as mesmas taxas de oxidação entre o ácido elaídico e o ácido oléico (ENKEN, 1995). No entanto, GUZMÁN, KLEIN, PULGAR *et al.* (1999), estudando o metabolismo de ácidos graxos *trans* em hepatócitos de ratos, demonstraram que o ácido elaídico foi preferencial em relação ao ácido oléico em mais de uma das etapas da oxidação mitocondrial dos ácidos graxos. Revelaram, também, que a taxa de oxidação peroxissomal do ácido elaídico é 2,5 vezes maior do que a do ácido oléico.

2.6.2 DESSATURAÇÃO E ALONGAMENTO

Enquanto a oxidação pode ocorrer nas mitocôndrias, ou nos peroxissomos, as reações de síntese dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em geral ocorrem somente nos microsossomos hepáticos (LEHNINGER, 2000).

Como mostra a **Figura 3**, os ácidos graxos são convertidos em derivados polinsaturados de cadeia longa, por sucessivas etapas que envolvem

alongamento e dessaturação da cadeia carbônica (COOK,1991). Apesar das primeiras etapas serem seqüencialmente organizadas em dessaturação, seguida do alongamento da cadeia carbônica, na etapa final para formação do 22:6 ω -3 e do 22:5 ω -6, uma nova via foi estabelecida, na qual os precursores dos ácidos graxos com 22 átomos de carbonos são inicialmente alongados a 24:5 n-3 e 24:6 n-3, seguido por mais uma dessaturação pela Δ 6 dessaturase e de uma β -oxidação peroxissomal (ou retroconversão) do produto (MARZO, ALAVA, PIÑEIRO *et al.*, 1996). Estas reações metabólicas ocorrem entre o grupo carboxílico e a dupla ligação mais próxima, e conseqüentemente não afeta a estrutura molecular entre o grupo metílico final e a última dupla ligação. Portanto, todo ácido graxo polinsaturado derivado das famílias n-9, n-6 e n-3, pertencerão às suas famílias de origem (HORNSTRA, 2001).

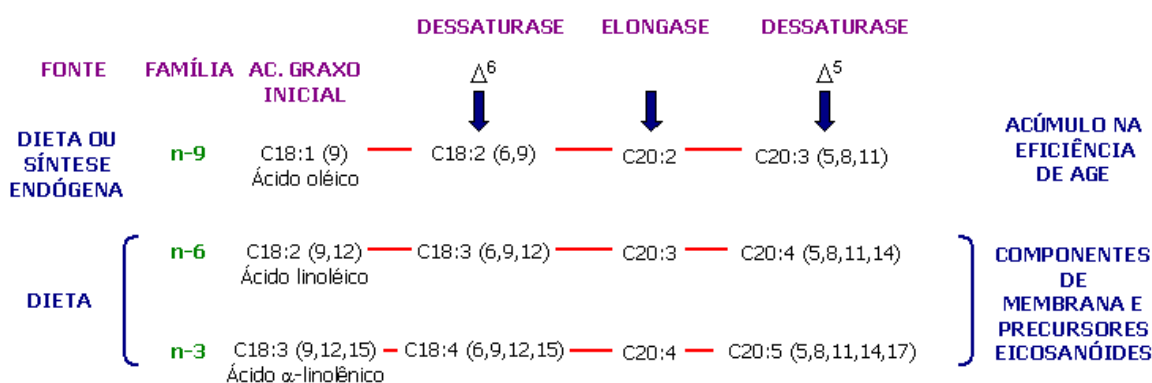


Figura 3 – Esquema da dessaturação dos ácidos graxos n-9, n-6 e n-3.

Comumente, o ácido oléico é dessaturado pela Δ 6 dessaturase em competição com o C18:2 n-6 e C18:3 n-3 nos microsossomos hepáticos (**Figura 3**), porém em condição de deficiência de ácidos graxos essenciais a atividade da Δ 9 dessaturase torna-se otimizada. O esterato e o palmitato geram derivados da série n-9, do linoleato e linolenato originam os compostos das

séries n-6 e n-3, respectivamente. Nesta terminologia o n define a distância em números de carbonos, entre o grupo metílico final da molécula do AG e a dupla ligação mais próxima. Todos os derivados de uma série terão um fragmento terminal livre de insaturação idêntico. Ao contrário, a especificidade das dessaturases identificadas por Δ^9 , Δ^6 , Δ^5 , etc é definida tendo como referência a ligação entre carbonos contados a partir do grupo carboxílico terminal (WAINWRIGHT, 1997). Desta forma, com a ação enzimática sobre o ácido elaídico podem ser formados os ácidos graxos C20:1 n-9, C20:2 n-9 e C20:3 n-9 *trans* (HOLMER, 1998).

O ácido linoléico e o ácido α -linolênico competem pelas mesmas enzimas, logo, eles podem inibir tanto o próprio alongamento como a dessaturação. Após a clonagem da Δ^6 dessaturase, notou-se que o ácido linoléico pode inibir a expressão do gene que codifica a Δ^6 dessaturase (CHO, NAKAMURA & CLARKE, 1999). Embora a Δ^6 dessaturase tenha uma preferência pelo ácido α -linolênico, a disponibilidade do ácido linoléico em maior quantidade reverte esta preferência para si próprio (HORNSTRA, 1999).

BLOND, CHARDGNY, SÉBÉDIO *et al.* (1995) pesquisando os efeitos dos isômeros *trans* do ácido α -linolênico sobre a dessaturação do seu correspondente *cis* pela Δ^6 dessaturase, observaram um aumento na taxa de dessaturação nos microssomos do fígado de animais alimentados com uma dieta deficiente em *cis* n-3 e sem ácidos graxos *trans*, em relação ao grupo de animais que consumiram uma dieta deficiente em *cis* n-3, e adicionada de ácidos graxos *trans*. Sugerindo desta maneira, que os isômeros geométricos *trans* são provavelmente dessaturados e alongados em ácidos polinsaturados, porém mais lentamente do que o seu correspondente *cis*. Além disso, os animais alimentados com isômeros *trans* e uma dieta deficiente em *cis* apresentaram um aumento no nível de C22:5 n-6, indicando que ocorre também

uma indução no nível de utilização das $\Delta 6$ e $\Delta 5$ dessaturases pelos ácidos graxos n-6.

MAHFOUZ & HOLMAN (1980) investigando a dessaturação dos isômeros de posição do C18:1 *cis*, em microsossomos hepáticos de ratos, verificaram que o máximo de conversão para C18:2 ocorreu nos isômeros com as duplas ligações na posição $\Delta 8$ e $\Delta 9$ *cis*. Os substrato com a dupla ligação na posição $\Delta 12$ não foi dessaturado. Concluíram, por este estudo, que a dupla ligação nos isômeros *cis* é um fator determinante para a atividade da dessaturase.

O alongamento da cadeia geralmente acontece numa velocidade maior do que a da dessaturação, e a velocidade de conversão depende do tamanho da cadeia, assim como da posição das duplas ligações, preferencialmente com cadeias contendo 18 átomos de carbonos. Deste modo, os isômeros monoinsaturados podem também ser alongados. Em estudos com microsossomos de ratos, foi observado que os isômeros com duplas ligações nos carbonos 7 e 9 são os mais reativos (HOLMER, 1998).

Pesquisas *in vitro* (BERDEAUX, BLOND, BRETILLON *et al.*, 1998) e *in vivo*, utilizando amostras de tecidos de animais (BRETILLON, CHARDGNY, NÖEL *et al.*, 1998) e de tecidos humanos (TURPEINEN, WUBERT, ARO *et al.*, 1998), verificaram que os isômeros geométricos do 18:2 n-6 e do C18:3 n-3 podem ser metabolizados a ácidos graxos de cadeia com 20 e 22 carbonos. Estes isômeros são capazes de inibir competitivamente os seus correspondentes *cis*. No caso do ácido linoléico, o 18:2 9*t*,12*c* apresenta maior afinidade para a $\Delta 6$ dessaturase, possivelmente pela presença na posição 12, de uma ligação *cis*, potencializando o alongamento do seu precursor, já o isômero com a dupla ligação *trans* na posição 12*t* tem o potencial para aumentar a dessaturação (BERDEAUX, BLOND, BRETILLON *et al.*, 1998; BRETILLON, CHARDGNY, NÖEL *et al.*, 1998).

Os ácidos graxos essenciais, ou seja, o ácido linoléico (C18:2 n-6) e ácido α -linolênico (C18:3 n-3) são precursores dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, o ácido araquidônico (C20:4 n-6), ácido eicosapentaenóico (C20:5 n-3) e ácido docosahexaenóico (C22:6 n-3). Estes ácidos graxos são fundamentais para a síntese dos eicosanóides, moléculas participantes do controle do sistema circulatório (prostaglandinas e tromboxanos) e compostos envolvidos no sistema imune (leucotrienos) (WAINWRIGHT, 1997; ZHOU & NILSSON, 2001).

O ácido araquidônico tem um papel importante na agregação plaquetária. À medida que ao ser liberado dos fosfolipídios da membrana da plaqueta, é utilizado na formação de prostanóides pela ação da cicloxigenase com efeito pró-agregatório. Esta propriedade é modulada pela concentração de ácidos graxos polinsaturados com 20 e 22 átomos de carbono na molécula (SPRECHER, 1989; LEE, PUKUMOTO, NISHIDA *et al.*, 1998).

Quanto aos efeitos sobre a agregação plaquetária dos produtos do alongamento e dessaturação dos isômeros *trans* que, potencialmente, poderiam interferir com o metabolismo normal do ácido araquidônico, se verifica que o C20:4 14t n-6 tem uma ação anti-agregatória, pois compete em alguma etapa da via das cicloxigenases com seu correspondente *cis*, levando a uma redução na formação de tromboxano (TXA₂). O antagonista da agregação plaquetária é obtido do ácido α -linolênico pelo mesmo sistema enzimático, por meio de sucessivas dessaturações e alongamento da molécula, formando EPA e DHA. Os isômeros resultantes do metabolismo do C18:3 15t, os produtos: 20:5 11t e 20:5 11t,17t apresentaram maior ação anti-agregatória e que a dupla ligação 11t foi a responsável pelos efeitos resultantes, já a posição 17t parece não ser reconhecida como uma ligação dupla, mas sim como uma ligação simples, tornando o C20:5 17t metabolizável pelo sistema que identifica o C20:4 n-6 (LOÏ, CHARDGNY, BERDAUX *et al.*, 1998).

Em vários tecidos o ácido graxo polinsaturado de maior concentração nos fosfolipídios da membrana é o ácido docosahexaenóico (DHA) e em menor proporção o ácido eicosapentaenóico (EPA), ambos oriundos do ácido α -linolênico. A disponibilidade destes ácidos graxos polinsaturados depende, portanto, da habilidade de seu precursor C18:3 ser dessaturado pela $\Delta 6$ dessaturase (CARRIÉ, CLÉMENT, JAVEL *et al.*, 2000b).

2.7 INCORPORAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS *trans* NOS TECIDOS

Os ácidos graxos *trans* são incorporados em tecidos e fluidos humanos e de animais experimentais, principalmente no coração, fígado, tecido adiposo, plasma e leite (MANN, 1994; CHA & JONES, 1996). MOREIRA, CURI, PADOVESE & MANCINI-FILHO (2001) demonstraram que os ácidos graxos *trans* são depositados inclusive em tecidos tumorais.

O acúmulo nos tecidos reflete o conteúdo e o perfil dos ácidos graxos da dieta, entretanto em menores proporções (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2001).

Entre as classes de lipídios, principalmente nos fosfolipídios das membranas, os ácidos graxos *trans* são incorporados preferencialmente na posição *sn*-1, deslocando os ácidos graxos saturados e apenas os isômeros do C18:2 conseguem ser incorporados na posição *sn*-2 competindo com os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (WOLFF, COMBE, ENTRESSANGLES *et al.*, 1993). Vários experimentos têm demonstrado que a influência sobre a distribuição dos ácidos graxos nos fosfolipídios dos tecidos não é significativa quando quantidades adequadas de ácidos graxos essenciais são fornecidas não se verificando também qualquer degeneração tecidual (HOY & HOLMER, 1979, EMKEN, 1984, HOY & HOLMER 1981, ZEVEBERGEN, 1988).

Estima-se que o coeficiente de absorção seja de aproximadamente 95%, no entanto, este valor pode variar de acordo com a quantidade encontrada na dieta (KINSELLA, 1981, ABDULLAH & AL-OTHMAN, 2000).

Amostras de tecido humano apresentaram concentrações de ácidos graxos *trans* entre 2,4% a 12,2% (tecido adiposo), 4,0% a 14,4% (fígado), 4,9% a 9,3% (coração) e 2,3% a 8,8% (aorta). O ácido graxo encontrado em maior concentração foi o C18:1t. (KINSELLA, 1981).

A extensão da incorporação individual entre os *cis* e *trans* é diferenciada tanto pela especificidade dos tecidos como pela classe dos lipídios do próprio tecido, tais como os triacilgliceróis, os lipídios neutros e os fosfolipídios. Na membrana mitocondrial os isômeros de posição do ácido oléico são depositados preferencialmente na posição *sn*-1 da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina, reduzindo os níveis de ácidos graxos saturados (WOLFF & ENTRESSANGLES, 1994), porém no tecido adiposo, a substituição ocorre sobre o ácido oléico C18:1 9 *cis*. (HOY & HOLMER, 1981).

Os níveis de ingestão energética e o estímulo metabólico podem influenciar o padrão de deposição, bem como a taxa de oxidação dos ácidos graxos nos tecidos, em função do tipo de tecido, estrutura do ácido graxo e composição lipídica da dieta (CHA & JONES, 1996).

As diferenças metabólicas relativas às taxas de “*turnover*” dos ácidos graxos nos diferentes tecidos são parcialmente responsáveis pelo acúmulo em diferentes porcentagens de ácidos graxos *trans*, por exemplo, tecidos metabolicamente ativos como o fígado e o tecido adiposo, acumulam mais *trans* do que o cérebro. As variações nas taxas de acilação e desacilação também contribuem para as distinções apresentadas (MOORE & DHOPESHWARKAR, 1980; CHA & JONES, 1996).

Outro aspecto que deve ser enfatizado é a influência dos ácidos graxos em condições gestacionais. Inicialmente, foi sugerido que a placenta seria uma barreira para os ácidos graxos *trans*, Todavia KOLETZKO *et al.*, (1991) verificaram que os isômeros existentes no sangue materno podem ser identificados também no sangue do cordão umbilical, indicando que há uma transferência para o feto. Além disso, os ácidos graxos *trans* são secretados pelo leite materno (MOORE & DHOPESHWARKAR, 1980).

É possível que o cérebro e a placenta, quando comparados com o coração, o fígado e o tecido adiposo, tenham uma capacidade discriminatória maior contra a inclusão dos isômeros *trans* (CARLSON, CLANDININ, COOK *et al.* 1997), pois estudos de transporte e concentração tecidual dos ácidos graxos *trans*, observaram que as concentrações presentes no sangue materno foram maiores do que as encontradas no sangue umbilical e no cérebro (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2000).

LARQUÉ, PEREZ-LLAMAS, PUERTA *et al.* (2000) alimentaram ratas grávidas com diferentes concentrações de ácidos graxos *trans* e verificaram que a placenta incorporou elevadas concentrações de isômeros *trans* em sua estrutura, além disso, puderam observar a incorporação de ácidos graxos *trans* no fígado nos lipídios de diversos tecidos, mas não no cérebro, sendo assim, a placenta não é uma barreira completamente impermeável demonstrando também uma clara exposição do feto aos ácidos graxos *trans* da dieta materna.

É possível que o cérebro seja menos suscetível do que os tecidos periféricos, em função da barreira hematoencefálica que restringe a passagem de ácidos graxos para o cérebro. Uma alteração na composição dos ácidos graxos dos lipídios cerebrais pode afetar o funcionamento do cérebro via modificações no crescimento celular, na divisão celular, na atividade enzimática ou por alterações da estrutura cerebral. Sob este aspecto a dieta pode influenciar o metabolismo cerebral por variações quantitativas e qualitativas no

consumo de alimentos tornando críticos os efeitos de alguns ácidos graxos nos diferentes estágios do desenvolvimento dos diferentes tecidos (CARLSON, CLANDININ, COOK *et al.*, 1997).

2.7.1 ÁCIDOS GRAXOS *trans* E OS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

As duas séries de ácidos graxos polinsaturados consideradas essenciais: a série n-6 e a série n-3 (BURR & BURR, 1930), são sintetizadas pelos vegetais, entretanto, os animais não possuem esta capacidade, tornando necessária a sua obtenção através da dieta (SPRECHER, 1989).

Estes nutrientes essenciais são indispensáveis para a síntese de ácidos graxos com cadeia carbônica de 20 a 22 átomos através do alongamento da cadeia e inserção de duplas ligações carbono-carbono nas posições 5 e 6 da molécula, contando a partir do grupo carboxílico. Este processo ocorre principalmente no fígado (SCRIMGEOR, MCVEAN, FERNIE *et al.*, 2001).

Estudos com dietas contendo ácidos graxos *trans* revelaram que estes competem pelos mesmos sistemas enzimáticos dos ácidos graxos essenciais, interferindo, portanto, na biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados e intensificando as alterações bioquímicas e fisiológicas causadas pela deficiência dos ácidos linoléico e α -linolênico (BOURRE, FRANCOIS, YOUYOU *et al.*, 1990).

As enzimas têm uma maior afinidade pela série n-3, quando os ácidos graxos n-3 e n-6 são consumidos nas mesmas proporções. Todos os ácidos graxos insaturados com 18 átomos de carbonos inibem competitivamente a $\Delta 6$ dessaturase, o grau de inibição é proporcional à taxa relativa de dessaturação. O ácido linoléico 18:2 n-6 é um inibidor mais forte da $\Delta 6$ dessaturase do que o

ácido oléico. Os produtos dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa n-3 formados a partir do 18:3 n-3 são fortes inibidores da atividade das $\Delta 6$ e $\Delta 5$ dessaturases sobre os ácidos graxos n-6 (HOLMER, 1998). Contudo, em estudo com humanos utilizando o isômero *trans* do ácido α -linolênico, SCRIMGEOUR, MCVEAN, FERNIE *et al.* 2001, não verificaram nenhuma inibição na conversão do ácido linoléico marcado com ^{13}C , medido no plasma de homens.

A deficiência em ácido linoléico acarreta alterações no crescimento, nas funções reprodutivas e lesões na pele. Os sinais são mais obscuros na deficiência em ácido α -linolênico, mas pode se observar em animais experimentais uma redução na acuidade visual, determinada por eletrorretinogramas anormais e possivelmente, conseqüências sobre a cognição e comportamento (CHARDIGNY, BONHOMME, SÉBÉDIO *et al.*, 1998).

Os ácidos graxos *trans* são incorporados ao leite materno de uma maneira “dose-dependente” em relação à dieta. Modificam o nível de ácidos graxos essenciais e aumentam a relação n-6/n-3 no leite, entretanto, não afetam os níveis de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa quando quantidades maiores de ácidos graxos essenciais são fornecidas (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2000).

Ao considerar que a deficiência em ácido graxo essencial leva ao retardo no crescimento, é possível que os ácidos graxos *trans* possam ter um impacto negativo durante a infância. A assimilação de quantidades apropriadas de n-6 e n-3 nos tecidos em crescimento do lactente, depende da sua administração por meio do leite materno que por sua vez a sua composição nestes ácidos graxos depende da dieta consumida (NICOLOSI, 1997).

Existem algumas evidências que os ácidos graxos *trans* possuem um efeito metabólico durante o desenvolvimento inicial do feto e do recém nascido. O potencial de interferência sobre o processo normal de crescimento pode ser maior durante os períodos de maior atividade do crescimento celular, expansão da membrana e, sobretudo no processo de desenvolvimento (LARQUÉ, ZAMORA & GIL, 2000).

2.8 ÁCIDOS GRAXOS *trans* E MEMBRANAS

As membranas são de fundamental importância para a estrutura e função celular. A membrana plasmática que envolve as células, e outras membranas, formam uma superfície intracelular contínua (retículo endoplasmático) sendo a base estrutural de organelas intracelulares, como as mitocôndrias (WISEMAN, 1996).

As membranas biológicas possuem uma grande variedade de lipídios, que estão organizados de maneira tal que formam uma bicamada.

A habilidade dos fosfolipídios de assumirem esta organização básica é definida pela característica exclusiva de seu caráter anfipático indicado pela presença de grupos polares (hidrofílicos) e grupos não polares (hidrofóbicos) (CULLIS, FENSKE & HOPE, 1996).

A bicamada lipídica tem dois papéis importantes para as membranas: 1) proporcionar uma barreira seletiva para a permeabilidade entre os compartimentos interno e externo e 2) uma matriz em que proteínas possam estar embebidas.

Entre os lipídios encontrados nas membranas estão os glicerofosfolipídios (fosfolipídios). Dentre os mais comuns estão a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol,

difosfatidilglicerol (cardiolipina) e fosfatidilinositol, variando as concentrações de cada um de acordo com o órgão. São diferenciados entre si pela base orgânica e pelos ácidos graxos que os compõem (CULLIS, FENSKE & HOPE, 1996).

Cada espécie lipídica exibe um perfil característico de ácidos graxos, uma vez que há uma especificidade das acil-transferases que catalisam a acilação tanto dos triacilgliceróis, como dos fosfoacilgliceróis.

A maioria dos fosfolípidios, tais como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina possui os ácidos graxos polinsaturados esterificados na posição *sn-2* e a maioria dos saturados na posição *sn-1* do glicerol (CHOY, TRAN, HATCH *et al.*, 1997). A única exceção é a cardiolipina que possui quatro ácidos graxos distribuídos em duas das suas três moléculas de glicerol com grande afinidade pelo ácido linoléico (C18:2) para todas as posições, *sn-1*, *sn-1'*, *sn-2* e *sn-2'*, podendo ser constituída por mais de 80% deste ácido graxo.

O funcionamento normal da membrana é vital para os processos celulares e é modulada por uma extensa variedade de fatores. Pesquisas recentes têm demonstrado que componentes dietéticos podem influenciar características das membranas tais como a fluidez (MORGADO, GALLEGUILLOS, SANHUEZA *et al.*, 1998), estabilidade e suscetibilidade ao dano oxidativo (PORTERO-OTÍN, BELLMUNT, RUIZ *et al.*, 2001)

Modelos experimentais demonstraram que os ácidos graxos da dieta induzem a ocorrência de modificações na composição das membranas celulares (CHOY, TRAN, HATCH *et al.*, 1997).

Diferenças qualitativas na gordura da dieta afetam em sua maioria a composição em ácidos graxos das membranas. Os efeitos são mais evidentes quando há deficiência de ácidos graxos essenciais na dieta e em períodos de intenso desenvolvimento tecidual, como por exemplo durante os períodos fetal e neonatal (MCGEE, LIENERMAN, GREENWOOD, 1996). Os ácidos graxos

polinsaturados n-3 podem aumentar a fluidez da membrana dos eritrócitos quando esterificados aos fosfolipídios da membrana. Contrapondo a isto, a substituição dos ácidos graxos saturados por monoinsaturados *cis* ou *trans* não apresentou alteração na fluidez. Já, aumentando o conteúdo de colesterol e de ácidos graxos saturados a fluidez decresce. O colesterol, os ácidos graxos saturados e os ácidos graxos *trans* podem agir enrijecendo a membrana, inibindo a maioria dos movimentos transmembrana (WISEMAN, 1996).

PARKS, HUGGINS, GEBRE *et al.* (2000), estudando a fluidez de membranas avaliou o efeito dos ácidos graxos *trans* esterificados na molécula da fosfatidilcolina e a associação com outros ácidos graxos de vários tamanhos de cadeia. Verificaram que o tipo de ácido graxo, tamanho da cadeia e a localização da dupla ligação podem alterar a fluidez da membrana.

2.9 ÁCIDOS GRAXOS *trans* E FOSFOLIPÍDIOS DAS MEMBRANAS MITOCONDRIAIS

As mitocôndrias com sua estrutura complexa são um interessante objeto de investigação para a bioquímica das membranas biológicas. Contêm duas membranas, uma interna e outra externa que apesar da proximidade têm funções e composição química distintas (DAUM, 1985).

Os lipídios como nas demais membranas biológicas influenciam a estrutura e a estabilidade das membranas das mitocôndrias, além de interagirem com proteínas e afetarem o seu sistema enzimático (HAZEL & WILLIAMS, 1990).

A classe dos fosfogliceróis é a mais representativa dos lipídios de quase todas as membranas celulares de animais, exceto para o tecido nervoso no qual há uma maior concentração de cerebrosídeo e gangliosídeo.

As funções bioquímicas das mitocôndrias são fortemente dependentes dos lipídios. A atividade de determinadas enzimas depende da sua especificidade da membrana, que é definida em parte pelos fosfolipídios, a fim de manter a integridade e propriedades funcionais das células, o que justifica a necessidade de uma diversidade estrutural da composição em ácidos graxos (DOWHAN, 1997).

As membranas mitocondriais são compostas de fosfatidiletanolamina, em concentrações maiores do que em qualquer outro compartimento celular, mas o fosfolipídio predominante é a fosfatidilcolina como nas demais membranas. No entanto, é a cardiolipina que se encontra em menor proporção, aproximadamente 20% do total de fosfolipídios, de fundamental importância nas funções mitocondriais. A sua quantificação é de grande utilidade clínica, como índice bioquímico para vários estados patológicos (SCHLAME, RUA & GREENBERG, 2000).

2.9.1 FOSFATIDILCOLINA

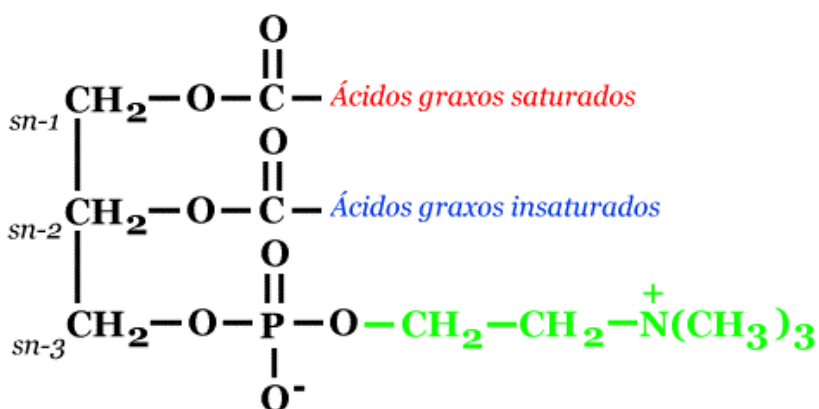


Figura 4 – Estrutura química da fosfatidilcolina

A fosfatidilcolina foi descrita primeiramente em 1847, como um componente da gema do ovo, e denominada lecitina (**Figura 4**). Em 1860,

Diakonow & Strecker demonstraram que a lecitina continha dois ácidos graxos ligados ao glicerol e que a colina estava ligada à terceira hidroxila por uma ligação fosfodiéster. Em 1950 foi confirmada a sua estrutura.

A fosfatidilcolina é o fosfolípido de maior concentração nos tecidos de mamíferos. Desde a sua descoberta tem sido intensamente estudada. A maioria destes estudos foi realizada com tecido hepático e pulmonar, somente em 1980 foi demonstrada a capacidade do tecido cardíaco em sintetizá-la (CHOY, TRAN, HATCH *et al.*, 1997).

Os ácidos graxos são distribuídos de uma maneira assimétrica na maioria dos diacilfosfoglicerídeos. Os ácidos graxos saturados são geralmente esterificados na posição sn-1, enquanto que os ácidos graxos insaturados na posição sn-2 do glicerol. A distribuição das espécies moleculares é distinta entre os animais de diferentes espécies (ROCQUELIN, GUENOT, ASTORG *et al.*, 1989) e tecidos e entre os níveis celulares e subcelulares (CHOY, TRAN, HATCH *et al.*, 1997). Existem mecanismos celulares atuando na distribuição dos ácidos graxos nos fosfolípidios das membranas celulares, 1) por meio de acilação e desacilação ou 2) pela formação a partir dos lisofosfolípidios.

Segundo MARSH (1990), os principais ácidos graxos saturados da fosfatidilcolina nas mitocôndrias de ratos são o ácido palmítico e o ácido esteárico, e entre os polinsaturados de cadeia longa, como na fosfatidiletanolamina, o ácido araquidônico é o de maior concentração.

2.9.2 FOSFATIDILETANOLAMINA

Descoberta no tecido cerebral, a fosfatidiletanolamina recebeu a denominação de cefalina. Dos ácidos graxos saturados presentes na sua molécula, 50% estão esterificados preferencialmente na posição sn-1 do glicerol, e o ácido graxo predominante é o ácido esteárico (27%). É o fosfolípidio com maior concentração de ácido araquidônico (38%) (**Figura 5**).

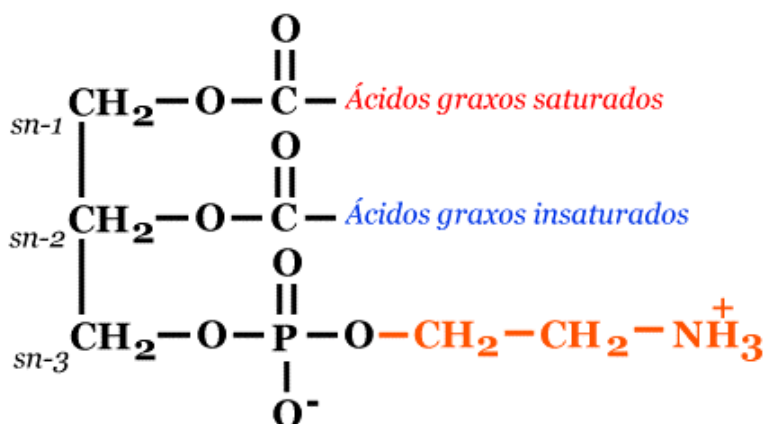


Figura 5 – Estrutura química da fosfatidiletanolamina

2.9.3 - CARDIOLIPINA

A cardiolipina é um fosfolipídio exclusivo da membrana mitocondrial e de bactérias, podendo também ser encontrada em leveduras (DAUM, 1985; BERGER, 1993, SCHLAME, RUA & GREENBERG *et al.*, 2000). Esta denominação tem origem na sua descoberta que foi identificada primeiramente por PANGBORN (1942), em homogenato de coração bovino. A confirmação da sua estrutura se deu entre 1965 e 1966.

A concentração da cardiolipina varia com a quantidade de mitocôndrias no tecido, encontrando-se no coração humano e de rato aproximadamente 9 a 18% e 0,2 a 2% no cérebro de ratos, respectivamente (DAUM, 1985; BERGER, 1993).

Localiza-se predominantemente na membrana interna na face matricial das mitocôndrias. Alguns trabalhos relatam terem sido encontradas em concentrações muito baixas na membrana externa. Estes resultados são alvos

de crítica por problemas associados com o isolamento das membranas subcelulares e por causa da existência de sítios entre as duas membranas sugerindo uma “contaminação” dos isolados.

Pertencente à família dos poliglicofosfolipídios, possui uma estrutura única por apresentar quatro ácidos graxos dos quais mais de 80% pode ser de ácido linoléico C18:2 (**Figura 6**).

A cardiolipina, ao contrário dos demais fosfolipídios, contém na sua molécula poucas espécies de ácidos graxos saturados raramente excedendo 6 a 8% (TAHIN, BLUM & CARAFOLI 1981; WOLFF & ENTRESSANGLES, 1991). Caracteriza-se pela elevada concentração de ácido linoléico que pode variar de 60 a 90% do total de lípidos (WOLFF & ENTRESSANGLES, 1991). No entanto, quando a concentração na dieta deste ácido graxo está baixa, o ácido linoléico é substituído por ácidos graxos monoinsaturados sintetizados endogenamente (WOODS, 1975).

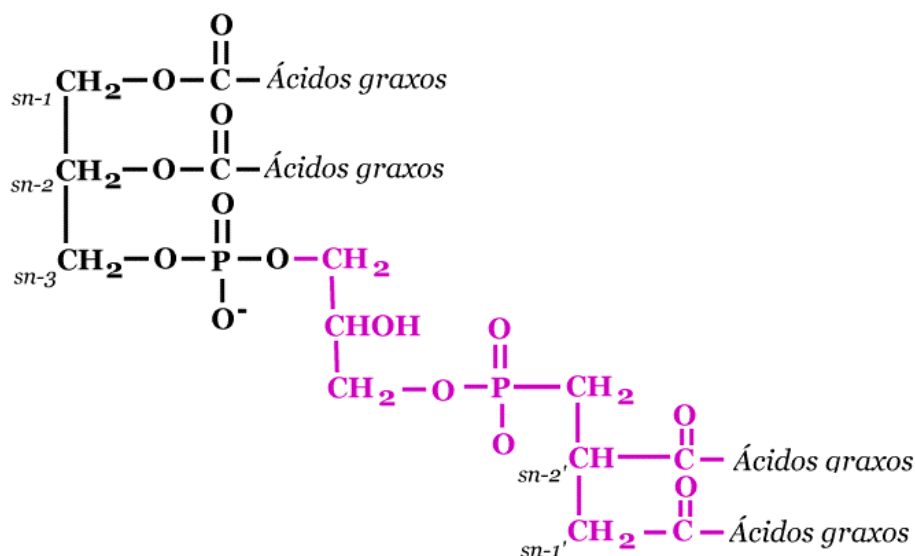


Figura 6 – Estrutura química da cardiolipina.

A distribuição dos ácidos graxos das cardiolipinas de ratos e em outros mamíferos também é diferente podendo o ácido linoléico ser esterificado em quaisquer das posições, com uma seletividade positiva para as posições *sn-1* e *sn-1'*. Portanto, a redução na concentração dietética do ácido linoléico pode afetar a distribuição dos ácidos graxos em todas as posições (WOLFF & ENTRESSANGLES, 1991).

A primeira função identificada da cardiolipina foi como um fosfolípido sorologicamente positivo para o teste de *Wasseman* para sífilis. Atualmente se conhecem várias das suas funções, entre as quais, exerce papel fundamental na atividade da citocromo *c* oxidase (PARADIES, PETROSILO, PISTOLESE *et al.*, 2000).

A cardiolipina apresenta-se como um campo fértil de pesquisas considerando sua estrutura peculiar, sua participação em processos fisiopatológicos importantes, como disfunção da tireóide (PARADIES, PETROSILLO & RUGGIERO, 1997), para o diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico e síndrome anti-fosfolípídica primária. Esta síndrome é caracterizada pela trombocitopenia, trombose e perda fetal recorrente (SCHLAME, RUA, GREENBERG *et al.*, 2000).

Muitos estudos têm avaliado a peroxidação da cardiolipina em função da dieta e de condições que possam alterar sua atividade como a idade, pois a perda da habilidade da cardiolipina em se ligar a proteínas, principalmente à citocromo *c* oxidase pode proporcionar outras alterações na interação cardiolipina-proteína e em última instância, ser até removida da membrana (LEE, BYUNG, YU *et al.*, 1999).

Na dieta, os suplementos nutricionais não afetam a concentração da cardiolipina, que somente será afetada pela concentração de mitocôndria específica de cada tecido, mas o estado dinâmico e a meia vida dos ácidos graxos da membrana são aparentemente responsáveis pela rápida resposta

dos lipídios das membranas subcelulares em relação às mudanças no balanço dietético. WOLFF, COMBE & ENTRESSANGLES (1988) verificaram que 10% de trielaidato em apenas um mês, foi suficiente para haver incorporação de C18:1t e C16:1t nos fosfolipídios da membrana.

2.10 ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS *trans*

A análise dos ácidos graxos dos alimentos e dos tecidos animais não é simples. Tradicionalmente, o conteúdo de ácidos graxos *trans* era determinado por técnicas de espectroscopia do infravermelho, mas que não permitia individualmente a quantificação dos ácidos graxos. Atualmente, uma análise completa é possível de ser realizada utilizando a cromatografia gasosa (RATNAYAKE, 1998) combinada com outras técnicas, em particular a cromatografia em nitrato de prata, espectroscopia do infravermelho, e espectrometria de massa. Outras técnicas que requerem equipamentos especiais podem ser incluídas, tais como a ressonância magnética nuclear e a cromatografia com fluido super crítico (BASSO, ALMEIDA-GONÇALVES & MANCINI-FILHO, 1999).

A cromatografia gasosa é uma ferramenta analítica amplamente utilizada para a análise de ácidos graxos em óleos, gorduras e tecidos animais. Os ácidos graxos são determinados como ésteres metílicos. Assim, são necessárias pelos menos duas etapas de preparo da amostra: uma extração dos lipídios totais dos tecidos vegetais ou animais e esterificação dos ácidos graxos (EDER, 1995).

A separação dos isômeros *cis* e dos isômeros *trans* irá depender da coluna, da fase estacionária e dos parâmetros operacionais do equipamento, além da disponibilidade dos padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos que servirão como referência para identificação dos ácidos graxos da amostra,

por comparação, entre os tempos de retenção (BASSO, ALMEIDA-GONÇALVES & MANCINI-FILHO, 1999).

As colunas capilares de fase estacionária com polaridade elevada são indicadas para a análise dos ácidos graxos *cis* e *trans*, pois são capazes de separar os ésteres metílicos dos ácidos graxos pelo grau de insaturação e pela isomeria geométrica e posição das duplas ligações (RATNAYAKE, HOLLYWOOD, O'GRADY *et al.*, 1990).

Geralmente, os ácidos graxos *trans* são eluídos antes do seu correspondente *cis*. Contudo, pode ocorrer sobreposição entre os sinais dos isômeros *cis* e *trans* com diferentes posições das duplas ligações (RATNAYAKE, 1990).

A coluna SP-2560 de 100 m x 0,25 mm d.i. é considerada como a mais eficiente para a análise dos ácidos graxos das gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas e de gorduras de ruminantes (RATNAYAKE, 1998).

Considerando que cada ácido graxo tem seu próprio destino metabólico (HOLMER, 1998; SEBÉDIO & CHARDIGNY, 1998), o conteúdo do total dos ácidos graxos *trans* é de uso limitado nos estudos sobre estimativa de consumo e seus efeitos, bem como para a orientação dos consumidores. Segundo WOLFF & PRECHT (2001), para os estudos com alimentos é importante que seja incluída como uma etapa preliminar obrigatória, a cromatografia de camada delgada impregnada com nitrato de prata, a fim de suprimir as sobreposições dos ácidos graxos *trans* na identificação dos ácidos graxos individualmente. Porém, não há unanimidade na obrigatoriedade desta etapa em estudos com tecidos humanos e animais (SEPPANNE-LAAKSO, LAAKSO, BACKLUND, *et al.*, 1996).

A ressonância magnética nuclear (RMN), é um procedimento alternativo à cromatografia gasosa para determinação dos isômeros *trans*,

permite uma análise mais simplificada (MIYAKE & YOKOMIZO, 1998) e uma melhor resolução para os isômeros do C18:1 (GUNSTONE, 1990, 1993).

MIYAKE & YOKOMIZO (1998) utilizaram a RMN para determinar a composição de gordura vegetal parcialmente hidrogenada com a finalidade de reduzir o tempo de análise, pois elimina as etapas preliminares de preparo da amostra, sendo a análise realizada diretamente com a gordura hidrogenada dissolvida em clorofórmio deuterado. MIYAKE & YOKOMIZO (1998) selecionando os sinais obtidos do carbono olefínico (carbono da dupla ligação) e medindo as áreas individuais dos picos do espectro de RMN, verificaram que os resultados da composição foram coincidentes aos obtidos por cromatografia gasosa das mesmas amostras com uma diferença de apenas 5% sugerindo então que a RMN fosse empregada como um método rápido de análise para as gorduras hidrogenadas.

Outros estudos com ressonância magnética (GUNSTONE, 1993, GUNSTONE & SHUKLA, 1995) verificaram que muitas informações sobre os isômeros podem ser obtidas a partir dos sinais emitidos pelos átomos n-1, n-2, n-3, carbonos olefínicos e alílicos da cadeia carbônica.

GUNSTONE (1993) analisando 20 espectros de amostras de gorduras hidrogenadas verificou alguns sinais comuns entre elas e glicerídios sintéticos (trielaidato e trioleidato), em que os sinais dos carbonos alílicos (carbonos adjacentes à dupla ligação), isto é, o C8 e C11 são lidos entre $\delta 27,3$ a $\delta 27,4$ e $\delta 32,6$ e $\delta 32,7$ no espectro de RMN para os isômeros *cis* e *trans*, respectivamente.

Até o momento não se verificou a utilização da ressonância magnética na análise do ácido elaídico em tecidos de animais.

2.10.1 ANÁLISE DOS FOSFOLIPÍDIOS

A cromatografia de camada fina é amplamente utilizada para a separação em escala analítica das diferentes classes de lipídios complexos.

A cromatografia unidimensional é preferencial para a separação rápida de grupos ou com o propósito de separação preparativa em pequena escala. A bidimensional tende a ser preferencial para a separação do máximo de componentes. A escolha do método, bem como a seleção dos solventes para separações específicas depende da natureza da amostra (CHRISTIE, 1982).

2.11 OUTRAS CONSIDERAÇÕES

Os estudos relacionados aos efeitos metabólicos, fisiológicos e tecnológicos dos ácidos graxos *trans* foram intensos a partir de 1970, entretanto, muitas questões ainda estão por serem respondidas.

Um dos aspectos de relevância está relacionado aos efeitos dos isômeros *trans* das gorduras vegetais hidrogenadas amplamente consumidas por diversos grupos populacionais, associados aos ácidos graxos essenciais em condições de deficiência e/ou adequação.

A identificação destes efeitos poderá sinalizar a definição das doses inócuas de consumo dos isômeros *trans*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos ácidos graxos *trans* sobre o perfil de ácidos graxos dos lipídios dos tecidos: cardíaco, cerebral, hepático, adiposo e no plasma de animais que consumiram dietas contendo quantidades variadas de ácidos graxos *trans* e de ácidos graxos essenciais (ácido linoléico e ácido α -linolênico).

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de ácidos graxos do cérebro, coração, fígado, tecido adiposo e plasma de ratos alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ácidos graxos essenciais e de ácidos graxos *trans*.
- Avaliar o efeito do tempo de consumo de dietas ricas em ácidos graxos *trans* sobre a incorporação dos isômeros em lipídios de ratos.
- Determinar o perfil de ácidos graxos da cardiolipina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina do coração de ratos.
- Comparar a cromatografia gasosa (tradicional) e a espectroscopia da ressonância magnética nuclear do ^{13}C na identificação do ácido elaídico do tecido hepático de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*, Rodentia, *MAMMALIA*) da linhagem “Wistar”, recém desmamados, procedentes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; mantidos em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas.

4.2 ENSAIOS

Considerando os objetivos do presente estudo foram realizados três ensaios biológicos.

4.2.1 ENSAIO 1

Os animais (n=8 para cada grupo) foram pesados a cada 6 dias, durante quatro semanas. Após o período de estudo, os animais foram sacrificados por decapitação, quando o sangue drenado foi coletado em tubo de ensaio contendo anticoagulante.

Os órgãos e tecidos: cérebro, coração, fígado, tecido adiposo intra-abdominal e o plasma foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até análise.

4.2.2 ENSAIO 2

No ensaio 2 foi prolongado o consumo da mesma dieta do ensaio 1 por oito semanas.

As condições experimentais do primeiro ensaio foram mantidas, porém com n=12 para cada grupo.

4.2.3 ENSAIO 3

As condições experimentais do ensaio precedente foram mantidas, sendo que os animais foram distribuídos em três grupos (n=12 para cada grupo). E foram comparadas duas dietas experimentais à dieta controle.

4.3 RAÇÕES

As rações foram elaboradas baseando-se na dieta AIN-93G, segundo o *American Institute of Nutrition for Rodents* (REEVES, e col., 1993), **Tabela 1**, com modificações nas concentrações de lipídio e amido.

Tabela 1 – Composição das rações experimentais.

NUTRIENTES	Concentração (g/100g de ração)
Amido	45,00
Sacarose	10,00
Fibra	5,00
Fração lipídica	15,00
Proteína	20,00
Mistura vitamínica	1,00
Mistura de minerais	3,50
L-cistina	0,35
Bitartarato de colina	0,25

A fração lipídica das dietas foi aumentada, em relação ao recomendado (AIN/93), de 7g/100g de ração para 15g/100g de ração, conseqüentemente alterou-se a quantidade de amido a fim de ajustar o valor energético da dieta.

Como fonte de ácidos graxos trans foi utilizada a gordura vegetal parcialmente hidrogenada SANCREME, empregada na confecção de biscoitos, produzida e gentilmente cedida pela Empresa Bunge Alimentos (Santista Alimentos até 2000). A gordura hidrogenada Sancreme contém aproximadamente 45% ácidos graxos trans e ponto de fusão de 45° C.

A fração lipídica das rações experimentais para os ensaios 1 e 2, foi obtida pela mistura de óleo de soja, óleo de girassol e gordura vegetal parcialmente hidrogenada nas proporções (1,5 g/0,5 g/13 g) correspondendo a 10%, 3,3% e 86,7% da fração lipídica, respectivamente.

Para o ensaio 3, a fração lipídica com concentração moderada de ácidos graxos trans e adequada em ácidos graxos essenciais foi elaborada com uma mistura de óleo de soja e de gordura vegetal parcialmente hidrogenada na proporção de 7:8, respectivamente, correspondendo a 47% e 53% da fração lipídica.

A composição centesimal aproximada das rações foi determinada utilizando-se as técnicas descritas pela AOAC (1980) para umidade, extrato etéreo, cinzas e o nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal. Os glicídios e a fibra alimentar foram calculados por diferença, compondo juntos a fração NIFEXT (*Nitrogen-free extract*).

4.4 ANÁLISE DOS LIPÍDIOS

4.4.1 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS

Do extrato de mitocôndrias obtido por centrifugações sucessivas (WOLFF & ENTRESSANGLES, 1991) extrairam-se os lipídios totais das mitocôndrias com clorofórmio/metanol, 2:1 (v/v) segundo FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957), com modificação sugerida por WOLFF, COMBE & ENTRESSANGLES (1985), adicionando BHT a 2% p/v na última extração.

Em seguida, os fosfolipídios foram separados por cromatografia de camada delgada, utilizando-se placas de vidro (20 x 20 cm) cobertas com 0,25 mm de sílica gel 60G (MERCK®). A solução eluente utilizada foi com clorofórmio/metanol/água/ácido acético (65/43/3/1, v/v/v/v) (BERGER, GERMAN & GERSHWIN, 1993). Foi utilizado padrão com 98% de pureza SIGMA® na identificação das bandas de cardiolipina. O r.f. (fator de retenção) médio obtido foi de 0,70.

Vale ressaltar que a cardiolipina é um fosfolipídio exclusivo da membrana interna das mitocôndrias, portanto, não sendo necessário isolar as mitocôndrias antes da separação dos fosfolipídios, uma vez que o objetivo era de identificar o perfil de ácidos graxos e não quantificar a concentração de cardiolipina ou de mitocôndrias no tecido cardíaco.

No segundo experimento optou-se por extrair os lipídios totais do tecido cardíaco, como foi feito para o cérebro, sem isolamento prévio das mitocôndrias a fim de se obter maior quantidade de lipídios.

Considerando que foi possível obter um extrato de lipídios mais concentrado, permitiu-se também que outros fosfolipídios como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, fossem isolados e, por conseguinte, avaliar-lhes o perfil de ácidos graxos.

Os fosfolipídios: cardiolipina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina foram isolados do extrato lipídico por cromatografia de camada delgada (CCD). Foram utilizadas placas de vidro (20 x 20 cm) cobertas com 0,25 mm de sílica gel 60 G (MERCK®). Após ativação das placas por uma hora, em estufa a 105°C, e resfriamento à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, aplicaram-se 5 alíquotas de 200 µL do extrato lipídico da amostra. Os padrões (SIGMA®), 50 µL, foram aplicados em bandas individuais.

A primeira solução eluente foi composta de clorofórmio/metanol/água (100/40/6; v/v/v) e a segunda solução uma solução de éter/ácido acético (100/3; v/v) para evitar contaminação dos fosfolipídios com ácidos graxos livres e/ou neutros (HøY & HøLMER, 1981). Em seguida, as placas foram pulverizadas com solução de 2'7' diclorofluorosceína em etanol (0,2%), as bandas identificadas e determinados os seus respectivos r.f. (fatores de retenção). Posteriormente, foram raspadas e coletadas em tubo de ensaio com tampa. A recuperação dos fosfolipídios foi feita utilizando-se duas lavagens sucessivas, a primeira com clorofórmio e a segunda com clorofórmio/metanol (2:1), e filtradas em papel de filtro. O solvente foi evaporado em rota-evaporador e o resíduo esterificado segundo o método de HARTMAN & LAGO (1973).

A análise do perfil de ácidos graxos de cada fosfolipídio foi realizada por cromatografia gasosa.

4.4.2 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS

Os órgãos e tecidos dos animais foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a sua retirada e mantidos em *freezer* a – 80°C até análise.

O sangue foi coletado em tubo com heparina e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos (BANERJEE, SAHA & DUTTA, 1992). O plasma foi separado e congelado em nitrogênio líquido e mantido em *freezer* a – 80°C até análise.

Os lipídios dos órgãos e tecidos, bem como das rações foram extraídos pelo método de FOLCH, LEES & SLOANE (1957).

Do extrato de lipídios, coletou-se uma alíquota que foi esterificada segundo a metodologia descrita por HARTMAN & LAGO (1973), para em seguida ser analisado o perfil lipídico por cromatografia gasosa.

4.4.3 ANÁLISE DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras foram identificados por cromatografia gasosa, comparando-se os tempos de retenção dos ésteres da amostra com os dos padrões (SIGMA[®]).

As condições de análise foram as seguintes:

Cromatógrafo à gás GC 17A SHIMADZU/CLASS GC, equipado com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (*Biscyanopropil polysiloxane*) de 100 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

Programação de temperatura da coluna: isotérmica a 140°C por 5 minutos, aquecimento a 4°C/min. até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 250°C e do detector de 260°C. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a 20 cm/s, a 175°C. A razão de divisão da amostra no injetor foi de 1/50 para os tecidos e de 1/10 para o plasma, e fosfolipídios.

4.4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Na identificação do ácido elaídico das amostras de tecido hepático, foi utilizada a espectroscopia da ressonância magnética nuclear (RMN) do ¹³C, a fim de se comparar os valores obtidos por cromatografia gasosa.

Para a análise dos isômeros por RMN, utilizou-se uma alíquota do mesmo extrato de lipídios extraído do tecido hepático. O solvente do extrato de lipídios do tecido hepático (alíquota 2 mL) foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de clorofórmio deuterado contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna. A análise foi realizada num Espectrômetro de RMN,

BRUCKER Advance DPX 300. A determinação de ^{13}C foi feita na frequência de 75,4 MHz, com um *probe* multinuclear inverso de 5 mm. Os parâmetros para aquisição dos sinais foram os seguintes: janela espectral de 315,4 ppm, tempo de aquisição 1,38 segundo, tempo de relaxamento de 2 segundos e a aquisição foi desenvolvida com um acúmulo de 10.240 vezes.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico InStat (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA) foi empregado na avaliação estatística.

Para os resultados de ganho de peso, foram realizadas comparações de médias através do teste *t*.

Para comparação entre os grupos controle e experimental de cada tecido quanto ao perfil lipídico foi utilizado o teste (não paramétrico) de Mann-Whitney.

As comparações do perfil dos ácidos graxos entre os tecidos de um mesmo ensaio foram realizadas por análise de variância por postos de Friedman.

O perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios foi avaliado por meio do teste não paramétrico de análise de variância de Kruskal-Wallis. Sendo constatada a discrepância entre os valores das amostras, empregou-se o teste de Dunes para avaliar a significância da diferença de cada par de amostras.

Em todas as análises realizadas foi considerado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados três ensaios biológicos para avaliar a hipótese experimental de que os ácidos graxos *trans* afetam a incorporação tecidual de ácidos graxos essenciais e de seus derivados polinsaturados de cadeia longa. Variou-se a duração dos experimentos, as concentrações de ácidos graxos *trans* e dos ácidos graxos essenciais nas dietas. A identificação dos grupos de animais dos experimentos se seguiu de acordo com o descrito no **Quadro1**.

Quadro1 - Identificação dos grupos de animais dos experimentos.

ENSAIOS	GRUPOS CONTROLES	GRUPOS EXPERIMENTAIS
1 Duração: 4 semanas	Controle 1 – 52% de ácido linoléico e 5% de ácido α -linolênico	Trans 1 – 33% de ácidos graxos <i>trans</i> , 8% de ácido linoléico e 0,7% de ácido α -linolênico.
2 Duração: 8 semanas	Controle 2 - 52% de ácido linoléico e 5% de ácido α -linolênico	Trans 2 - 33% de ácidos graxos <i>trans</i> , 8% de ácido linoléico e 0,7% de ácido α -linolênico.
3 Duração: 8 semanas	Controle 3 - 52% de ácido linoléico e 5% de ácido α -linolênico	Trans 3 – 39% de ácido graxo <i>trans</i> , 1% de ácido linoléico, 0,7% de ácido α -linolênico.
		AGE+t - 21% de ácido graxo <i>trans</i> , 26% de ácido linoléico, 2% de ácido α -linolênico.

Foram elaboradas dietas semipurificadas de acordo com o AIN/93 (REEVES, NIELSEN & FAHEY, 1993) com algumas modificações qualitativas e quantitativas para os lipídios e na concentração de amido. Na **Tabela 2**, pode-se verificar a composição centesimal aproximada e o valor energético das rações obtidos através dos fatores de conversão para energia, 4 calorias para cada 1g de glicídio ou proteína e 9 calorias para cada 1g de lipídio. Como não foi determinada a fração fibra, foram considerados para os cálculos os valores em grama dos ingredientes utilizados no preparo da dieta (**Tabela 1**).

Tabela 2 – Composição centesimal aproximada das dietas dos grupos controle e experimentais.

Constituintes	Dieta controle ^(*) g/100g	Dietas experimentais ^(*) g/100g
Umidade	5,47 ± 0,14	6,34 ± 0,02
Proteína	19,49 ± 0,74	18,21 ± 0,58
Extrato Etéreo	14,14 ± 0,10	14,56 ± 0,06
Cinzas	3,14 ± 0,00	3,29 ± 0,03
Nifext	57,76 ± 0,64	57,60 ± 0,65
Valor Energético ^(**)	416,26 ± 0,09	414,30 ± 0,24

(*) Média ± desvio-padrão.

(**) kcal/100g

A fração lipídica das dietas Controles foi obtida utilizando-se óleo de soja (REEVES, NIELSEN & FAHEY, 1993). Para as dietas experimentais Trans 1 e 2 empregou-se uma mistura de óleos e gorduras. Esta mistura foi preparada com o objetivo de se ter uma fonte lipídica rica em ácidos graxos *trans* (BYSTED, HØLMER & LUND, 1998) e restrita em ácidos graxos essenciais (BOURRE, FRANCOIS, YOUYOU *et al.*, 1989 e 1990). Para o grupo AGE+t, aumentou-se a proporção de óleo de soja a fim de produzir uma dieta com quantidade moderada de ácidos graxos *trans* e adequada em ácidos graxos essenciais. A fração lipídica da dieta destinada ao grupo Trans 3 foi elaborada somente com gordura vegetal parcialmente hidrogenada para se obter uma dieta deficiente em ácidos graxos essenciais. O perfil de ácidos graxos das fontes lipídicas e das dietas são apresentados na **Tabela 3**.

Considera-se uma dieta rica em ácidos graxos *trans* aquela que contenha pelo menos 33% destes ácidos graxos na fração lipídica (BYSTED, HØLMER & LUND, 1998).

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos das dietas controle e experimentais e suas respectivas fontes lipídicas.

Ácidos graxos %	Óleo de soja	Mistura óleos e GVPH*	Dietas controle	Dietas experimentais**		
				A	B	C
C14:0	0,07	n.d.	0,1	0,12	n.d.	0,13
C16:0	10,66	11,47	11,48	11,71	11,59	12,38
C17:0	0,07	n.d.	0,08	0,08	0,80	0,09
C18:0	3,22	13,46	3,43	12,73	8,64	14,35
C20:0	n.d.	0,38	0,35	n.d.	0,31	0,33
C22:0	0,43	n.d.	0,45	0,44	0,40	0,38
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	n.d.	0,12
Σ Saturado	14,77	25,31	14,96	25,35	21,74	27,78
C16:1	0,07	n.d.	0,08	0,03	0,08	0,05
C17:1	n.d.	n.d.	0,04	n.d.	n.d.	n.d.
C18:1 9c	24,19	18,3	23,74	27,24	24,43	25,94
C18:1 11c	n.d.	4,5	0,59	2,91	1,62	4,74
C20:1	0,46	n.d.	1,14	0,08	0,44	n.d.
C22:1	0,46	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	n.d.
Σ Monoinsaturado	24,72	22,8	25,62	30,26	26,57	30,68
C18:2	54,70	8,84	52,25	8,36	26,97	0,93
C18:3 ω-3	5,03	0,52	4,8	0,66	2,02	0,06
Σ Polinsaturado	59,73	9,36	57,05	9,02	28,99	0,99
C18:1 9t	n.d.	36,8	n.d.	31,77	21,24	37,46
C18:2 tt	n.d.	3,07	n.d.	0,42	n.d.	0,47
C18:2 tc	n.d.	0,89	n.d.	0,45	n.d.	0,51
C18:2 ct	n.d.	0,98	n.d.	0,31	n.d.	0,23
Σ Trans	n.d.	41,74	n.d.	32,95	21,24.	38,67
N.I.	0,94	0,79	2,37	2,60	1,46	1,88

(*) **GVPH** – gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

(**) Dietas experimentais: A) grupos Trans ensaios 1 e 2; B) grupo AGE+t; C) grupo Trans, ensaio 3. **n.d.** – não detectado. Resultado: valores médios obtido da análise das amostras em triplicata.

A concentração final em ácidos graxos *trans* na dieta experimental Trans 1 e 2 foi de aproximadamente 33% da fração lipídica e dos ácidos

linoléico e α -linolênico de 8% e 0,7%, respectivamente. A quantidade do ácido linoléico ficou dentro do limite mínimo adequado para o desenvolvimento de roedores (BOURRE, FRANCOIS, YOUYOU *et al.*, 1990) e o ácido α -linolênico, 50% menor do que a concentração ideal (CUNNANE & ANDERSON, 1997b).

O objetivo de se produzir uma dieta com valores mínimos de ácidos graxos essenciais foi o de avaliar se a incorporação dos ácidos graxos *trans* ocorreria em maior proporção, e se haveria prejuízo na síntese dos ácidos graxos polinsaturados, pois se considera que há uma relação dose-dependente para a absorção dos ácidos graxos essenciais e ácidos graxos *trans* da dieta (LARQUÉ, ZAMORA, GIL 2000). Há também uma inibição competitiva entre os ácidos graxos *trans* e os ácidos graxos essenciais pelo sistema enzimático responsável pela produção de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (MAHFOUZ, SMITH, KUMMEROW 1984).

5.1 PESO DOS ANIMAIS

5.1.1 ENSAIO 1

Durante as quatro semanas de duração do primeiro ensaio, nas quais os animais tiveram livre acesso à dieta, fez-se o registro semanal do controle de peso e a curva de crescimento dos animais pode ser visualizada na **Figura 7**.

Não houve diferença estatística no ganho de peso médio dos animais entre os dois grupos após quatro semanas de consumo das dietas controle e experimental (Trans 1), apesar da quantidade limítrofe em ácidos graxos essenciais e a presença de ácidos graxos *trans*. Provavelmente, porque o ácido linoléico não se encontrava deficiente na dieta experimental, cobrindo, desta forma, as necessidades do organismo em crescimento. A deficiência deste ácido graxo na dieta acarreta alteração no crescimento e menor ganho de peso (CHARDIGNY, BONHMME, SÉBÉDIO *et al.*, 1998).

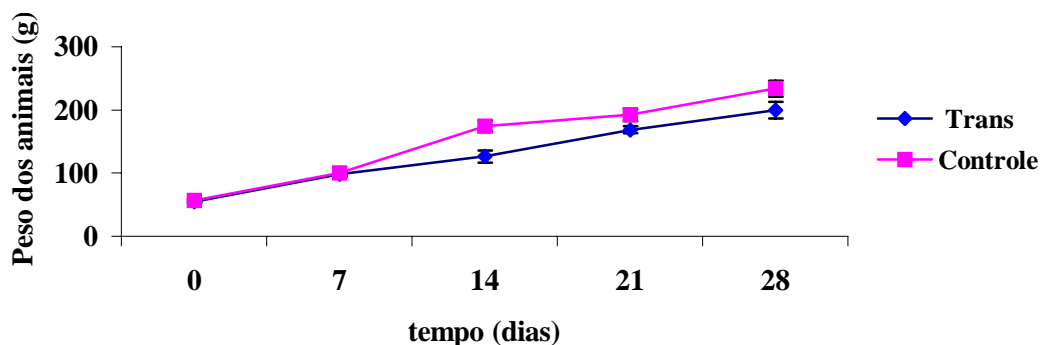


Figura 7 – Evolução do peso dos animais dos grupos controle (n=8) e experimental (n=8) do ensaio 1 durante 4 semanas.

5.1.2 ENSAIO 2

O primeiro ensaio não permitiu que se evidenciasse alteração no crescimento dos animais que receberam ácidos graxos *trans* e ácidos graxos essenciais em quantidades restritas. Quatro semanas não são suficientes para que os animais tornem-se adultos. Desta forma, este segundo ensaio foi realizado a fim de verificar o efeito de um consumo mais prolongado da dieta.

São considerados adultos jovens os ratos machos pesando entre 200 e 500g, que em geral alcançam a fase adulta com 9 a 14 semanas de nascimento ou 100 dias (KRINKE, 2000).

A duração do segundo ensaio foi de oito semanas, período em que os animais atingiram aproximadamente 300g. A dieta experimental foi semelhante à avaliada no primeiro ensaio. O crescimento dos animais também neste ensaio, mesmo com maior duração no consumo alimentar, não apresentou diferença significativa (**Figura 8**).

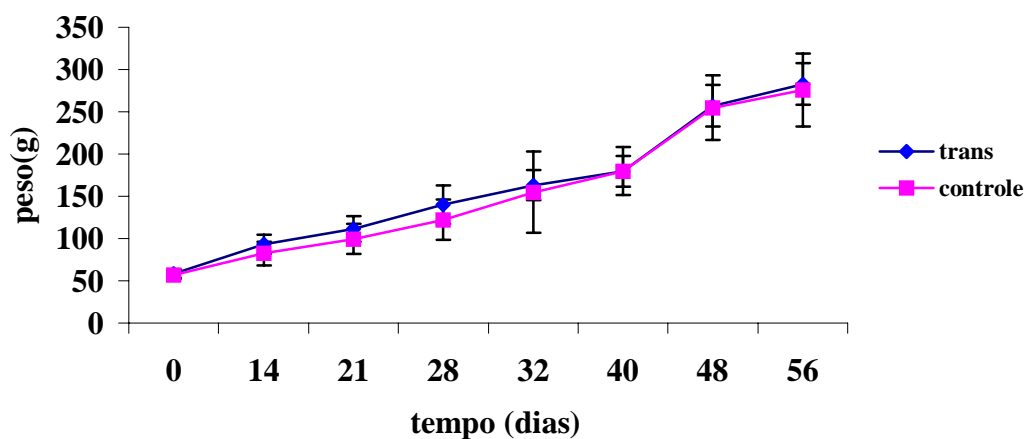


Figura 8 – Evolução de peso dos animais dos grupos controle (n=12) e experimental (n=12) do ensaio 2 durante 8 semanas.

5.1.3 ENSAIO 3

No ensaio 3, as variações em relação aos demais ensaios foram as concentrações dos ácidos graxos essenciais e as dos ácidos graxos *trans*.

Foram utilizados três grupos de animais, sendo um grupo controle, e dois grupos experimentais, sendo que um deles (Grupo AGE+t) recebeu uma dieta adequada em ácidos graxos essenciais com quantidade moderada de ácidos graxos *trans* (21%) e um segundo grupo experimental (Trans 3), que recebeu uma dieta contendo como única fonte lipídica gordura vegetal parcialmente hidrogenada (39% de ácidos graxos *trans*), deficiente em ácidos graxos essenciais (**Tabela 3**).

Neste, como nos demais ensaios, não foi observada diferença na curva de crescimento dos animais (**Figura 9**) medido pela evolução do peso.

O consumo alimentar foi semelhante entre os animais dos dois experimentos com duração de oito semanas, portanto o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar não foram afetados conforme indica a **Tabela 4**.

Os nossos resultados para o peso dos animais foram semelhantes aos obtidos por ABDULLAH & AL-OTHMAN (2000), que também não encontraram diferenças nos ganhos de peso de ratos recém desmamados alimentados com dietas isoenergéticas, porém com diferentes tipos de gorduras.

Estes estudos indicam que dietas isoenergéticas não afetam o crescimento dos animais, mesmo que contenham ácidos graxos *trans* (ABDULLAH & AL-OTHMAN, 2000, PALOMBO, DEMICHELE, LIU *et al.*, 2000).

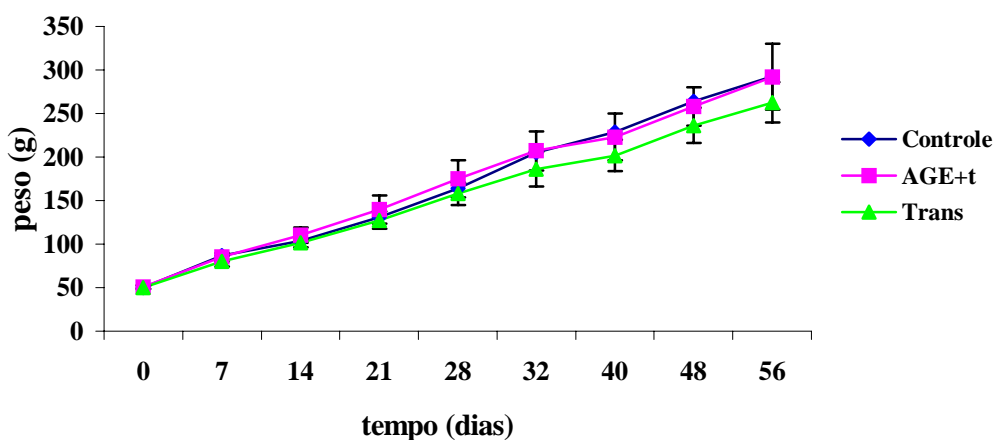


Figura 9 – Evolução do peso dos animais dos grupos controle (n=12) e experimentais (n=12 para cada grupo), AGE+t e *Trans* do ensaio 3 durante 8 semanas.

Esperava-se que os animais que foram alimentados com dieta deficiente nos ácidos linoléico e α -linolênico (Grupo Trans 3) desenvolvessem uma curva de crescimento diferente dos demais grupos, no entanto,

apresentaram ganho de peso semelhante aos grupos AGE+t e controle 3. Contudo, foram verificados queda acentuada de pêlos e o aparecimento de lesões na pele, principalmente na cauda. Vale salientar que estes sinais começaram a surgir nos animais do grupo *Trans 3*, a partir da quinta semana, sem, contudo, terem sido constatados em todos os animais até o final do experimento.

Tabela 4 – Ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar dos grupos controle e experimentais dos ensaios 2 e 3.

	Ensaio 2*		Ensaio 3*		
	Grupo Controle	Grupo <i>Trans 2</i>	Grupo Controle	Grupo AGE+t	Grupo <i>Trans 3</i>
Peso inicial (g)	56,9 ± 3,3	56,6 ± 3,8	49,9 ± 1,1	50,52 ± 1,0	50,24 ± 1,6
Peso final (g)	299,5 ± 27,5	296,2 ± 18,5	318,0 ± 6,5	318,4 ± 11,6	315,9 ± 23,8
Consumo diário (g)	14,6 ± 4,6	14,7 ± 3,7	14,6 ± 1,1	14,55 ± 1,7	14,3 ± 2,3
Ganho de peso (g)	241,7 ± 29,1	239,6 ± 24,6	268,1 ± 7,3	267,9 ± 11,7	265,7 ± 24,0
Consumo 55 dias (g)	802,0 ± 19,9	809,0 ± 12,2	815,0 ± 12,2	815,0 ± 18,8	800,0 ± 14,8
CEA**	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,03

* Média ± desvio-padrão

** Coeficiente de eficácia alimentar (ABDULLAH & AL-OTHMAN, 2000).

$$CEA^{**} = \frac{\text{Ganho de Peso (g)}}{\text{Consumo da dieta}}$$

Dos doze animais do grupo *Trans 3*, do início do ensaio, um não sobreviveu e seis deles desenvolveram sinais de deficiência de ácidos graxos essenciais. É possível que um consumo mais prolongado da dieta possibilitasse visualizar melhor tais sinais, pois poderia esgotar as reservas dos ácidos graxos

essenciais após a 11a. semana sob a ação da dieta deficiente (CUNNANE & ANDERSON, 1997).

Segundo LEAT (1989) a alteração no crescimento em função da deficiência em ácidos graxos essenciais precisa ocorrer necessariamente durante algumas gerações, o que não ocorreu neste estudo. Além disso, a deficiência do ácido α -linolênico não afeta o crescimento se o ácido linoléico estiver presente na dieta, como ocorreu nos animais dos grupos experimentais dos ensaios 1 e 2. Todavia, no grupo Trans 3 não havia sequer quantidades limítrofes (*borderline*) adequadas para este ácido graxo. É possível que o estado nutricional dos animais no momento do desmame, tenha influenciado positivamente esta evolução no crescimento em função das reservas adquiridas no período pré-natal e durante a lactação.

5.2 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS TECIDOS

Fortes evidências sugerem que a deposição dos ácidos graxos nos tecidos é influenciada pela energia ingerida e pela composição dos lipídios da dieta (CHA & JONES, 1996).

Foram utilizadas dietas isoenergéticas, a fim de proporcionar o mesmo potencial de deposição para os ácidos graxos nos tecidos, variando somente nas concentrações dos ácidos graxos *trans* e dos ácidos graxos essenciais.

Os ácidos graxos *trans* são incorporados em tecidos e fluidos humanos e de animais, tais como no coração, fígado, tecido adiposo, plasma e leite materno. As quantidades incorporadas, geralmente, refletem o perfil dos ácidos graxos da dieta, uma vez que estes ácidos graxos não são sintetizados pelos animais não ruminantes.

Todos os tecidos estudados incorporaram os ácidos graxos *trans* das dietas avaliadas (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Total de ácidos graxos *trans* incorporados nos tecidos dos grupos experimentais dos ensaios 1, 2 e 3 expressos em % da fração lipídica.

GRUPOS	% AGt*	TECIDOS				
		PLASMA	TECIDO ADIPOSEO	FIGADO	CÉREBRO	CORAÇÃO
Trans 1	33	12,53 ± 2,1	24,86 ± 2,8	12,59 ± 0,9	0,37 ± 0,06	**
Trans 2	33	12,61 ± 2,9	20,20 ± 0,5	13,96 ± 1,1	0,47 ± 0,06	11,16 ± 2,7
Trans 3	38	19,76 ± 1,8	26,28 ± 3,3	13,78 ± 1,3	0,30 ± 0,06	13,43 ± 0,6
AGE+t	22	11,58 ± 1,2	16,02 ± 1,0	8,21 ± 0,16	0,42 ± 0,01	7,64 ± 1,0

(*) Concentração de ácidos graxos *trans* na dieta. (**) Não foi determinado o perfil dos ácidos graxos do tecido cardíaco no primeiro experimento. **Grupo *trans* 1** e **Grupo *trans* 2** – 33% de ácidos graxos *trans* + quantidades limítrofes de AGE/ **Grupo AGE+t** – quantidades adequadas de AGE + 22% de ácidos graxos *trans*/ **Grupo *trans* 3** – 38% de ácidos graxos *trans* e deficiente em AGE. Média ± desvio padrão.

As quantidades incorporadas pelo plasma, coração e tecido adiposo refletiram as quantidades de isômeros *trans* da dieta. Em resposta à dieta Trans 3, a mais rica em ácidos graxos *trans*, proporcionou a maior incorporação de ácidos graxos *trans* no tecido adiposo, seguido do plasma e do coração, respectivamente. O cérebro foi o tecido com menor nível de incorporação para todas as dietas.

O fígado aparentemente não foi afetado pela quantidade dos isômeros *trans* na dieta ou pela duração do consumo, mas por outros fatores, talvez relacionados à concentração do ácido linoléico, uma vez que o grupo que recebeu quantidades adequadas de ácidos graxos essenciais apresentou a menor incorporação.

Os resultados obtidos nos três ensaios revelam que os ácidos graxos da dieta são incorporados em todos os tecidos de ratos, entretanto os tecidos estudados não são suscetíveis, na mesma intensidade, a esta deposição.

5.2.1 TECIDO ADIPOSO

No tecido adiposo, ocorreu a maior incorporação dos ácidos graxos *trans* em todos os grupos experimentais. Esta deposição pode estar relacionada à sua característica de servir como reservatório de energia na forma de triacilgliceróis.

Esta característica lhe confere também um importante papel como marcador bioquímico para avaliação dos ácidos graxos consumidos, principalmente para os ácidos graxos *trans* e os ácidos graxos essenciais (GARDLAND, SACKS, COLDITZ *et al.*, 1998), pelo fato de não serem sintetizados pelo organismo e refletirem somente a composição da dieta, tanto em humanos (PORTILLO, TUEROS, PERONA *et al.*, 1999, BAYLIN, KABAGAMBE, SILES *et al.*, 2002) como em ratos (BOUÉ, COMBE, ENTRESSANGLES *et al.*, 2000, MORGADO, SANHUEZA, GALLEGUILLOS *et al.*, 1999).

A **Tabela 6** apresenta o perfil de ácidos graxos do tecidos adiposo intra-abdominal dos animais estudados. Foi observada uma alteração do perfil de ácidos graxos dos tecidos dos animais dos grupos experimentais em função da incorporação dos ácidos graxos *trans*.

Os ácidos graxos *trans* apresentaram correlação positiva ($r=0,85$) com a concentração da dieta. Esta correlação não foi mais intensa provavelmente porque a diferença entre os níveis de ácidos graxos *trans* nas dietas não tenha sido grande o suficiente para que se verificasse uma maior deposição.

Durante o desenvolvimento até a maturidade, a natureza e o conteúdo lipídico das células adiposas podem variar, principalmente, porque há dois tipos de tecido adiposo bioquimicamente distintos, o tecido adiposo branco e o marrom. Comparativamente, o tecido adiposo branco serve como reservatório energético e o marrom, para o controle da temperatura corpórea. Em geral, o

tecido adiposo marrom é predominante em recém nascidos e em prematuros, período em que grandes perdas no calor corpóreo têm importante significância fisiológica (BODY, 1988), se diferencia também pela maior concentração de fosfolípido do que de triacilglicerol.

Considerando que os animais mais jovens (quatro semanas de idade) se encontravam ainda em crescimento e que a composição do tecido adiposo pode variar com a idade, é possível que a deposição dos ácidos graxos *trans* tenha se apresentado maior pela própria necessidade do tecido de uma energia prontamente metabolizável.

Reforçando esta hipótese, verificou-se que não houve um efeito de acúmulo dos isômeros *trans* em função da duração do consumo da dieta quando comparados os ensaios 1 e 2 ($P \leq 0,01$), mas um comportamento inverso. O tecido dos animais que tiveram um consumo mais prolongado da mesma dieta apresentou uma redução na concentração dos isômeros *trans*. Nossos resultados sinalizam que pode haver uma maior afinidade dos ácidos graxos *trans* pelos fosfolípidos do tecido adiposo, considerando a predominância desta classe lipídica no período pós-desmame em relação à elevada concentração de triacilglicerol no animal adulto e a menor incorporação dos isômeros no tecido do grupo Trans 2.

O valor total (somatório) dos ácidos graxos *trans* inclui os isômeros geométricos dos monoenos e dienos de cadeia com 18 átomos de carbono. A deposição dos isômeros *trans* no tecido do grupo AGE+t foi a menor, em relação aos tecidos dos animais dos demais grupos experimentais, até mesmo em relação ao grupo Trans 1 que consumiu a dieta por um período menor. Esta menor incorporação pode estar relacionada à menor oferta dos isômeros na dieta, e ainda pela presença do ácido linoléico.

O consumo de dietas ricas em isômeros *trans* (mais do que 33% da fração lipídica) apresenta um efeito negativo sobre a síntese de ácidos graxos polinsaturados, quando a concentração de ácido linoléico é inferior a 14% da fração lipídica da dieta (ZEVENBERGER, HOUSTMÜLLER & GOTTENBOS, 1988; HOY & HOLMER, 1990). A dieta do grupo AGE+t continha aproximadamente 27% de ácido linoléico (**Tabela 3**), estando acima do valor considerado de risco para a síntese de ácidos graxos polinsaturados.

O tecido adiposo não metaboliza estes ácidos graxos, como o fígado. É possível que a deposição do ácido linoléico, neste grupo, tenha sido preferencial em relação aos ácidos graxos *trans* em função da sua maior concentração na dieta. O coeficiente de correlação entre o ácido linoléico da dieta e a deposição no tecido adiposo foi de $r = 0,99$, ($Y = 0,8026X + 2,0074$; $R^2 = 0,9809$). Sendo X a concentração o ácido linoléico na dieta e Y a concentração no tecido adiposo dos animais dos grupos experimentais.

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos grupos controle e experimentais dos ensaios 1, 2 e 3.

Ácidos Graxos %	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		
	Grupo controle	Grupo Trans 1	Grupo controle	Grupo Trans 2	Grupo controle	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C12:0	0,24 ± 0,1 ^b	0,19 ± 0,03 ^b	0,08 ± 0,0 ^{ns}	0,09 ± 0,01 ^{ns}	0,08 ± 0,0 ^{ns}	0,09 ± 0,0 ^{ns}	n.d.
C14:0	1,52 ± 0,1 ^b	1,82 ± 0,14 ^b	1,02 ± 0,2 ^b	1,11 ± 0,1 ^b	0,91 ± 0,1 ^{ns,b}	0,81 ± 0,1 ^{ns,a}	1,43 ± 0,2 ^{a,b}
C16:0	25,38 ± 3,1 ^{ns}	23,24 ± 1,9 ^{ns}	18,85 ± 2,2 ^{ns}	18,78 ± 1,3 ^{ns}	18,12 ± 2,1 ^{b,a}	15,43 ± 1,4 ^{b,a}	22,95 ± 1,9 ^{a,a}
C18:0	2,48 ± 0,3 ^a	3,52 ± 0,3 ^{a,a}	2,77 ± 0,2 ^a	4,97 ± 0,4 ^{b,a}	2,78 ± 0,2 ^{na,s}	4,46 ± 0,2 ^{a,a}	4,59 ± 0,3 ^{ns,a}
C21:0	2,57 ± 0,3	2,27 ± 0,1	2,93 ± 0,2	1,76 ± 0,2	2,68 ± 0,2	2,00 ± 0,1	2,30 ± 0,2
Σ Saturados	29,62 ± 3,3	28,86 ± 1,8	25,74 ± 2,2^{ns}	26,87 ± 1,5^{ns}	22,19 ± 2,3^{ns,a}	20,90 ± 1,4^{ns,a}	28,97 ± 2,2^{a,a}
C16:1	6,99 ± 1,0 ^b	5,51 ± 0,8 ^b	3,69 ± 1,1 ^b	2,67 ± 0,4 ^b	2,94 ± 0,8 ^{b,a}	1,89 ± 0,4 ^{b,a}	4,41 ± 0,5 ^{a,a}
C18:1 9c	26,10 ± 1,4 ^a	19,64 ± 1,7 ^a	25,89 ± 0,7 ^a	33,10 ± 0,7 ^a	26,76 ± 0,7 ^{ns,a}	27,86 ± 1,5 ^{ns,ns}	31,37 ± 3,8 ^{ns,a}
Outros C18:1 cis	0,82 ± 0,2 ^a	4,28 ± 0,7 ^a	2,35 ± 0,1 ^a	7,10 ± 0,7 ^a	0,48 ± 0,0 ^{a,a}	2,37 ± 0,1 ^{a,a}	6,03 ± 0,9 ^{a,a}
Σ Monoinsaturados	34,09 ± 2,0^{ns}	29,57 ± 2,3^{ns,a}	32,03 ± 1,3^a	43,34 ± 1,0^{a,a}	30,17 ± 1,5^{ns,b}	48,15 ± 0,5^{ns,a}	24,96 ± 1,8^{b,a}
C18:2	31,05 ± 3,9 ^a	9,11 ± 0,6 ^{a,b}	40,86 ± 3,4 ^a	8,39 ± 0,4 ^{a,b}	42,26 ± 3,4 ^{a,a}	26,97 ± 0,9 ^{a,a}	1,12 ± 0,1 ^{a,a}
C18:3 ω-3	0,31 ± 0,0 ^{ns}	n.d.	0,29 ± 0,0 ^{ns}	n.d.	0,53 ± 0,0 ^a	0,88 ± 0,1 ^a	n.d.
C20:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,42 ± 0,1 ^a	0,17 ± 0,0 ^a	n.d.
Σ Polinsaturados	31,37 ± 4,0^a	9,11 ± 0,6^a	41,15 ± 3,4^a	8,39 ± 0,4^a	43,40 ± 3,5^a	28,08 ± 0,9^a	1,12 ± 0,1^a
C18:1 9t	n.d.	25,73 ± 2,6 ^a	n.d.	18,45 ± 0,6 ^a	n.d.	14,87 ± 1,9 ^a	24,77 ± 3,2 ^a
Outros trans	n.d.	2,35 ± 0,1 ^a	n.d.	1,75 ± 0,6 ^a	n.d.	n.d.	n.d.
C18:2 tt	n.d.	1,16 ± 0,1 ^{ns}	n.d.	1,06 ± 0,1 ^{ns}	n.d.	0,57 ± 0,0 ^a	1,51 ± 0,1 ^a
C18:2 tc	n.d.	0,93 ± 0,1 ^a	n.d.	0,63 ± 0,1 ^a	n.d.	0,58 ± 0,0 ^a	0,94 ± 0,1 ^a
Σ trans	n.d.	28,08 ± 2,6	n.d.	20,20 ± 0,5	n.d.	16,02 ± 0,1	26,28 ± 3,3
N.I.	4,93 ± 0,6	4,37 ± 0,6	1,07 ± 0,3	2,35 ± 0,7	4,24 ± 0,3	1,73 ± 1,0	3,90 ± 1,6

Ensaio 1 – Teste de Mann-Whitney (Controle 1 X Trans 1). Ensaio 2 – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). Ensaio 3 – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). N.I. – não identificado/ n.d. – não detectado/ n.s. – não significante. (a) P ≤ 0,01/ (b) P ≤ 0,05. – Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Os principais ácidos graxos do tecido adiposo humano e de ratos são o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (18:0), o ácido oléico (C18:1) e o ácido linoléico (C18:2). Com exceção do ácido linoléico os demais ácidos graxos podem ser sintetizados pelo fígado. A presença destes ácidos graxos no tecido adiposo foi menor do que na dieta. Apesar da distribuição dos ácidos graxos ter se apresentado diferente em relação à dieta, os ácidos graxos saturados totais, entre os grupos experimentais e seus respectivos controles, não apresentaram diferenças significativas, exceto para o grupo AGE+t.

O processo de deposição e mobilização dos triacilgliceróis no tecido adiposo é seletivo e dependem do tamanho da cadeia, o grau de insaturação e o isomerismo de posição de seus ácidos graxos (RACLOT, HOLM & LANGIN, 2001). Os ácidos graxos monoinsaturados e os polinsaturados (n-6) são preferencialmente incorporados nos triacilgliceróis do tecido adiposo quando comparados com os ácidos graxos saturados e os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (PERONA, PORTILHO, MACARULLA *et al.*, 2000, SUMMERS, BAME, FIELDING *et al.*, 2000). Segundo WEBER, KLEIN & MUKHERJEE (2002) apesar do “pool” endógeno de ácidos graxos e numerosos processos fisiológicos que ocorrem durante o transporte dos triacilgliceróis de cadeia longa e seus derivados, via mucosa intestinal, linfa e sangue até ao tecido adiposo a composição das espécies moleculares dos triacilgliceróis da dieta é refletida amplamente sobre as espécies moleculares que compõem o tecido adiposo de ratos.

Geralmente, o tecido adiposo não reflete na sua composição a presença de elevadas quantidades de ácidos graxos saturados da dieta. Uma alta proporção de ácidos graxos saturados na dieta pode ser convertida em ácidos graxos monoinsaturados, pela dessaturação do ácido esteárico em ácido oléico (SUMMERS, BAMES, FIELDING *et al.*, 2000). Este efeito pode ser visualizado nos animais dos grupos controle que apresentaram maior concentração de C18:1 *cis* e foi substancialmente aumentada nos

tecidos dos animais dos grupos experimentais Trans 2 e Trans 3 dos ensaios com duração de oito semanas. Os animais do grupo Trans 1 apresentaram redução no ácido oléico em relação ao seu controle, provavelmente em função da maior incorporação de ácido graxo *trans*. Já, para o grupo AGE+t não houve diferença significativa em comparação ao seu controle, dando indícios de que as quantidades adequadas dos ácidos graxos essenciais não estimularam a síntese do ácido oléico pela $\Delta 9$ dessaturase. Uma justificativa provável surge a partir deste resultado: a acilação dos ácidos graxo *trans*, compensaria a menor oferta de ácido linoléico pela dieta. Pois o somatório dos valores dos ácidos graxos *trans* com o do ácido linoléico resulta em valor semelhante à concentração do C18:2 dos grupos controles.

Em suma, o tecido adiposo apresenta uma maior deposição dos ácidos graxos *trans* que é diretamente proporcional à sua concentração na dieta. Além disso, o ácido linoléico em quantidades adequadas teve uma forte influência na menor deposição no tecido dos animais do grupo AGE+t.

Os nossos resultados para o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo também estão em consonância com os encontrados por BERRY (1997), ou seja, as concentrações dos ácidos graxos depositados no tecido adiposo são em geral proporcionais à composição da dieta, mas também varia com a estrutura e o grau de insaturação.

Foi possível detectar, nos grupos experimentais a presença de isômeros *trans* do C18:2 em concentrações superiores ao fornecido pela dieta. O “*turnover*” do ácido linoléico, no tecido adiposo humano, pode levar de 1 a 2 anos (BEYNEN, HERMUS, & HAUTVAST, 1980), assim considerado um “*turnover*” lento. Portanto, a presença deste ácido graxo não reflete necessariamente um consumo recente. Em geral, o tecido adiposo é utilizado como biomarcador justamente por esta característica, ou seja, retratar um consumo menos recente. Desta forma, a quantidade de dienos com configuração *trans* encontrada nos tecidos é o resultado do consumo

durante o período dos ensaios. Entretanto, o grupo que teve o menor consumo dos isômeros do C18:2 apresentou também a maior quantidade destes ácidos graxos (**Tabela 6**). Os menores valores foram para o grupo Trans 3 que consumiu a dieta mais rica em ácidos graxos *trans* e por maior período de tempo.

No presente estudo, o ácido graxo *trans* de maior concentração na dieta foi o ácido elaídico (C18:1 9*t*), uma vez que se utilizou apenas gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

SANTORA, PALMQUIST & ROEHRIG (2000) demonstraram que o ácido *trans*-vacênico (C18:1 11*t*) pode ser dessaturado a um conjugado do ácido linoléico. Ácido linoléico conjugado é o termo utilizado para os isômeros do ácido linoléico. É possível encontrar no tecido adiposo humano até 25% de ácido graxo C18:2 com pelo menos uma dupla ligação *trans*. Basicamente estão presentes na gordura do leite.

Diante das evidências é possível que os isômeros detectados no tecido adiposo tenham sido mobilizados e metabolizados no fígado e retornados para o próprio tecido adiposo. E que o “*turnover*” dos ácidos graxos *trans* pode variar com a estrutura do ácido graxo, não tendo necessariamente todos eles uma renovação lenta. O mecanismo desta mobilização depende, entre outros fatores, das propriedades da lipase hormônio sensível, podendo então explicar a mobilização seletiva dos ácidos graxos das células adiposas. Esta seletividade pode afetar o suprimento dos ácidos graxos para os tecidos (RACLOT, 2003).

LEMAIRE, KING, RAGHUNATHAN *et al.* (2002) avaliaram a associação do consumo de ácidos graxos *trans* e o risco de ataque cardíaco primário e verificaram que o conteúdo de ácidos graxos *trans* apresentou uma associação positiva, mas foi a concentração do C18:2 *trans* da membrana celular de eritrócitos que demonstrou a maior correlação.

Apesar de extensamente estudados, os efeitos dos ácidos graxos *trans* não são facilmente identificados, considerando a controvérsia nos resultados metabólicos que ainda persistem. O mesmo ácido graxo que possui uma correlação positiva com doenças cardíacas (BAYLIN, KABAGAMBE, ASCHERIO *et al.*, 2003) é também ativo na inibição de outros processos patológicos, considerando que entre os múltiplos papéis dos ácidos graxos conjugados encontra-se o de inibir determinados tipos de câncer (SANTORA, PALMQUIST & ROEHRIG, 2000).

5.2.2 PLASMA

É bem aceito que a avaliação do perfil de ácidos graxos do plasma e de depósitos de gordura (tecido adiposo) é um importante meio para se avaliar as condições do organismo, com vistas a se definir ou indicar diagnósticos (SEPPÄNEN-LAAKSO & HILTUNEN, 2002).

O plasma tem um importante papel no transporte de substâncias e nutrientes no organismo. A concentração e a composição dos ácidos graxos no plasma é influenciada pela absorção da gordura dietética e/ou pela liberação dos ácidos graxos do tecido adiposo (ZHOU & NILSSON, 2001).

As variações que ocorrem na composição do plasma quanto ao perfil em ácidos graxos refletem principalmente na composição das lipoproteínas. Há uma composição considerada “normal” e que pode ser alterada por muitos fatores e que indicam a condição de “saúde” do organismo. Um desses fatores é a composição da gordura da dieta (BANERJEE, SAHA & DUTTA, 1992).

Utilizando o grupo controle dos ensaios como referência, averiguou-se uma certa “estabilidade” nos ácidos graxos saturados dos ensaios 1 e 2 em que foi avaliada a influência da duração do consumo alimentar, quatro e oito semanas de consumo, respectivamente, de uma mesma dieta. As alterações nos teores de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados foram semelhantes entre os grupos experimentais, apresentando aumento

nos ácidos graxos monoinsaturados e diminuindo nos polinsaturados com incorporação de ácidos graxos *trans* (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos do plasma dos grupos controle e experimentais dos ensaios 1, 2 e 3.

Ácidos Graxos %	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		
	Grupo controle 1	Grupo Trans 1	Grupo controle 2	Grupo Trans 2	Grupo controle3	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C 8:0	0,58 ± 0,1	0,73 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C12:0	0,44 ± 0,1	0,54 ± 0,1	n.d.	0,72 ± 0,0	n.d.	n.d.	n.d.
C14:0	0,97 ± 0,2 ^{ns}	1,08 ± 0,2 ^{ns}	1,07 ± 0,2 ^{ns}	1,31 ± 0,7 ^{ns}	0,60 ± 0,1 ^{ns,a}	0,67 ± 0,1 ^{ns,a}	1,06 ± 0,1 ^{a,a}
C16:0	18,35 ± 0,9 ^b	20,10 ± 2,2 ^b	20,75 ± 1,7 ^{ns}	19,51 ± 2,7 ^{ns}	16,48 ± 1,3 ^{ns,a}	16,87 ± 1,4 ^{ns,a}	24,99 ± 3,4 ^{a,a}
C18:0	11,30 ± 0,9 ^{ns}	11,17 ± 0,8 ^{ns}	11,56 ± 2,2 ^{ns}	11,04 ± 2,7 ^{ns}	8,79 ± 1,5 ^{ns}	10,23 ± 1,4 ^{ns}	9,37 ± 1,1 ^{ns}
Σ Saturados	30,62 ± 1,6^{ns}	32,35 ± 2,4^{ns}	33,25 ± 3,7^{ns}	32,50 ± 3,2^{ns}	25,87 ± 2,0^{ns,a}	27,77 ± 2,6^{ns,a}	36,64 ± 2,5^{a,a}
C16:1	0,96 ± 0,2 ^a	1,27 ± 0,5 ^A	0,78 ± 0,2 ^a	1,49 ± 0,7 ^a	0,53 ± 0,2 ^{ns,a}	0,65 ± 0,3 ^{ns,a}	1,93 ± 0,5 ^{a,a}
C18:1 9c	15,41 ± 1,6 ^a	17,15 ± 1,8 ^a	15,59 ± 2,3 ^a	22,80 ± 2,3 ^a	13,73 ± 2,2 ^{ns,a}	14,32 ± 2,4 ^{ns,a}	25,12 ± 2,2 ^{a,a}
Outros C18:1 cis	1,59 ± 0,4 ^a	3,45 ± 0,5 ^a	1,62 ± 0,3 ^a	3,94 ± 0,6 ^a	1,72 ± 0,2 ^{a,a}	2,76 ± 0,3 ^{a,a}	7,49 ± 0,7 ^{a,a}
Σ Monoinsaturados	16,11 ± 2,0^a	21,40 ± 1,8^a	17,20 ± 2,2^a	28,23 ± 1,9^a	15,98 ± 2,6^{ns,a}	17,73 ± 2,8^{ns,a}	34,55 ± 2,5^{a,a}
C18:2	30,95 ± 2,4 ^a	17,87 ± 2,7 ^a	32,43 ± 3,7 ^a	16,21 ± 1,4 ^a	38,31 ± 2,6 ^{a,a}	26,88 ± 3,1 ^{a,a}	5,37 ± 1,5 ^{a,a}
C18:3 ω-3	1,87 ± 0,4 ^a	0,81 ± 0,2 ^a	1,90 ± 0,3 ^a	0,67 ± 0,3 ^a	2,00 ± 0,4 ^a	1,35 ± 0,4 ^a	n.d.
C20:4	14,16 ± 1,8 ^a	10,32 ± 1,7 ^a	14,21 ± 3,3 ^a	8,92 ± 2,5 ^a	14,35 ± 1,8 ^{a,a}	12,69 ± 3,0 ^{a,a}	2,32 ± 0,7 ^{a,a}
C22:5	1,18 ± 0,7	1,38 ± 0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C22:6	1,86 ± 0,7 ^{ns}	1,58 ± 0,4 ^{ns}	n.d.	0,93 ± 0,1 ^{ns}	1,14 ± 0,3 ^{ns}	1,23 ± 0,2 ^{ns}	n.d.
Σ Polinsaturados	49,58 ± 3,2	31,64 ± 4,0	48,30 ± 3,9	26,73 ± 3,3	55,80 ± 2,5^{a,a}	42,00 ± 3,9^{a,a}	7,69 ± 2,2^{a,a}
Σ Trans (C18:1)	n.d.	12,53 ± 2,1 ^{ns}	n.d.	12,61 ± 2,9 ^{ns}	n.d.	11,58 ± 1,2 ^{ns}	19,76 ± 1,8 ^a
N.I.	3,69 ± 1,1	2,09 ± 1,3	1,24 ± 1,9	0,0	2,06 ± 0,8	0,92 ± 0,0	1,36 ± 0,6

Ensaio 1 – Teste de Mann-Whitney (Controle 1 X Trans 1). **Ensaio 2** – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significante. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05. – Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Os ácidos graxos *trans* são ativamente incorporados no plasma (SEPPANEN-LAAKO, LAAKSO, BACKLUN *et al.*, 1996). Em estudos com óleo de peixe parcialmente hidrogenado, MORGADO, SANHUEZA, GALLEGUILLOS *et al.* (1999) verificaram que esta incorporação pode ocorrer em 40 dias de consumo da dieta no plasma de ratos adultos. Em humanos, a modulação do perfil lipídico do plasma pode ocorrer em apenas 14 dias (JUDD, CLEVIDENCE, MUESING *et al.*, 1994). Nossos resultados indicaram uma incorporação de aproximadamente 12% dos isômeros *trans* em apenas 28 dias de experimento (**Tabela 7**).

O prolongamento do consumo de uma dieta rica em ácidos graxos *trans* e restrita em ácidos graxos essenciais não aumentou a concentração plasmática dos isômeros *trans*, sugerindo que não houve acúmulo dos isômeros. Nossos valores foram semelhantes (11,47%) aos encontrados por MOREIRA (1997) em 56 dias de consumo de uma dieta contendo aproximadamente 37% de ácidos graxos *trans*.

Foram encontradas diferenças, em um nível de significância de $P \leq 0,001$, para o grupo *Trans* 3 em relação aos demais grupos, indicando que a maior concentração dos isômeros *trans* na dieta e a deficiência dos ácidos graxos essenciais proporcionou uma maior substituição pelos ácidos graxos *trans*.

O ácido oléico (C18:1 9c) foi o ácido graxo com maior aumento entre os monoinsaturados e a redução do ácido linoléico, a responsável pela diminuição dos ácidos graxos polinsaturados.

A diminuição do ácido linoléico pode estar relacionada à menor oferta pela dieta, mas também à maior eficiência na síntese de ácidos graxos polinsaturados pelo fígado. A razão C18:2/C20:4 foi de aproximadamente 2, até mesmo no grupo *Trans* 3 que recebeu a menor quantidade de ácido linoléico, sugerindo que a taxa de conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico foi mantida independente da concentração de ácidos graxos *trans* na dieta. A concentração de ácido araquidônico, no

plasma dos animais estudados, foi de 50% em relação ao ácido linoléico. Desta forma, a diferença encontrada ($P \leq 0,01$) entre os grupos controles e grupos experimentais dos respectivos ensaios, também está mais relacionada à oferta de ácido linoléico pela dieta do que pela inibição competitiva da atividade do sistema enzimático envolvido na síntese dos ácidos graxos de cadeia longa pelos ácidos graxos *trans*.

A despeito da diferença apresentada com relação ao grupo Trans 3, o perfil plasmático de ácidos graxos do grupo AGE+t não diferenciou estatisticamente dos grupos Trans 1 e 2, reforçando que as possíveis alterações no metabolismo do ácido linoléico em função da presença dos ácidos graxos *trans*, é minimizada por concentrações adequadas de ácidos graxos essenciais.

Nos três ensaios, foi verificado aumento de aproximadamente 50% na concentração do ácido oléico nos grupos experimentais, exceto no grupo AGE+t que não apresentou diferença significativa para este ácido graxo. As dietas apresentaram concentrações equivalentes para o C18:1 9c (**Tabela 2**). Não justificando assim, as diferenças encontradas. Este aumento pode estar relacionado a uma elevação na atividade da $\Delta 9$ dessaturase sobre o ácido esteárico, C18:0, que está otimizada em condições de deficiência dos ácidos graxos essenciais (WAINWRIGHT, 1997). No entanto, não houve uma ausência absoluta, pelo menos do C18:2, nas dietas experimentais. Contudo, estando outro substrato disponível para a enzima, em concentrações mais elevadas, ele será preferencialmente metabolizado. O ácido esteárico encontrava-se mais elevado nas dietas experimentais e, por esta razão, foi preferencialmente dessaturado a ácido oléico.

5.2.3 TECIDO CEREBRAL

Depois do tecido adiposo o sistema nervoso tem a segunda maior concentração de lipídios e, o seu perfil lipídico apresenta elevadas concentrações de ácidos polinsaturados de cadeia longa, principalmente o

ácido araquidônico e o ácido docosaheptaenóico. Estes dois ácidos graxos são os maiores constituintes dos fosfolípidios das células neurais. A deficiência dietética destes ácidos graxos está associada à composição alterada de organelas e membranas celulares cerebrais, a qual pode gerar mudanças nas propriedades das membranas, na atividade enzimática, de receptores celulares, transporte de substâncias através de membranas e interações celulares (CLANDININ & JUMPSEN, 1997).

De acordo com TAHIN, BLUN & CARAFOLI (1981), modificações na dieta podem induzir modificações na composição das membranas celulares e de organelas no cérebro. O desenvolvimento do cérebro não ocorre de maneira uniforme como os demais tecidos, os estágios mais críticos do crescimento do cérebro dos mamíferos ocorrem nos períodos fetal e neonatal. Por isso, lipídios consumidos durante o período pós-natal são determinantes para a estrutura e parâmetros funcionais no cérebro em desenvolvimento (CLANDININ, 1999, HONSTRA, 2001).

Foram selecionados para o experimento animais recém desmamados, com a finalidade de se acompanhar o efeito de modificações específicas na dieta quanto à concentração de ácidos graxos essenciais e de ácidos graxos *trans* sobre os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa de maior concentração no cérebro.

Com base numa possível competição metabólica entre os ácidos graxos *trans* e os ácidos graxos essenciais era esperado que as estruturas do sistema nervoso central, aqui representado pelo cérebro, pudessem ser influenciadas pela presença de ácidos graxos *trans* da dieta sobre a sua composição lipídica, mas analisando o perfil dos ácidos graxos do cérebro (**Tabela 8**), verificou-se que a deposição dos ácidos graxos *trans* foi muito menor do que nos demais tecidos estudados em todos os grupos experimentais. Nossos resultados estão em consonância com os obtidos por LARQUÉ, PÉREZ-LLAMAS, PUERTA *et al.* (2000) que avaliando os efeitos de dietas com diferentes concentrações de ácidos graxos *trans*, porém com a mesma proporção de ácido linoléico e ácido α -linolênico sobre tecidos e

fluido materno e fetal, observaram que há uma pequena incorporação dos ácidos graxos *trans* no tecido cerebral tanto das mães como dos fetos e que se manteve constante, apesar da variação do conteúdo de ácidos graxos *trans* das dietas. Demonstraram, sobretudo, que o feto fica exposto aos ácidos graxos *trans* da dieta materna, e que podem ser depositados no tecido cerebral, mas que este incorpora menos ácidos graxos *trans* do que o plasma e o fígado.

Diferenças qualitativas na gordura da dieta afetam a composição em ácidos graxos da maioria das membranas em mamíferos (WEBER, KIEWITT & MUKHERJEE, 1999). No entanto, há uma diferença na sensibilidade das membranas entre os diferentes tecidos. O tecido cerebral é menos sensível do que os tecidos periféricos, pois a barreira hematoencefálica restringe a passagem de ácidos graxos tendo conseqüentemente um “*turnover*” mais lento (MCGEE, LIEBERMAN & GREENWOOD, 1996). É possível que haja algum mecanismo protetor que limita a incorporação dos ácidos graxos *trans* no sistema nervoso central durante o período inicial do desenvolvimento (MOORE & DHOPESHWARKAR, 1980; CHA & JONES, 1996).

Nem mesmo a restrição ou ausência dos ácidos graxos essenciais do nosso estudo, aumentou a concentração dos isômeros *trans* no tecido cerebral, que sequer alterou a relação entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados.

O leite materno tem a função de fornecer os ácidos graxos polinsaturados pré-formados para os animais em desenvolvimento, desta forma, considerando a oferta adequada dos ácidos graxos polinsaturados durante o período de lactação possibilitou que os animais dos grupos experimentais mantivessem suas concentrações semelhantes aos seus controles por até 8 semanas, após o desmame, independente da concentração dos ácidos graxos essenciais e dos ácidos graxos *trans* da dieta.

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos do tecido cerebral dos grupos controle e experimentais dos ensaios 1, 2 e 3.

Ácidos Graxos %	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		
	Grupo controle 1	Grupo Trans 1	Grupo controle 2	Grupo Trans 2	Grupo controle 3	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C15:0	2,33 ± 0,1 ^{ns}	2,12 ± 0,3 ^{ns}	2,11 ± 0,1 ^{ns}	1,94 ± 0,3 ^{ns}	2,13 ± 0,1 ^{ns,a}	2,03 ± 0,3 ^{ns,a}	2,06 ± 0,1 ^{a,a}
C16:0	18,84 ± 0,3 ^{ns}	19,28 ± 0,3 ^{ns}	18,95 ± 0,4 ^{ns}	19,21 ± 0,6 ^{ns}	20,77 ± 0,6 ^{ns}	21,56 ± 2,6 ^{ns}	20,83 ± 0,7 ^{ns}
C18:0	18,74 ± 0,5 ^{ns}	17,98 ± 0,7 ^{ns}	18,53 ± 0,3 ^{ns}	18,06 ± 0,4 ^{ns}	19,95 ± 0,4 ^{ns}	19,42 ± 0,4 ^{ns}	19,38 ± 0,4 ^{ns}
Σ Saturados	39,91 ± 0,6^{ns}	39,38 ± 0,7^{ns}	39,53 ± 0,4^{ns}	39,21 ± 1,0^{ns}	42,84 ± 0,5^{ns}	43,12 ± 1,6^{ns}	42,27 ± 0,8^{ns}
C16:1	0,29 ± 0,0 ^{ns}	0,29 ± 0,0 ^{ns}	0,31 ± 0,0 ^{ns}	0,31 ± 0,1 ^{ns}	n.d.	n.d.	n.d.
C17:1	2,60 ± 0,1 ^{ns}	2,35 ± 0,4 ^{ns}	1,75 ± 0,1 ^{ns}	1,52 ± 0,2 ^{ns}	2,25 ± 0,2 ^{ns}	2,29 ± 0,4 ^{ns}	2,37 ± 0,3 ^{ns}
C18:1 9c	17,29 ± 0,6 ^{ns}	17,52 ± 1,0 ^{ns}	18,15 ± 0,4 ^{ns}	18,81 ± 0,4 ^{ns}	16,37 ± 0,5 ^{ns}	17,30 ± 2,2 ^{ns}	17,54 ± 1,2 ^{ns}
Outros cis	2,85 ± 0,2 ^a	3,39 ± 0,2 ^a	3,68 ± 0,1 ^{ns}	3,86 ± 0,1 ^{ns}	3,31 ± 0,3 ^{ns}	3,57 ± 0,4 ^{ns}	3,99 ± 0,2 ^{ns}
C20:1 ω-9	1,44 ± 0,2 ^{ns}	1,46 ± 0,2 ^{ns}	1,89 ± 0,1 ^{ns}	1,95 ± 0,1 ^{ns}	1,05 ± 0,2 ^{ns}	1,20 ± 0,0 ^{ns}	1,17 ± 0,3 ^{ns}
C24:1	2,99 ± 0,1 ^{ns}	2,93 ± 0,1 ^{ns}	2,83 ± 0,1 ^{ns}	2,77 ± 0,1 ^{ns}	3,20 ± 0,1 ^{ns}	2,90 ± 0,5 ^{ns}	2,70 ± 0,1 ^{ns}
Σ Monoinsaturados	27,46 ± 0,7^{ns}	27,98 ± 1,2^{ns}	28,81 ± 0,5^{ns}	29,10 ± 0,4^{ns}	26,19 ± 0,9^{ns}	27,26 ± 2,1^{ns}	27,77 ± 1,7^{ns}
C18:2	1,11 ± 0,0 ^a	0,63 ± 0,0 ^a	1,19 ± 0,1 ^a	0,68 ± 0,2 ^a	1,40 ± 0,4 ^{ns,a}	1,21 ± 0,4 ^{ns,b}	0,41 ± 0,1 ^{a,b}
C18:3 ω-3	0,42 ± 0,0 ^{ns}	0,44 ± 0,1 ^{ns}	0,56 ± 0,1 ^{ns}	0,57 ± 0,0 ^{ns}	0,35 ± 0,0 ^{ns}	0,44 ± 0,2 ^{ns}	0,38 ± 0,1 ^{ns}
C20:4	9,80 ± 0,1 ^{ns}	9,54 ± 0,4 ^{ns}	9,45 ± 0,2 ^{ns}	9,51 ± 0,3 ^{ns}	11,21 ± 0,8 ^{ns}	10,20 ± 2,1 ^{ns}	10,26 ± 0,7 ^{ns}
C22:5	0,13 ± 0,0 ^a	0,65 ± 0,1 ^a	0,32 ± 0,0 ^a	0,76 ± 0,1 ^a	n.d.	0,59 ± 0,1 ^{ns}	1,98 ± 0,1 ^{ns}
C22:6	12,31 ± 0,4 ^{ns}	12,52 ± 0,5 ^{ns}	11,79 ± 0,3 ^{ns}	11,98 ± 0,5 ^{ns}	12,81 ± 0,9 ^{ns}	12,25 ± 2,6 ^{ns}	11,79 ± 0,8 ^{ns}
Σ Polinsaturados	23,77 ± 0,4^{ns}	23,78 ± 0,9^{ns}	23,07 ± 0,4^{ns}	23,50 ± 0,7^{ns}	25,68 ± 1,4^{ns}	24,33 ± 4,1^{ns}	24,78 ± 1,4^{ns}
C18:1 9t (Σ trans)	n.d.	0,37 ± 0,1 ^{ns}	n.d.	0,47 ± 0,1 ^{ns}	n.d.	0,42 ± 0,0 ^{ns}	0,30 ± 0,1 ^{ns}
N.I.	8,86 ± 0,9	8,59 ± 2,1	8,35 ± 0,6	7,72 ± 1,7	5,29 ± 0,9	4,87 ± 0,2	4,91 ± 0,2

Ensaio 1 – Teste de Mann-Whitney (Controle 1 X Trans 1). **Ensaio 2** – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significante. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05. – Valores expressos como média ± desvio-padrão.

CARRIÉ, CLÉMENT, JAVEL *et al.* (2000a) avaliando o efeito da deficiência em ácido α -linolênico, verificaram que os conteúdos de ácidos graxos saturados e monoinsaturados não foram afetados pela dieta. Contudo, houve um aumento de C22:5 n-6 de forma compensatória à redução do C22:6 n-3. Estes resultados são similares aos nossos, obtidos nos tecidos dos animais dos grupos experimentais.

Nossos resultados demonstraram que a associação das concentrações elevadas de ácidos graxos *trans* e restrição em ácidos graxos essenciais na dieta não alteraram de maneira expressiva os efeitos sobre o perfil de ácidos graxos polinsaturados do tecido cerebral.

WAUBEN, XING, MCCHTCHENON *et al.* (2001) obtiveram resultados do perfil lipídico do cérebro, semelhantes aos nossos. Não foi observada também uma intensificação da ação dos ácidos graxos *trans* sobre a síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, mas uma redução no aprendizado dos camundongos estudados, revelando que embora não tenham sido observadas diferenças estruturais importantes, a função neural foi afetada pela deficiência de ácidos graxos essenciais em presença de ácidos graxos *trans*.

O ácido docosahexaenóico (DHA ou C22:6 n-3) é necessário para o desenvolvimento do sistema nervoso central durante a diferenciação celular e na sinaptogênese (BOURRE, FRANÇOIS, YOUYOU *et al.*, 1989, CLANDININ & JUMPSEN, 1997) que ocorre predominantemente no período intrauterino. Em humanos, ocorre entre a 14^a. e a 20^a. semana de gestação e em ratos, em torno do 18^o. ao 20^o. dia. Neste caso, uma alimentação materna inadequada pode afetar a morfogênese do cérebro, com a probabilidade de ser prolongada no período pós-natal em função da amamentação (CLANDININ, 1999).

Segundo LARQUÉ, ZAMORA & GIL (1999) há uma relação dose-dependente entre os níveis de ácidos graxos *trans* e o perfil de ácidos

graxos no leite materno. Apesar de promoverem uma alteração na composição do leite (ASSUMPÇÃO, SANTOS, SETTA *et al.*, 2002), se houver uma ingestão concomitante de quantidades adequadas de ácidos graxos essenciais as concentrações de ácidos graxos polinsaturados não serão afetadas.

Portanto, a presença dos ácidos graxos *trans* nos primeiros momentos de vida, pode ser menos crítica sobre o desenvolvimento das funções cognitivas e de aprendizado como resultado da deficiência de DHA, se durante o período gestacional e de lactação não houver oferta de ácidos graxos *trans* em doses elevadas e restritas em ácido α -linolênico no leite materno.

5.2.4 TECIDO CARDÍACO

Avaliando o perfil dos lipídios totais do tecido cardíaco dos grupos experimentais dos ensaios 2 e 3 (**Tabela 9**) observa-se que os grupos Trans 2 e 3 apresentaram uma redução nas concentrações de ácidos graxos polinsaturados totais e a maior variação individual foi para o ácido linoléico. Apesar de haver uma correlação positiva entre as quantidades de ácido linoléico das dietas com as concentrações teciduais ($r=0,99$), os resultados do grupo Trans 2 e Trans 3 não apresentaram diferença significativa, mesmo com uma variação marcante na concentração das dietas consumidas (8% e 0,9%, respectivamente). Considerando que a dieta Trans 3 foi deficiente neste ácido graxo, o resultado sugere que há uma quantidade mínima para a manutenção das funções do tecido cardíaco e que foi mantida, não obstante, à deficiência dos ácidos graxos essenciais e da presença dos ácidos graxos *trans*. Sugerindo que possivelmente ocorra um direcionamento do ácido linoléico para o tecido cardíaco, visando a manutenção das suas funções metabólicas.

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos do tecido cardíaco dos grupos controle e experimentais dos ensaios 2 e 3.

Ácidos graxos %	Ensaio 2			Ensaio 3	
	Grupo controle 2	Grupo trans 2	Grupo controle 3	Grupo AGE+t	Grupo trans 3
C14:0	1,40 ±0,2 ^a	0,60 ±0,2 ^a	1,16 ± 0,1 ^{ns,a}	0,94 ±0,4 ^{ns}	0,64 ±0,1 ^{ns,a}
C16:0	10,98 ±2,1 ^a	11,54 ±1,8 ^a	10,65±0,6 ^{ns,a}	10,60 ±1,5 ^{n.s,b}	8,96 ±0,8 ^{b,a}
C18:0	19,86 ±2,4 ^a	15,30 ±1,5 ^a	20,15 ± 0,7 ^{b,,a}	17,42 ±0,9 ^{b,ns}	16,89 ±0,7 ^{ns,a}
C22:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,39 ±0,48
Σ Saturados	32,25 ±2,1^a	27,37 ±2,1^a	31,96 ±1,3^{a,a}	28,27 ±0,7^{a,ns}	28,88 ±1,2^{a,ns}
C16:1	1,23 ±0,2 ^a	0,87 ±0,3 ^a	0,90 ±0,1 ^{ns}	1,16 ±0,2 ^{n.s.a}	0,88 ±0,1 ^{ns,a}
C18:1 9c	9,85 ±2,3 ^a	17,39 ±1,8 ^a	9,94 ±1,4 ^{ns,b}	8,80 ±2,5 ^{ns,a}	17,52 ±0,9 ^{a,b}
Σ Monoinsaturado	11,08 ±2,3^a	18,60 ±2,2^a	10,84 ±1,4^{ns,a}	9,61 ±2,3^{ns,a}	17,39 ±0,2^{a,a}
C18:2	27,20 ±1,5 ^a	15,82 ±0,9 ^a	28,16 ±2,2 ^{a,a}	21,76 ±1,3 ^{a,a}	15,15 ±1,2 ^{a,a}
C18:3 n 3	0,80 ±0,3 ^a	0,34 ±0,1 ^a	0,66 ±0,2 ^{ns}	0,54 ±0,2 ^{ns}	n.d.
C20:4	17,33 ±3,7 ^{ns}	17,56± 2,5 ^{ns}	17,65 ±1,4 ^{ns}	19,39 ±2,9 ^{ns}	18,39 ±1,6 ^{ns}
C20:5	0,70 ±0,1 ^a	0,44 ±0,1 ^a	n.d.	0,75 ±0,1	n.d.
C22:5	1,17 ±0,3 ^a	0,66 ±0,4 ^a	1,06 ±0,2 ^a	1,63 ±0,2 ^a	n.d.
C22:6	6,46 ±1,4 ^a	4,51 ±1,1 ^a	6,32 ± 1,13 ^{a,a}	8,82 ±1,7 ^{a,a}	2,70 ±0,7 ^{a,a}
Σ Polinsaturado	53,03 ±4,0^a	39,96 ±4,8^a	53,68 ±1,1^{ns,a}	52,63 ±3,7^{ns,a}	37,59 ±1,6^{a,a}
C18:1 9t	n.d.	11,16 ±2,7	n.d.	7,64 ±0,6^a	13,43 ±1,0^a
N.I.	4,17 ±0,8	4,02 ±0,9	4,43 ±0,80	4,63 ±0,67	4,07 ±1,0

Média ± desvio-padrão

Ensaio 2 – Teste de Mann-Whitney. **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman. **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significante. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05.

Embora não tenha havido variação na concentração dos ácidos graxos polinsaturados do grupo AGE+t em relação ao seu controle, o nível de ácido linoléico também foi diminuído, provavelmente em função da redução de 50% deste ácido graxo na dieta.

A concentração da deposição dos ácidos graxos *trans* no tecido cardíaco, também no ensaio 2, variou com a quantidade presente na dieta.

Para o grupo que consumiu a dieta contendo 39%, houve uma incorporação de 13% no tecido cardíaco. Já, no grupo Trans 2, com 32% de isômeros *trans*, foi detectado 11% e no grupo com menor consumo (21%) a incorporação foi de apenas 7%. Estes resultados indicam que a concentração dos ácidos graxos *trans* na dieta tem uma forte influência na deposição dos lipídios no tecido cardíaco. Se há um acúmulo em função do consumo prolongado e idade do animal, isto não nos foi possível observar, visto que não foi analisado o perfil dos lipídios totais do primeiro experimento, com duração de quatro semanas face as oito semanas dos demais ensaios avaliados.

Em geral, se a quantidade de ácido graxo polinsaturado é insuficiente para as necessidades fisiológicas, o organismo passa a sintetizar certos ácidos graxos com o tamanho da cadeia e o grau de insaturação semelhantes aos ácidos graxos que estariam presentes em condições normais de consumo de ácidos graxos essenciais. Portanto, podem ser utilizados como “marcadores da escassez”. O melhor marcador é um produto intermediário da síntese do ácido araquidônico, o C20:3 n-9 (HORNSTRA, 2001). Nos nossos resultados, não foi detectada a presença de C20:3n-9 nos tecidos dos grupos Trans. Além disso, não houve diferença significativa nas concentrações do C20:4 n-6 (ácido araquidônico) entre os grupos controle e experimentais, indicando que a conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico desencadeada pela $\Delta 6$ dessaturase não foi inibida pela presença dos ácidos graxos *trans* ou pela escassez do C18:2.

A $\Delta 6$ dessaturase apesar de atuar nas famílias n-9, n-6 e n-3 para a síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, tem maior afinidade, entre os ácidos graxos de estrutura *cis*, primeiro para o ácido α -linolênico, seguido pelos ácidos linoléico e oléico, respectivamente (JEFFCOAT & JAMES, 1984). Não se verificou diferenças nas concentrações do ácido araquidônico entre os grupos Controle e experimental, porém o ácido docosahexaenóico (C22:6 n-3) ficou reduzido.

É possível que haja uma maior eficiência da ação da $\Delta 6$ dessaturase na síntese do C20:4 n-6 do que a do C22:6 n-3, em função da diferença na oferta de seus precursores da dieta e não somente pela afinidade pela $\Delta 6$ dessaturase. No grupo Trans 3, apesar de ter recebido uma dieta deficiente em ácido linoléico e no ácido α -linolênico eles foram incorporados.

Uma hipótese que poderia explicar, em parte, os resultados encontrados para os ácidos polinsaturados de cadeia longa presentes no tecido cardíaco, mesmo com baixa oferta dos seus precursores pela dieta, seria que os tecidos capazes de metabolizar ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa podem regular a acilação dos triacilgliceróis e fosfolipídios a fim de manter as suas propriedades físico-químicas (LARQUÉ, ZAMORA & GIL 2000b, LÖI, CHARDIGNY, ALMANZA *et al.*, 2000).

O padrão de absorção dos ácidos graxos difere, em função de vários fatores, um deles é a especificidade estereoquímica das lípases do trato gastrointestinal. Por isso o ácido esteárico é pouco absorvido, uma vez que geralmente encontra-se esterificado nos triacilgliceróis nas posições sn-1 ou sn-3 (DAUM, 1985), e durante o processo digestivo são hidrolisados os ácidos graxos nestas posições para a absorção dos 2 – monoacilgliceróis (CHRISTENSEN, Høy, BECKER *et al.*, 1995; TREADWELL, PRONCZUK & HAYES, 2002). Desta forma, uma grande porcentagem da concentração dos ácidos graxos saturados nos tecidos tem origem endógena. Este talvez tenha sido o comportamento dos ácidos graxos saturados do tecido cardíaco em consideração à reduzida quantidade oferecida pelas dietas e as concentrações elevadas detectadas nos tecidos.

Há uma redução do C18:0 e um aumento do C18:1 *cis* nos grupos Trans 2 e 3 em relação ao controle. Os resultados também no tecido cardíaco, portanto, são compatíveis a um aumento na atividade da $\Delta 9$ dessaturase, uma vez que houve simultaneamente uma redução do C18:0 e um aumento do C18:1 nos grupos experimentais (WEBER, VOSHANN, BAUHL *et al.*, 1997).

5.2.5 FOSFOLIPÍDIOS DO CÉREBRO E DO CORAÇÃO

Os ácidos graxos *trans* são incorporados nos tecidos, mas a porcentagem de incorporação varia de acordo com o tecido e com a classe lipídica (MOORE, ALFIN-SLATER & AFTERGOOD, 1980).

Os fosfolipídios, predominantes no tecido cardíaco dos animais dos grupos experimentais, foram isolados a fim de verificar se as combinações dietéticas de deficiência de ácidos graxos essenciais e concentrações elevadas de isômeros *trans* alteram os seus perfis lipídicos. Pois, os fosfolipídios exercem uma diversidade de funções nas membranas e uma grande parte destas funções envolve fosfolipídios específicos, o que justifica a necessidade de uma diversidade estrutural e da sua composição em ácidos graxos dos lipídios (DOWHAN, 1997).

Em geral, possuem ácidos graxos insaturados esterificados na posição sn-2 do glicerol, e estes ácidos graxos têm influência sobre a temperatura de transição e conseqüentemente, sobre a fluidez da membrana.

No primeiro ensaio, com duração de quatro semanas, foram isoladas as cardiolípinas do tecido cerebral e do tecido cardíaco. A cardiolípinas está densamente distribuída no tecido cardíaco, enquanto que o cérebro possui pouca quantidade.

Segundo YAMAOKA, URADE & KITO (1988), a massa de fosfolipídios nas mitocôndrias do coração de ratos não é modificada, mas a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios pode ser modulada pela dieta. As modificações na fosfatidilcolina e na fosfatidiletanolamina atingiram o máximo em dez dias e na cardiolípinas em 30 dias.

Nossos resultados demonstraram uma incorporação de 7% de ácidos graxos *trans* na cardiolípinas da membrana mitocondrial cardíaca, e de apenas 1% na do tecido cerebral em 28 dias de consumo da dieta (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos da cardiolipina das mitocôndrias dos tecidos cardíaco e cerebral dos animais dos grupos controle e experimentais do ensaio 1.

Ácidos graxos %	Tecido cardíaco		Tecido cerebral	
	Grupo controle 1	Grupo Trans 1	Grupo controle 1	Grupo Trans 1
C14:0	7,96 ±1,0 ^b	15,03 ±0,2 ^b	7,12 ± 1,1 ^{ns}	6,36 ±1,1 ^{ns}
C16:0	14,73 ±2,8 ^{ns}	14,90 ±2,7 ^{ns}	18,75 ± 1,7 ^b	15,36 ±2,8 ^b
C18:0	10,22 ±1,6 ^a	21,86 ±7,5 ^a	13,50 ± 2,2 ^a	10,32 ±1,7 ^a
Σ Saturados	31,93 ±2,3 ^a	51,76 ±3,8 ^a	39,37 ±2,6 ^a	32,03 ±2,8 ^a
C18:1 9c	26,19 ±8,9 ^a	15,80 ±1,6 ^a	13,57 ±3,6 ^{ns}	15,18 ±2,7 ^{ns}
C24:1	n.d.	n.d.	11,54 ±2,4 ^a	4,05 ±0,7 ^a
Σ Monoinsaturado	26,19 ±8,9^a	15,80 ±1,6^a	25,11 ±2,5^b	19,23 ±2,7^b
C18:2	16,51 ±4,3 ^a	3,33 ±0,9 ^a	15,24 ±6,4 ^b	12,74 ±3,0 ^b
C18:3 n 3	1,58 ±0,4	n.d.	n.d.	n.d.
C20:4	n.d.	n.d.	4,94 ±0,6 ^{ns}	n.d.
C20:5	3,52 ±2,2 ^{ns}	3,18 ±1,4 ^{ns}	n.d.	n.d.
Σ Polinsaturado	21,50 ±5,5^a	6,51 ±2,0^a	31,71 ±7,4^a	16,78 ±2,7^a
Σ Trans	n.d.	7,12 ±1,3 ^a	n.d.	1,09 ±0,1 ^a
N.I.	21,93 ±4,2	18,79 ±1,7	15,35 ±3,5	30,01 ±5,6

Média ± desvio-padrão - Teste de Mann-Whitney. **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significante. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05.

A concentração do ácido linoléico encontrada, neste estudo, foi muito menor (16%) quando comparada com dados da literatura, pois deveria estar em torno de 70% ou mais (BERGER, GERMAN & GERSHWING, 1993; CHOY, TRAN, HATCH *et al.*, 1997). Além disso, apresentou uma elevada variabilidade (cv = 0,26 ou 26%). Os resultados obtidos por TAHIN, BLUN & CARAFOLI (1981) foram menores inclusive para o grupo controle, apresentando apenas 24% de ácido linoléico.

Duas possibilidades podem explicar a menor concentração do ácido linoléico nos tecidos estudados. Uma delas é que os valores do ácido linoléico podem estar reduzidos em função da idade do animal, (BERGER,

GERMAN & GERSHWING, 1993). A outra possibilidade é que em função da metodologia utilizada pode ter havido uma contaminação por ácidos graxos livres da própria amostra durante o isolamento por cromatografia de camada delgada unidimensional, interferindo desta forma sobre o resultado (HøY & HøLMER, 1990).

O coração dos animais, com apenas quatro semanas, pesaram em torno de 0,8 g (ABDULLAH & AL-OTHMAN, 2000) e como não se trabalhou com um “pool” das amostras (THIN, BLUN & CARAFOLI, 1981), muito material se perdeu durante a intensa manipulação.

No tecido cerebral dos animais do ensaio 1, a cardiolipina foi isolada do extrato de lipídio sem o isolamento prévio das mitocôndrias (CARRIÉ, CLÉMENT, JAVEL et al., 2000a) e os resultados obtidos foram melhores do que os do tecido cardíaco. Isto se deve ao fato do cérebro ter uma concentração de lipídios elevada, possibilitando conseqüentemente, o isolamento mais eficiente da cardiolipina apesar de conter menor concentração deste fosfolipídio.

A pequena concentração dos isômeros *trans*, encontrada nos animais do grupo Trans 1, é compatível aos valores encontrados para o tecido cerebral.

O ácido araquidônico (C40:4n-6) não foi detectado, mas houve uma redução nos valores do ácido linoléico. Indicando que a incorporação dos ácidos graxos *trans* alterou o perfil lipídico da cardiolipina cerebral com diminuição dos ácidos graxos saturados e polinsaturados. Diferentemente do que ocorreu no tecido como um todo, quando avaliado o comportamento de uma única classe lipídica, verificou-se que os ácidos graxos *trans*, em quantidades mínimas quando comparados com os demais tecidos, produziu um novo perfil lipídico. Resta saber se este “novo” perfil em ácidos graxos pode alterar a funcionalidade do cérebro, uma vez que as características físico-químicas deste novo perfil (grupo Trans 1) são bem diferentes

daquelas que encontrar-se-iam sem o consumo dos isômeros *trans* (Grupo controle).

Em mamíferos, há um rápido crescimento durante o desenvolvimento no período pré-natal e neo-natal e o acúmulo dos ácidos graxos polinsaturados é importante para a formação de todo o tecido neural. A faixa etária estudada, neste primeiro ensaio, enquadra-se no período de desenvolvimento neonatal do sistema nervoso central, diante dos resultados obtidos torna-se imprescindível o consumo de ácidos graxos essenciais, e até mesmo reforça a necessidade de uma oferta adequada de ácidos graxos polinsaturados já pré-formados (PAWLOVSKY, WARD & NORMA SALEM, 1996, CLANDININ, 1999, HORNSTRA, 2001), considerando que os ácidos graxos *trans* inibiram a síntese de ácido araquidônico e reduziram a incorporação do ácido linoléico.

Estudos futuros utilizando outros fosfolipídios cerebrais devem ser avaliados, tais como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e glicolipídios (CLANDINI & JANSEN, 1997), considerando que a cardiolipina não é um fosfolipídio com predominância pelos ácidos graxos polinsaturados, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico, que são fundamentais para a estrutura e o funcionamento cerebral.

Quanto ao tecido cardíaco a dieta do ensaio 1 proporcionou uma maior incorporação dos ácidos graxos *trans* comparando-se com a que foi detectada nos demais ensaios. No entanto, estes valores podem estar superestimados, levando em consideração as razões já descritas e sobretudo, pela elevada porcentagem de ácidos graxos não identificados (**Tabela 10**). Por esta razão, não é possível avaliar comparativamente estes valores com os obtidos para os demais grupos estudados.

Os resultados obtidos nos fosfolipídios isolados do extrato de lipídios totais do ensaio 2 e 3, sem o isolamento das mitocôndrias foram muito melhores e mais compatíveis com os dados encontrados na literatura

(WOLFF & ENTRESSANGLES, 1991; CARRIÉ, CLÉMENT, JAVEL *et al.*, 2000b).

Foi observado que houve deposição de ácidos graxos *trans* nos três fosfolipídios dos tecidos cardíacos dos grupos experimentais dos ensaios 2 e 3. A deposição ocorreu em proporções diferentes (**Figura 10**). A maior incorporação ocorreu na fosfatidiletanolamina, seguida da fosfatidilcolina e a menor na cardiolipina tanto no ensaio 2 como no ensaio 3.

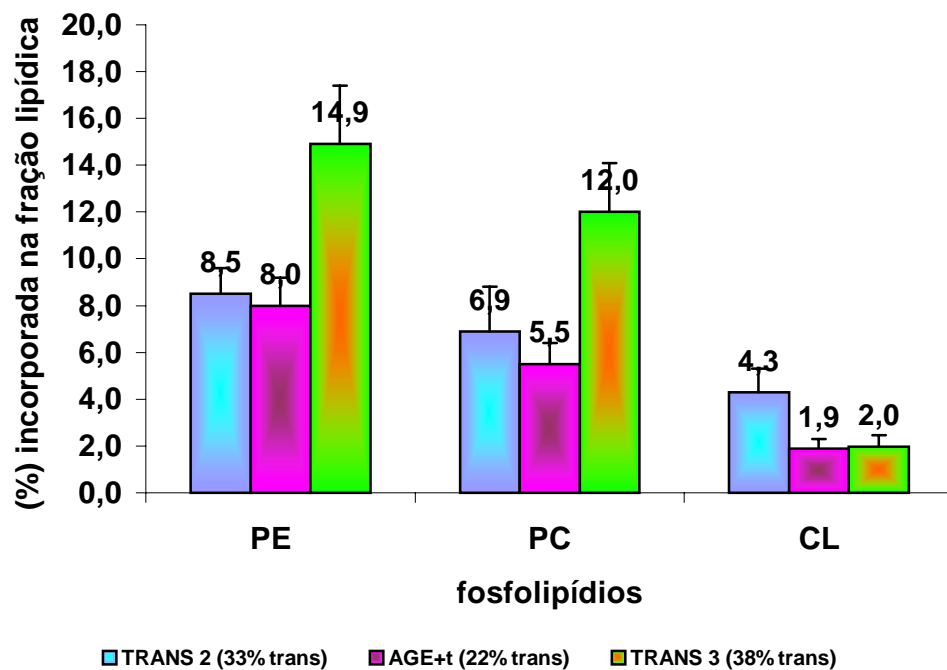


Figura 10 – Deposição dos ácidos graxos trans no tecido cardíaco dos animais dos grupos Trans 2, AGE+t e Trans 3. PE – fosfatidiletanolamina, PC – fosfatidilcolina, CL – cardiolipina.

A cardiolipina teve a menor incorporação dos isômeros *trans*, inclusive para o grupo que consumiu a dieta mais rica em ácidos graxos *trans* (Grupo Trans 3). Para a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina, a maior oferta dos ácidos graxos *trans* na dieta ocasionou maior incorporação.

WOLFF, COMBE & ENTRESSANGLES (1985) verificaram que o consumo de ácido eláidico na dieta, durante um mês foi suficiente para haver a incorporação de C18:1 *t* e C16:1 *t* e que a ordem de preferência de incorporação foi: fosfatidiletanolamina > fosfatidilcolina > cardiolipina, como ocorreu com os nossos resultados em relação ao C18:1 *9t*.

5.2.5.1 FOSFATIDILETANOLAMINA

A fosfatidiletanolamina tem presente na sua molécula, ácidos graxos saturados e 50% deles estão esterificados na posição sn-1 do glicerol. O ácido graxo predominante é o ácido esteárico. Segundo MARSH (1990) encontra-se na fosfatidiletanolamina da mitocôndria de ratos 27% de ácido esteárico e entre os ácidos graxos polinsaturados o ácido araquidônico é o de maior concentração (38%), embora seja o fosfolípídio mais rico no ácido docosahexaenóico (C22:6 n-3).

Nos resultados da **Tabela 11**, pode-se observar que o valor para o ácido esteárico no grupo controle do ensaio 2 é semelhante ao encontrado por MARSH (1990), entretanto, apresenta-se diminuído no grupo experimental em relação ao seu controle e esta diferença é estatisticamente significativa ($P \leq 0,01$), apesar do total de ácidos graxos saturados não ter sido afetado. Já para o total de ácidos graxos polinsaturados, não se observou diferença significativa, mesmo com um pequeno aumento no nível de ácido araquidônico.

Como aconteceu com o perfil dos lipídios totais do tecido cardíaco, na fosfatidiletanolamina, a síntese de ácido araquidônico no tecido do grupo experimental não ficou comprometida com a baixa concentração do ácido linoléico da dieta, todavia contrapondo-se a isto, apresentou valores mais elevados do que no grupo controle.

Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos da fosfatidiletanolamina do tecido cardíaco dos grupos controle e experimentais do ensaio 2 .

Ácidos Graxos %	FOSFATIDILETANOLAMINA				
	Grupo Controle	Grupo Trans 2	Grupo Controle	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C16:0	10,13 ± 1,9 ^{n.s.}	8,74 ± 2,4 ^{n.s.}	12,94 ± 1,3 ^{b,ns}	16,42 ± 3,2 ^{b,ns}	13,03 ± 2,7 ^{ns}
C18:0	28,91 ± 1,4 ^a	23,30 ± 3,3 ^a	31,26 ± 3,3 ^{ns}	30,32 ± 4,9 ^{ns}	28,16 ± 2,4 ^{ns}
Σ Saturado	38,77 ± 3,9^{n.s.}	34,47 ± 7,2^{n.s.}	44,44 ± 4,1^{ns}	46,25 ± 7,4^{ns}	41,36 ± 4,9^{ns}
C18:1 9c	7,03 ± 1,5 ^{n.s.}	7,73 ± 0,9 ^{n.s.}	9,24 ± 1,5 ^{b,a}	12,65 ± 1,4 ^{b,ns}	13,78 ± 2,1 ^{ns,a}
Σ Monoinsaturado	9,50 ± 1,5^a	7,73 ± 0,9^a	9,24 ± 1,5^{b,a}	12,65 ± 1,4^{b,ns}	13,78 ± 2,1^{ns,a}
C18:2	9,48 ± 2,3 ^{n.s.}	8,79 ± 2,1 ^{n.s.}	14,78 ± 1,3 ^{b,a}	11,22 ± 3,2 ^{b,b}	6,62 ± 1,7 ^{b,a}
C20:4	19,53 ± 1,6 ^a	26,18 ± 2,9 ^a	14,83 ± 2,8 ^{ns}	13,50 ± 2,6 ^{ns}	13,17 ± 3,2 ^{ns}
C22:5	2,01 ± 0,5 ^{ns}	2,57 ± 0,3 ^{ns}	1,16 ± 0,3 ^{ns}	1,19 ± 0,5 ^{ns}	n.d.
C22:6	13,13 ± 2,1 ^{n.s.}	12,47 ± 1,5 ^{n.s.}	8,66 ± 2,2 ^{b,a}	4,91 ± 2,5 ^{b,b}	1,60 ± 0,4 ^{b,a}
Σ Polinsaturado	45,99 ± 3,7^{n.s.}	45,66 ± 2,2^{n.s.}	37,01 ± 6,9^{b,a}	26,12 ± 7,4^{b,b}	22,37 ± 4,6^{b,a}
Σ Trans	n.d.	8,52 ± 1,1^a	n.d.	8,06 ± 1,2^a	14,95 ± 2,5^a
N.I.	3,77 ± 1,52	2,42 ± 0,92	8,85 ± 2,2	7,58 ± 2,01	7,39 ± 1,8

Ensaio 2 – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significante. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05. – Valores expressos como média ± desvio-padrão..

É possível que o conteúdo dos ácidos graxos *trans* da dieta Trans 2 (33%) não tenha sido suficiente para competir com o ácido linoléico pela $\Delta 6$ dessaturase. GRONN (1992), num estudo em humanos, verificou que a conversão do ácido linoléico da dieta a ácido araquidônico pode alcançar o seu máximo com concentrações relativamente pequenas na dieta. Como nos nossos resultados, é possível que a conversão tenha sido mais eficiente do que a competição inibitória do ácido graxo *trans* pela enzima.

No ensaio 3, nota-se um comportamento bem diferente. Os grupos experimentais, AGE+t e Trans 3, não apresentaram diferenças significativas para os ácidos graxos saturados, mas houve diferenças importantes nos valores dos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados.

A presença dos ácidos graxos *trans* aumentou o conteúdo de ácido oléico em todos os grupos experimentais, inclusive no ensaio 2, mesmo que discretamente. Houve também uma redução no conteúdo de ácido linoléico, mas não foi verificada diferença entre as concentrações de ácido araquidônico (**Tabela 11**). Este resultado parece estar mais relacionado com a concentração dos ácidos graxos *trans* na dieta do que numa interferência destes isômeros no metabolismo dos ácidos graxos insaturados, uma vez que a quantidade de ácido araquidônico foi mantida no grupo experimental.

Geralmente, a fosfatidiletanolamina é o fosfolípido mais rico em 22:6 n-3. É possível que um dos fatores que regulam esta incorporação seja uma maior afinidade das acil-transferases pelos derivados polinsaturados de cadeia longa do que propriamente pelo C18:3 n-3, seu precursor (BERGER & GERMAN, 1990).

A concentração de ácido docosahexaenóico teve uma redução em todos os grupos experimentais. No entanto, no grupo AGE+t foi muito inferior ao grupo Trans 2, que consumiu uma dieta com menor teor de ácido α -linolênico, ou seja, 0,7% da fração lipídica da dieta Trans 2 e 2,02% da dieta AGE+t, e uma quantidade maior de ácido linoléico. Pode-se presumir que mesmo esta quantidade reduzida de ácido linoléico foi eficiente em

satisfazer as necessidades de ácido araquidônico e que isto levou a uma inibição na conversão do ácido α -linolênico em ácido docosahexaenóico, considerando que a $\Delta 6$ e a $\Delta 5$ dessaturases estão envolvidas no processo de síntese dos ácidos graxos polinsaturados tendo ambos, os ácidos graxos essenciais como precursores.

5.2.5.2 FOSFATIDILCOLINA

Pode-se verificar na **Tabela 12**, que aproximadamente 50% dos ácidos graxos da fosfatidilcolina são ácidos graxos saturados, predominando o ácido esteárico que apresentou diferença significativa entre os grupos controle e experimental nos dois ensaios, com uma tendência para a redução nos grupos que receberam dietas ricas em ácidos graxos *trans* (grupo Trans 2 e grupo Trans 3). Segundo MARSH (1990), os principais ácidos graxos saturados da fosfatidilcolina, nas mitocôndrias do coração de ratos, são o ácido palmítico e o ácido esteárico, e entre os polinsaturados de cadeia longa é o ácido araquidônico o de maior concentração.

A redução do ácido esteárico nos grupos Trans indica uma maior síntese de ácido oléico no grupo experimental, que pode ser verificada pelo aumento concomitante deste ácido graxo (C18:1).

A composição das membranas celulares é regulada para manter a fluidez da membrana. A enzima “chave” envolvida neste processo é a estearoil-CoA dessaturase, esta é a enzima controladora da síntese celular dos ácidos graxos monoinsaturados, utilizando como substrato os ácidos graxos saturados. A regulação desta dessaturase é de grande importância fisiológica e sua atividade é sensível também pelas variações na dieta. Em ratos, a estearoil-CoA dessaturase tem sua expressão regulada pelos ácidos graxos polinsaturados da dieta e pelo colesterol (NTAMBI, 1999). As concentrações baixas de ácidos graxos essenciais podem ter contribuído para uma maior eficiência da síntese dos ácidos graxos polinsaturados, que foram distribuídos entre os tecidos para satisfazer pelo menos as

necessidades individuais não atuando dessa forma como inibidor da ação da dessaturase, mas contribuindo para um aumento discreto na sua atividade. Os dados encontrados indicam, de forma indireta, uma alteração na atividade enzimática sob as condições avaliadas no presente estudo.

O ácido oléico tem um ponto de fusão de 13°C e o ácido elaídico de 44°C. Os ácidos graxos insaturados têm um ponto de fusão mais baixo do que os saturados. Mudanças no ponto de fusão do fosfolípídio podem comprometer as atividades de membrana que dele dependem. Os ácidos graxos insaturados influenciam na temperatura de transição e conseqüentemente, na fluidez da membrana (PARKS, HUGGINS, GEBRE *et al.*, 2000). Enquanto a introdução da primeira dupla ligação gera um aumento importante na fluidez da membrana, progressivamente o efeito é menor após a adição de outras duplas ligações (PORTERO-OTIN, BELMUNT, RUIZ *et al.*, 2001).

Não foi verificada diferença estatística no total de ácidos graxos polinsaturados entre os tecidos dos animais do grupo controle e do grupo experimental do ensaio 2, porém para o ensaio 3, houve uma redução importante. Apesar da discreta redução nos ácidos graxos polinsaturados do grupo Trans 2, todos os grupos experimentais sofreram uma diminuição como reflexo da redução do ácido linoléico e do ácido araquidônico.

A fosfatidilcolina foi o fosfolípídio que teve seu perfil de ácidos graxos mais alterado em função da composição das dietas testadas.

Tabela 12 - Perfil de ácidos graxos da fosfatidilcolina do tecido cardíaco dos grupos controle e experimentais do ensaio 2 e 3.

Ácidos Graxos %	FOSFATIDILCOLINA				
	Grupo Controle 2	Grupo Trans 2	Grupo Controle 3	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C16:0	18,17 ± 2,8 ^{ns}	18,95 ± 5,2 ^{ns}	16,64 ± 2,1 ^{a,ns}	22,56 ± 3,1 ^{a,a}	16,41 ± 3,1 ^{n.s,a}
C18:0	33,44 ± 2,1 ^a	26,89 ± 1,4 ^a	27,18 ± 3,2 ^{ns}	29,31 ± 3,8 ^{ns,b}	24,72 ± 2,2 ^{b,ns}
Σ Saturado	51,77 ± 4,2^a	44,54 ± 4,9^a	44,49 ± 3,9^{b,ns}	52,29 ± 6,6^{b,a}	41,51 ± 4,6^{ns,a}
C18:1 9c	7,44 ± 0,1 ^a	9,01 ± 0,3 ^a	9,96 ± 2,7 ^{a,a}	14,89 ± 1,6 ^{a,a}	21,78 ± 3,7 ^{a,a}
Σ Monoinsaturado	7,44 ± 0,1^a	9,01 ± 0,3^a	9,96 ± 2,7^{a,a}	14,89 ± 1,6^{a,a}	21,78 ± 3,7^{a,a}
C18:2	14,95 ± 3,1 ^b	10,91 ± 2,5 ^b	17,26 ± 2,2 ^{a,a}	11,85 ± 2,3 ^{a,b}	8,68 ± 1,3 ^{a,b}
C20:4	21,91 ± 2,2 ^{ns}	20,87 ± 4,8 ^{ns}	23,2 ± 5,2 ^{a,a}	11,13 ± 3,8 ^{a,ns}	8,46 ± 2,6 ^{a,ns}
C22:6	1,72 ± 0,2 ^{ns}	1,75 ± 0,6 ^{ns}	2,36 ± 0,9 ^a	1,13 ± 0,5 ^a	n.d.
Σ Polinsaturado	39,18 ± 2,8^{ns}	36,11 ± 6,0^{ns}	42,26 ± 6,6^{a,a}	24,31 ± 5,5^{a,b}	16,08 ± 4,4^{ab}
Σ Trans	n.d.	6,91 ± 1,9^a	n.d.	5,50 ± 0,9^a	12,02 ± 2,1^a
N.I.	4,10 ± 2,01	4,41 ± 2,35	2,41 ± 1,75	2,41 ± 1,75	3,31 ± 2,15

Ensaio 2 – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significante. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05. – Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Há uma forte relação positiva não linear entre a fluidez proporcionada pela fosfatidilcolina à HDL e a atividade da LCAT com ácidos graxos com cadeia carbônica com 18 e 20 átomos esterificados na posição sn-2 (PARCKS, HUGGINS, GEBRE & BURLESON, 2000). Portanto, a variação no perfil da fosfatidilcolina, induzida pela elevada concentração de ácidos graxos *trans* e pela restrição dos ácidos graxos essenciais nas dietas estudadas, pode ser mais um fator de risco, mesmo que indireto, para doenças coronarianas, pois apresentou redução justamente nestes ácidos graxos quando foram incorporados os ácidos graxos *trans*.

5.2.5.3 CARDIOLIPINA

Dos fosfolípidios de membrana, a cardiolipina é o de menor concentração na maioria dos tecidos, no entanto, é fundamental para o metabolismo energético nas células eucariotas (MCMILLIN & DOWHAN, 2002). Em tecidos com elevada taxa respiratória, como o coração, a cardiolipina pode alcançar até 25% do total de fosfolípidios na membrana interna da mitocôndria (DAUM, 1985).

O complexo enzimático envolvido no transporte de elétrons e outras reações de óxido-redução necessitam de muitas moléculas de cardiolipina para sua atividade adequada. A característica estrutural da cardiolipina favorece tais associações, resultado de uma estrutura singular entre os fosfolípidios, isto é, a presença de quatro moléculas de ácidos graxos na sua estrutura (MCMILLIN & DOWHAN, 2002).

Em geral, a maioria destes ácidos graxos é composta pelo ácido linoléico. Por isto, a cardiolipina é o fosfolípido responsável pela maior variação no perfil destes ácidos graxos modulado pela dieta.

No ensaio 1, em um mês de consumo, houve uma incorporação de 7% dos ácidos graxos *trans* contra apenas 4% no ensaio 2 que expôs os animais aos ácidos graxos *trans* da dieta por mais tempo.

Resultados contrários foram demonstrados por Wolff (1995), no qual um mês de consumo de ácido elaídico não foi suficiente para haver incorporação na cardiolipina.

A incorporação dos isômeros *trans* na cardiolipina do ensaio 2 foi de 4,3%. HOY & HOLMER (1980) demonstraram, em estudo com condições semelhantes, que houve incorporação de apenas 2,5%.

Com relação aos grupos AGE+t e Trans 3 do ensaio 3, não se verificou diferença significativa, apesar da concentração dos isômeros *trans* da dieta do grupo Trans 3 ter sido quase o dobro do grupo AGE+t.

Nossos resultados (**Tabela 13**) estão em consonância com os obtidos por HOY & HOLMER (1990) que não encontraram diferenças na incorporação dos isômeros *trans* em função da concentração do ácido linoléico entre 1,9 a 14,5% da fração lipídica da dieta.

Os resultados aqui apresentados podem inclusive acrescentar a estas observações, que mesmo uma concentração maior em ácido linoléico (27%) ou a sua deficiência não afeta o percentual incorporado.

É possível que a cardiolipina possua um mecanismo protetor que a torna resistente à incorporação dos ácidos graxos *trans*. Este mecanismo parece estar relacionado à distribuição dos isômeros *trans* na sua molécula (WOLFF, COMBE, ENTRESSANGLES *et al.*, 1993), em particular, o ácido elaídico que em geral substitui os ácidos graxos saturados da molécula (WOLFF & ENTRESSANGLES, 1994). Os ácidos graxos saturados estão em menores concentrações do que o ácido linoléico, possibilitando assim, somente uma incorporação reduzida de ácidos graxos *trans*.

Tabela 13 - Perfil de ácidos graxos da cardioplipina do tecido cardíaco dos grupos controle e experimentais do ensaio 2 e 3 .

Ácidos Graxos %	CARDIOLIPINA				
	Grupo Controle	Grupo Trans 2	Grupo Controle	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C16:0	8,54 ± 3,2 ^{n.s}	7,15 ± 1,7 ^{n.s}	12,52 ± 1,7 ^{n.s}	15,51 ± 3,9 ^{n.s}	12,26 ± 3,3 ^{n.s}
C18:0	8,10 ± 1,8 ^{n.s}	7,97 ± 1,6 ^{n.s}	5,19 ± 1,7 ^{b,a}	8,03 ± 2,9 ^{b,b}	11,00 ± 1,5 ^{b,a}
Σ Saturado	14,33 ± 3,2^{n.s}	15,02 ± 1,1^{n.s}	12,25 ± 4,3^{b,a}	15,99 ± 4,0^{b,a}	25,40 ± 4,7^{a,a}
C18:1 9c	5,45 ± 0,8 ^a	10,54 ± 2,7 ^a	8,34 ± 2,7 ^{ns,a}	7,53 ± 2,1 ^{ns,a}	14,68 ± 3,7 ^{a,a}
Σ Monoinsaturado	5,45 ± 0,8^a	10,54 ± 2,7^a	8,34 ± 2,7^{ns,a}	7,53 ± 2,1^{ns,a}	14,68 ± 3,7^{a,a}
C18:2	77,55 ± 6,9 ^a	50,28 ± 11,5 ^a	72,33 ± 6,9 ^{ns,a}	64,62 ± 6,6 ^{ns,a}	46,73 ± 6,5 ^{a,a}
C20:4	4,79 ± 1,3 ^a	1,73 ± 0,3 ^a	1,62 ± 0,5 ^{ns}	1,21 ± 0,3 ^{ns}	n.d.
C22:6	1,42 ± 0,4 ^{n.s.}	1,35 ± 0,5 ^{n.s.}	n.d.	n.d.	n.d.
Σ Polinsaturado	80,12 ± 5,3^a	60,05 ± 9,3^a	73,51 ± 7,4^{ns,a}	66,79 ± 6,8^{ns,a}	47,45 ± 6,6^{aa}
Σ Trans	n.d.	4,31 ± 1,0^a	n.d.	1,94 ± 0,4^{ns}	1,96 ± 0,5^{ns}
N.I.	2,41 ± 1,75	3,31 ± 2,15	2,41 ± 1,75	2,41 ± 1,75	3,31 ± 2,15

Ensaio 1 – Teste de Mann-Whitney (Controle 1 X Trans 1). **Ensaio 2** – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significativa. **(a)** $P \leq 0,01$ / **(b)** $P \leq 0,05$. – Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Verifica-se que houve uma redução importante no ácido linoléico dos grupos experimentais. Tanto a dieta com quantidades restritas (Trans 2) como a dieta deficiente (Trans 3) em ácido linoléico apresentaram uma redução de aproximadamente 35% na sua deposição. No entanto a dieta que ofereceu uma quantidade adequada de ácidos graxos essenciais (AGE+t) produziu uma redução de apenas 10%. Os nossos resultados indicam que a deposição do ácido linoléico pode ser limitada pela presença dos ácidos graxos *trans* na dieta, mas ela será tanto menor quanto mais adequada for a dieta para o ácido graxo essencial n-6.

A concentração de ácido linoléico incorporado foi muito maior do que a oferecida pela dieta em todos os grupos experimentais. Como não é sintetizado no organismo supõe-se que o ácido linoléico seja depositado de uma forma “acumulativa” de acordo com o consumo ao longo do desenvolvimento ou ainda, que pode haver um “*turnover*” mais lento, neste fosfolípido, quando grandes quantidades de ácidos polinsaturados de cadeia longa, tais como o ácido araquidônico, não são necessárias como é característico na cardiolipina.

É possível que nas primeiras semanas após o desmame os animais possam incorporar mais ácidos graxos *trans*, que diminuiria à medida que o ácido linoléico fosse depositado na molécula (LEE, BYING, YU *et al.*, 1999). Isto talvez justifique a maior incorporação no grupo Trans 2.

Outro fator é a baixa especificidade de posição na esterificação do ácido linoléico. Desta forma, é possível que os efeitos dos ácidos graxos encontrados sobre a incorporação do ácido linoléico não tenham sido maiores do que a própria restrição de oferta do C18:2 pela dieta.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que apesar da sensibilidade para a modulação dietética nos ácidos graxos dos fosfolípidios, os ácidos graxos *trans*, principalmente o ácido elaídico, são depositados em pequenas quantidades.

5.2.6 TECIDO HEPÁTICO

Os dados apresentados na **Tabela 14** mostram que os ácidos graxos *trans* não sofrem “acúmulo” no tecido hepático após oito semanas de consumo da dieta (Grupo Trans 2) em relação ao consumo de apenas 4 semanas (Grupo Trans 1). Como também, não apresentou maior incorporação a despeito de uma maior concentração na dieta. Diferentemente do tecido adiposo, o fígado não refletiu diretamente, como depósito, o conteúdo dos ácidos graxos da dieta, possivelmente por causa da sua intensa e complexa rede de interações entre síntese e oxidação dos lipídios.

Em geral, os ácidos graxos não metabolizados pelo organismo ou os produtos intermediários do metabolismo de ácidos graxos específicos servem como “biomarcadores” dos lipídios ingeridos pela dieta (ARUB, 2003).

Os ácidos graxos *trans* são biomarcadores importantes para a avaliação do consumo de alguns alimentos. Dependendo da posição da dupla ligação pode refletir o consumo de gordura de ruminantes ou de gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Como os animais estudados consumiram gordura vegetal parcialmente hidrogenada, presume-se que a presença de ácido elaídico seja predominante. Outro fator de relevância é a restrição e a deficiência dos ácidos graxos essenciais, que nestas condições, têm produtos intermediários ou produtos finais que identificam as suas deficiência; como o C20:3 n-9 que é o resultado do efeito compensatório pela redução do C18:2 n-6 como substrato para a síntese dos ácidos graxos polinsaturados n-6 à manutenção da integridade das membranas (MAHFOUZ & KUMMEROW, 1999).

Tabela 14 - Perfil de ácidos graxos do Tecido Hepático dos grupos controles e experimentais dos ensaios 1, 2 e 3.

Ácidos graxos %	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		
	Grupo Controle 1	Grupo Trans 1	Grupo Controle 2	Grupo Trans 2	Grupo Controle 3	Grupo AGE+t	Grupo Trans 3
C14:0	0,38± 0,1	0,50 ± 0,1	n.d.	n.d.	0,39 ± 0,1	n.d.	0,37 ± 0,1
C16:0	16,43± 1,4 ^{ns}	16,78 ± 1,9 ^{ns}	17,27 ± 0,7 ^{ns}	17,85 ± 1,5 ^{ns}	15,65± 0,7 ^{ns,a}	15,07± 1,6 ^{ns,a}	18,86± 2,0 ^{a,b}
C18:0	6,58± 1,2 ^{ns}	7,42 ± 1,2 ^{ns}	12,31 ± 2,2 ^{ns}	12,58 ± 1,1 ^{ns}	11,49 ± 3,2 ^{b,b}	14,42± 2,7 ^{b, ns}	14,09 ± 1,8 ^{ns,b}
C22:0	0,46 ± 0,3	0,42 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,17 ± 0,2
Σ Saturados	23,85 ± 2,3^b	25,12 ± 2,1^b	29,57 ± 2,2^a	34,43 ± 1,8^a	27,69± 2,7^{ns,a}	28,72 ± 1,3^{ns,a}	36,45 ± 0,6^{a,a}
C16:1	0,44 ± 0,1	0,70 ± 0,2	0,43 ± 0,1 ^a	1,01 ± 0,2 ^a	0,65 ± 0,2 ^a	n.d.	2,29 ± 0,5
C18:1 9c	14,86 ± 0,8 ^a	26,64± 2,1 ^a	13,71 ± 1,1 ^a	18,02 ± 0,5 ^a	11,12 ± 2,4 ^{b,a}	8,23 ± 2,6 ^{a,a}	16,84 ± 1,7 ^{a,a}
Outros cis	1,67 ± 0,2 ^a	5,95 ± 0,3 ^a	n.d.	1,94 ± 0,1	2,24 ± 0,2 ^{ns,a}	2,65 ± 0,7 ^{ns,a}	11,47 ± 0,6 ^{a,a}
C20:1 n-9	0,43 ± 0,0	0,21 ± 0,1	n.d.	n.d.	0,51 ± 0,1	n.d.	0,66 ± 0,1
Σ Monoinsaturados	17,54 ± 0,8^a	33,46 ± 2,3^a	14,14 ± 1,1^a	20,59 ± 1,3^a	15,91 ± 2,0^{a,a}	11,45 ± 3,2^{a,a}	32,29 ± 1,5^{a,a}
C18:2	40,64 ± 2,8 ^a	13,84 ± 1,9 ^{ns}	32,75 ± 2,9 ^a	14,71 ± 0,8 ^a	32,59 ± 3,0 ^{a,a}	23,21 ± 1,0 ^{a,a}	6,29 ± 0,5 ^{a,a}
C18:3 n-3	1,96 ± 0,1 ^a	0,70 ± 0,1 ^a	1,70 ± 0,3 ^b	0,65 ± 0,1 ^a	1,37 ± 0,2	0,75 ± 0,2	n.d.
C20:4	8,69 ± 1,9 ^{ns}	7,63 ± 1,8 ^{ns}	15,97 ± 2,6 ^{ns}	15,25 ± 1,3 ^{ans}	18,66± 2,6 ^{ns,a}	19,76 ± 2,6 ^{ns,a}	8,47 ± 0,7 ^{a,a}
C22:5 n-3	0,77 ± 0,1 ^a	0,22 ± 0,1 ^a	n.d.	n.d.	0,66 ± 0,1 ^{ns}	0,62 ± 0,1 ^{ns}	n.d.
C22:6	2,44 ± 0,2 ^{ns}	2,47 ± 0,7 ^{ns}	3,40 ± 0,4 ^{ns}	3,28 ± 1,23 ^{ns}	3,30 ± 0,6 ^{ns,a}	4,34 ± 0,8 ^{ns,a}	2,92 ± 0,3 ^{a,a}
Σ Polinsaturados	55,84 ± 1,7	25,29 ± 3,6	55,31 ± 1,3^a	33,98 ± 2,9^a	52,17± 1,8^{ns,a}	50,80 ± 2,7^{ns,a}	17,96 ± 1,1^{a,a}
C18:1 t	n.d.	11,22 ± 1,3 ^{ns}	n.d.	13,96 ± 1,1 ^{ns}	n.d.	8,21 ± 1,6 ^a	12,24 ± 1,3 ^{ns}
C18:2 tt	n.d.	0,75 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,35 ± 0,1
C18:2 tc	n.d.	0,44 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,89 ± 0,1
C18:2 ct	n.d.	0,45 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,34 ± 0,1
Σ trans	n.d.	12,59 ± 0,9^{ns}	n.d.	13,96± 1,1^{ns}	n.d.	8,21 ± 1,6^a	13,78 ± 1,3^{ns}
N.I.	2,77 ± 0,6	5,22 ± 1,5	1,58 ± 1,2	1,05 ± 1,4	5,18 ± 0,7	1,05 ± 0,4	1,43 ± 0,5

Ensaio 1 – Teste de Mann-Whitney (Controle 1 X Trans 1). **Ensaio 2** – Teste de Mann-Whitney (Controle 2 X Trans 2). **Ensaio 3** – Análise de Variância por postos de Friedman (Controle 3 X AGE+t ; Controle 3 X Trans 3; AGE+t X Trans 3). **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado/ **n.s.** – não significativo. **(a)** P ≤ 0,01/ **(b)** P ≤ 0,05. – Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Não foi detectada a presença do C20:3 n-9, portanto não foi desenvolvida a deficiência dos ácidos graxos essenciais nos animais durante o período estudado. A síntese do C20:3 n-9 pode ocorrer como consequência da ação dos isômeros *trans* competindo com os ácidos linoléico e α -linolênico, na primeira etapa de conversão do ácido oléico pela $\Delta 6$ dessaturase (MAHFOUZ, SMITH, KUMMEROW, 1984). No entanto, não foi verificada a diferença significativa na síntese do ácido araquidônico entre os grupos controle e experimentais, quando a quantidade adequada de ácido linoléico foi oferecida pela dieta. Outro ácido graxo com potencial competidor sobre a conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico (RAZ, KAMIN-BELSKY, PRZEDECKI & OBUKOWICZ, 1997) é o ácido α -linolênico, contudo, também não foi observada diferença significativa na síntese de ácido docosahexaenóico (DHA), nem sequer no grupo que não recebeu o ácido α -linolênico da dieta, que provavelmente este é o resultado dos depósitos realizados durante o período gestacional e de lactação.

A competição entre os ácidos graxos *trans* e o metabolismo dos ácidos graxos essenciais tem sido observada em vários estudos, mas as interações são complexas e podem variar com a posição das duplas ligações *trans*. Parece que os ácidos graxos *trans* têm maior efeito sobre os ácidos graxos da família n-6 do que os da família n-3. Uma explicação para não se ter encontrado os efeitos sobre estas vias é que as dessaturases poderiam ter sua atividade otimizada pela necessidade dos ácidos graxos polinsaturados para o desenvolvimento e crescimento quando as concentrações dos ácidos graxos essenciais estão restritas ou deficientes e há uma possibilidade de inibição dos ácidos graxos *trans*. (CARLSON, CLANDININ, COOK *et al.*, 1997). Infelizmente não foi medida a atividade das dessaturases neste estudo.

Os ácidos graxos *trans* para interferirem na síntese dos ácidos graxos polinsaturados devem, necessariamente, estar em concentrações muito elevadas, o consumo ser prolongado e o desenvolvimento da

deficiência dos ácidos graxos essenciais deve iniciar no período intra-uterino (RAZ, KAMIN-BELSKY, PRZEDECKI *et al.*, 1997).

O Grupo AGE+t manteve o perfil de ácidos graxos de um modo geral, muito parecido com o do Grupo Controle 3, embora tenha incorporado os isômeros *trans*. Apesar de ter mantido as mesmas proporções em relação ao controle, os ácidos graxos quando avaliados individualmente apresentaram uma diminuição significativa no ácido linoléico e um aumento do ácido araquidônico, não apresentando diferença significativa entre os conteúdos de ácidos graxos polinsaturados.

Os isômeros do ácido linoléico não foram detectados no grupo Trans 2, bem como na sua respectiva dieta. A presença destes isômeros no tecido dos grupos Trans 1 e Trans 2 refletem as quantidades presentes nas dietas experimentais. Estes isômeros são metabolizados pelo fígado e podem ser depositados nos tecidos, em geral a posição da dupla ligação influencia na atividade das enzimas e nos seus efeitos fisiológicos (BEYERS & EMBEN, 1991). Contudo foram identificados no tecido adiposo (**Tabela 6**). Parece que o tecido adiposo não discrimina a deposição dos isômeros em função da distribuição das duplas ligações, se *tt*, *tc* ou *tc*, mas o próprio fígado faz esta distinção. WEBER, VOSMANN, LUDGER *et al.*, (1997) verificaram que há uma relação importante entre a posição das duplas ligações e o comportamento metabólico dos ácidos graxos e seus produtos.

A concentração do C18:2 *tc* foi maior no grupo Trans 3 face à redução dos demais grupos. Este ácido graxo pode ter sido sintetizado a partir do C18:1 11*t* da dieta (WOLFF, COMBE, ENTRESSANGLES *et al.*, 1993). A concentração dos ácidos graxos no fígado é o reflexo da captação por este órgão e a combinação de diferentes taxas de conversão, acilação e β -oxidação. O aumento deste isômero, no tecido hepático, está em consonância com o obtido por BEYERS & EMBEN (1991), que sugerem que pode haver alguma interferência na taxa de secreção lipídica do próprio fígado.

Somente foi encontrada diferença significativa para os valores dos ácidos graxos *trans* totais entre o grupo AGE+t ($P < 0,001$) e em relação aos demais grupos, indicando que a maior diferença na concentração dos isômeros *trans* na dieta afetou a quantidade detectada neste tecido.

A adequação da concentração do ácido linoléico dietético foi determinante para a manutenção da conversão em ácido araquidônico nos tecidos, somente a deficiência absoluta na dieta produziu uma redução significativa deste ácido graxo, visualizado pelo resultado do perfil lipídico do tecido hepático do grupo Trans 3.

O consumo dos isômeros *trans* não afetou a deposição dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa na maioria dos tecidos estudados, os quais apresentaram-se diminuídos em função da concentração dos seus substratos na dieta.

Contudo, uma atenção especial deve ser dada em relação ao consumo de alimentos contendo ácidos graxos *trans*, pois são potencialmente aterogênicos, por alterar os níveis das lipoproteínas sanguíneas comparativamente aos ácidos graxos saturados (JUDD, BAER, CLEVIDENCE *et al.*, 2002).

Os valores para o ácido elaídico nos grupos Trans 1 e Trans 2 não apresentaram diferença significativa, verifica-se, no entanto, que há um discreto aumento nas concentrações destes ácidos graxos depositados no fígado em função da duração do consumo da dieta. Em contrapartida, os animais do grupo Trans 2 apresentaram uma síntese de C18:1 menor em relação ao grupo Trans 1. Algumas suposições podem ser feitas a este respeito: primeiramente pode ser o resultado da diferença metabólica em função da idade estando mais intensa a síntese nos animais mais jovens para garantir o crescimento. Em segundo lugar, os experimentos foram desenvolvidos em momentos diferentes, daí a importância de grupos controle para cada momento e cada grupo de animais. Sob este aspecto os resultados são coerentes de uma maneira geral e não há um acúmulo dos

ácidos graxos *trans* no tecido com até oito semanas de consumo da dieta. E finalmente, pode ter havido uma separação inadequada dos isômeros C18:1 *cis* e *trans* para este tecido, mesmo que as condições de análise e de operação dos equipamentos tenham sido as mesmas.

Todavia, pode-se descartar esta possibilidade, uma vez que utilizando ressonância magnética nuclear (**seção 5.2.5.1**), pode-se verificar que não houve diferença significativa entre as concentrações de ácidos graxos *trans* totais medidos pelos dois métodos.

5.2.5.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Em estudos com gordura parcialmente hidrogenada, foi verificado que alguns isômeros octadecenóicos *trans*, identificados por cromatografia gasosa, possuem seus sinais no cromatograma sobrepostos ao sinal do ácido oléico (C18:1 *cis*) - (RATNAYAKE, HOLLYWOOD, O'GRADY *et al.*, 1990) como pode ser visualizado na **Figura 11**. Isto pode subestimar os teores dos isômeros *trans* do C18:1 e superestimar as quantidades do ácido oléico e ocasionalmente do ácido linoléico (PRECHT & MOLKENTIN, 2001).

É de fundamental importância que os ácidos graxos sejam identificados individualmente nos estudos de incorporação tecidual, uma vez que cada ácido graxo tem um efeito fisiológico diferente (SEPPÄNEN-LAAKSO, LAAKSO & HILTUNEN, 2002).

Foi realizada a identificação do ácido elaídico das amostras de tecido hepático dos três ensaios biológicos por ressonância magnética, a fim de se comparar os resultados com aqueles obtidos por cromatografia gasosa.

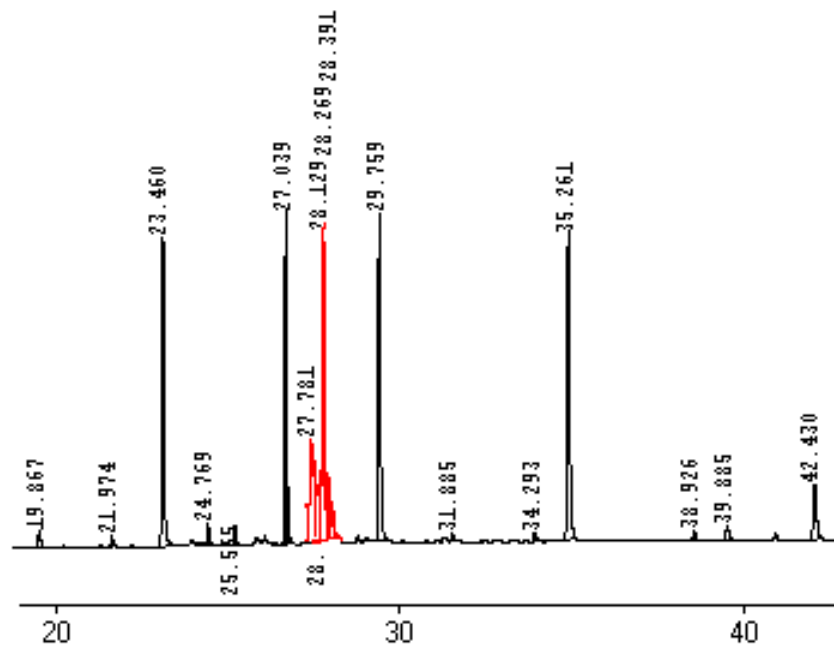


Figura 11 – Cromatograma do perfil de ácidos graxos do extrato lipídico do tecido hepático. Região em destaque indica a sobreposição dos picos dos isômeros C18:1.

A grande vantagem de se aplicar a ressonância magnética na identificação do ácido elaídico é que além de ser uma técnica muito rápida, pois não há a necessidade de modificação química da amostra lipídica, como saponificação, derivatização ou esterificação os ácidos graxos, abre-se também a possibilidade de se identificar separadamente o ácido elaídico do seu correspondente de conformação *cis* (**Figura 12**), considerando que é o ácido graxos *trans* de maior concentração nas amostras estudadas. Além disso, a identificação dos ácidos graxos não exige a utilização de padrões (DIEHL, 1998).

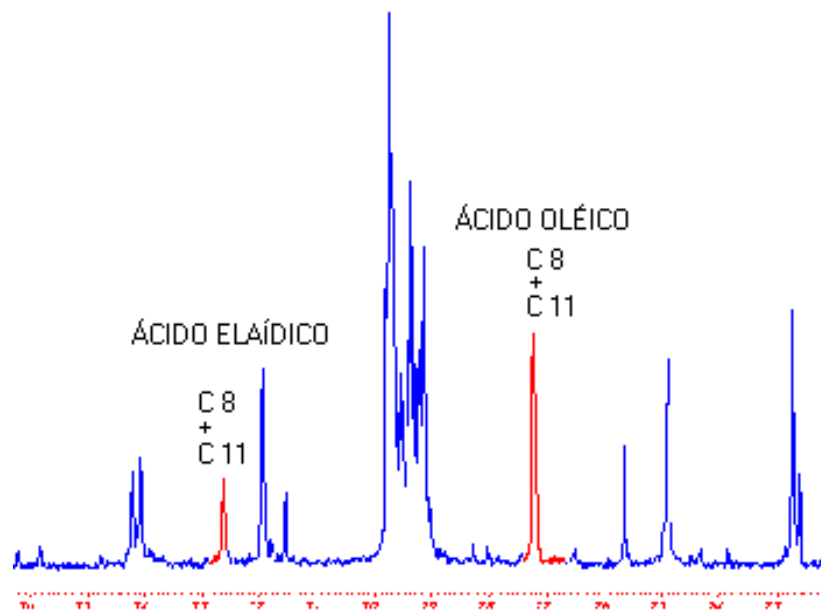


Figura 12 – Espectro da ressonância magnética do extrato lipídico de tecido hepático. Regiões em destaque indicando os sinais correspondentes ao ácido elaídico e ao ácido oléico.

SACCHI, ADDEO & PAOLILLO (1997) sugerem que o cálculo da porcentagem relativa dos ácidos graxos das amostras, identificados pela ressonância magnética, seja realizado utilizando-se uma relação entre a intensidade dos sinais. Assim, o percentual do ácido elaídico foi determinado com a seguinte fórmula:

$$AcE = \frac{At}{Ac + At} \times \frac{Ctt}{Ctrans}$$

Onde:

AcE – Área do ácido elaídico

At – área do sinal *trans*

Ac – área do sinal *cis*

Ctrans - número de carbonos referente ao número de duplas ligações da molécula do ácido graxo *trans*

Ctt – número de carbonos totais medidos

Os carbonos totais medidos são referentes a todos os **C8** e **C11**. São eles: 2 carbonos para o ácido oléico, 2 carbonos para o ácido elaídico, 2 para o ácido linoléico e 1 para o ácido α -linolênico. Somente são incluídos aqueles que estão presentes na amostra.

A área do sinal no espectro da ressonância magnética é diretamente proporcional à concentração molar do isótopo detectado (DIEHL, 1998).

Então:

$$\%AcE = \frac{AcE \times 100}{(Ac + At)}$$

A concentração do ácido elaídico, nas amostras de tecido hepático, apresentou valores muito próximos entre as duas técnicas utilizadas, a ressonância magnética nuclear do ^{13}C (RMN) e a cromatografia gasosa (CG). (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Percentual (%) do ácido elaídico identificado por cromatografia gasosa (CG) e ressonância magnética (RMN) em tecido hepático de ratos dos grupos experimentais 1, 2 e 3.

C18:1 9trans Trans 1		C18:1 9trans Trans 2		C18:1 9trans Trans 3		C18:1 9trans AGE+t	
CG*	RMN	CG*	RMN	CG*	RMN	CG*	RMN
11,22±1,3	15,20±2,9	13,96±1,1	14,11±1,8	12,24±0,9	12,66±2,4	8,21 ±0,7	8,64 ±1,3
P ≤ 0,01		n.s		n.s.		n.s.	

(*) Percentual do ácido elaídico em relação ao total de ácidos graxos do extrato lipídico da amostra.

Somente o grupo Trans 1, do primeiro ensaio, apresentou diferença entre os valores (P≤0,01). No entanto, o cálculo sugerido por SACCHI, ADDEO & PAOLILLO (1997) é uma proporção entre o ácido elaídico e o ácido oléico, e o objetivo de se utilizar a ressonância magnética foi para identificar o percentual do ácido elaídico em relação ao conteúdo total de

ácidos graxos, desta forma, seria necessário identificar um sinal no espectro da ressonância que proporcionasse a identificação de todos os ácidos graxos presentes na amostra.

Este sinal poderia ser o do grupo carbonílico ou do grupo metílico terminal, no entanto, os resultados não foram satisfatórios. Isto, portanto, foi uma limitação da ressonância magnética neste estudo, uma vez que a proporcionalidade entre a concentração molar do componente e a integral da intensidade do respectivo sinal exige que seja realizada somente entre átomos do mesmo ambiente químico, como por exemplo, entre grupos carbonílicos ou entre grupos metílicos (DIEHL, 1998).

No entanto, PFEFFER, LUDDY & UNRUH (1977) avaliaram uma mistura sintética de misturas de ácidos graxos saturados com dienos e monoenos com configuração *cis* e *trans* e sugeriram uma outra fórmula para o cálculo do percentual de ácidos graxos *trans* em misturas, como segue:

$$\% \text{ de ácidos graxos } \mathbf{trans} = 100 \times \frac{\mathbf{trans} C_{8,11}}{[(\mathbf{cis} C_{8,11} + \mathbf{cis,cis} C_{8,14}) + \mathbf{trans} C_{8,11} + (2)(\mathbf{cis,cis})]}$$

Onde:

- ***trans* C_{8,11}** é a área do sinal em δ 32,6; ***cis* C_{8,11} + *cis,cis* C_{8,14}** é a área do sinal em δ 27,3 e ***cis,cis* C₁₁** é a área correspondente ao carbono alílico interno C₁₁ em δ 25,7 (**Figura 13**).

- **% de ácidos graxos *trans*** – contidos na mistura monoenos e dienos

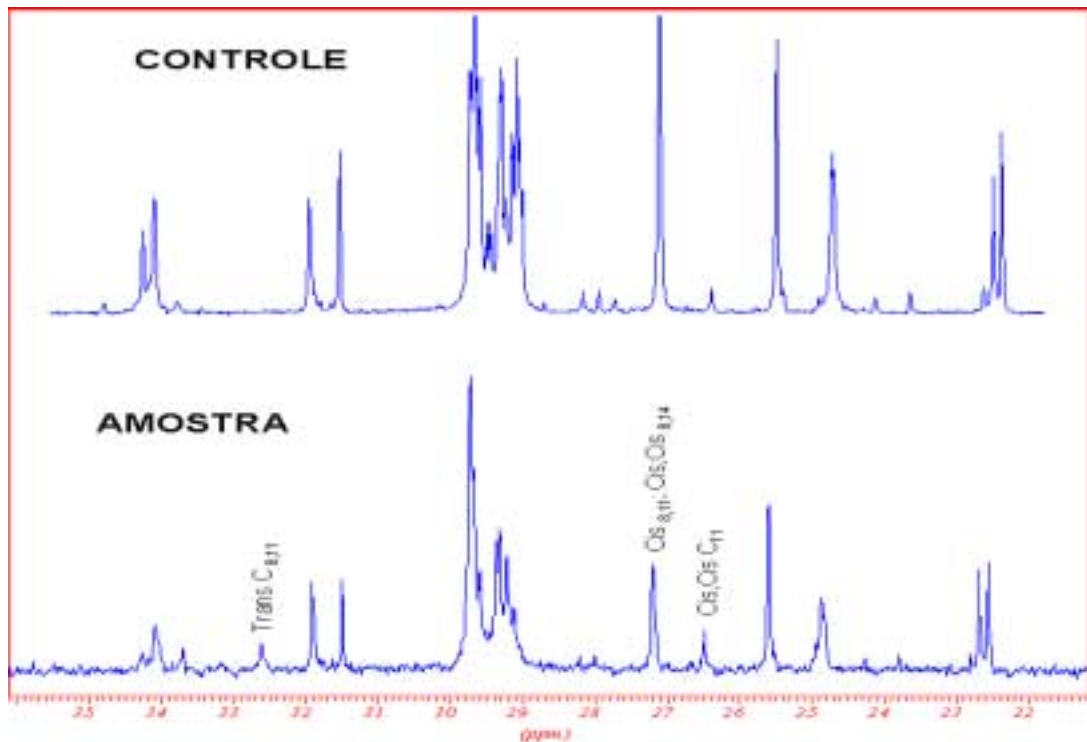


Figura 13 – Espectro da ressonância magnética do extrato lipídico do tecido hepático com todos os sinais identificados, aplicáveis no cálculo do percentual total dos ácidos graxos *trans*.

Utilizando-se a fórmula precedente, obteve-se os resultados apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Percentual (%) do total de ácidos graxos *trans* do extrato lipídico do tecido hepático dos ensaios 1, 2 e 3 Identificados por cromatografia gasosa (CG) e ressonância magnética (RMN).

C18:1 9 <i>trans</i> Trans 1		C18:1 9 <i>trans</i> Trans 2		C18:1 9 <i>trans</i> Trans 3		C18:1 9 <i>trans</i> AGE+t	
CG*	RMN	CG*	RMN	CG*	RMN	CG*	RMN
12,86±1,3	14,33±1,2	13,96±1,1	12,82±1,5	13,78±1,3	14,74±2,0	8,67 ±0,8	7,75 ±1,6
P ≤ 0,01		n.s		n.s.		n.s.	

CG* - calculado pelo somatório dos percentuais dos ácidos graxos *trans* monoenois e dienois identificados.

No estudo realizado por MIYAKE & YOKOMIZO (1998) com gordura hidrogenada foram encontradas diferenças de 5%, entre as análises com as duas metodologias, que foram consideradas como irrelevantes. Estes autores, ainda sugeriram que o uso da ressonância magnética nuclear para a análise do perfil de ácidos graxos em gorduras é viável e acrescentaram que esta é uma técnica com potencial para substituir a cromatografia gasosa nas análises de rotina pela sua praticidade e rapidez, mesmo sendo o custo do equipamento um dos fatores limitantes, em muitos casos, na adoção da técnica. Em geral, os estudos com ácidos graxos *trans* foram realizados com gordura parcialmente hidrogenada ou com misturas sintéticas de ácidos graxos. Não foi possível identificar na literatura consultada a aplicação da ressonância magnética em material biológico para identificação do ácido elaídico. A complexidade da composição lipídica da amostra estudada torna mais difícil a quantificação dos ácidos graxos.

Nossos resultados sugerem que a ressonância magnética nuclear seja uma técnica viável para identificar o total dos ácidos graxos *trans* tanto quanto o é a cromatografia gasosa. Apresenta, ainda, a vantagem de eliminar etapas químicas precedentes à identificação dos ácidos graxos. Podendo, portanto, substituir a cromatografia gasosa para análises rápidas na determinação do total de ácidos graxos e ser utilizada como análise complementar na identificação do ácido elaídico.

Somando-se a isto, confirma a argumentação de SEPPANNE-LAAKSO, LAAKSO *et al.* (1996) e SEPPÄNEN-LAAKSO, LAAKSO & HILTUNEN (2002) de que a cromatografia gasosa direta, ou seja, sem a etapa de isolamento dos isômeros por cromatografia de camada fina impregnada com nitrato de prata, nas condições empregadas neste estudo, pode ser utilizada na identificação dos ácidos graxos *trans* de tecido hepático sem prejuízo para os resultados em função da sobreposição de sinais.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e com os resultados obtidos, pôde-se verificar que os ácidos graxos *trans* da dieta são incorporados nos tecidos cardíaco, cerebral, adiposo e hepático e no plasma dos animais.

Os ensaios biológicos, na forma em que foram conduzidos, permitiram as seguintes conclusões:

- O percentual de deposição dos ácidos graxos *trans* variou para cada tecido.
- As quantidades dos ácidos graxos *trans* incorporadas pelo plasma, fígado, coração e tecido adiposo refletiram proporcionalmente as concentrações da dieta. O cérebro foi o tecido com menor nível de incorporação dos isômeros e não apresentou relação dose-dependente com a dieta, como ocorreu nos demais tecidos, indicando uma possível proteção deste órgão quanto à incorporação dos isômeros *trans*.
- Quatro semanas de consumo de uma dieta rica em ácidos graxos *trans* foram suficientes para haver incorporação destes ácidos graxos em todos os tecidos estudados. No entanto, o prolongamento do consumo da dieta não resultou numa maior incorporação dos isômeros *trans*, não caracterizando o efeito acumulativo.
- A dieta modula o perfil de ácidos graxos essenciais nos tecidos e estes em quantidades adequadas influenciaram na menor deposição dos ácidos graxos *trans* no tecido adiposo, plasma e tecido cardíaco.
- A combinação das concentrações elevadas de ácidos graxos *trans*, e restritas em ácidos graxos essenciais, não interferiu de maneira acentuada na deposição dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa nos tecidos estudados.

- Houve uma tendência em aumentar a deposição dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados sintetizados endogenamente para compensar a alteração no perfil dos ácidos graxos com a incorporação dos ácidos graxos *trans*.
- Os resultados obtidos para o perfil de ácidos graxos dos fosfolípidios estudados demonstraram que há uma sensibilidade variável para a deposição dos ácidos graxos *trans* da dieta. A maior incorporação ocorreu na fosfatidiletanolamina, seguida da fosfatidilcolina e da cardiolipina. A incorporação foi proporcional à concentração da dieta para a fosfatidiletanolamina e para a fosfatidilcolina.
- A cardiolipina apresentou menor índice de incorporação para os ácidos graxos *trans* do que a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina. Apresentando também um provável mecanismo protetor como observado no tecido cerebral. Estes efeitos podem ter o mesmo mecanismo, tendo em vista a importância funcional do cérebro e da cardiolipina.
- O emprego da ressonância magnética na análise do perfil lipídico de tecido de animais apresentou a vantagem de identificar os isômeros *trans* sem nenhum pré-tratamento da amostra, podendo ser útil na quantificação do total de isômeros *trans*, bem como para a identificação do ácido elaídico, sem o inconveniente da sobreposição de sinais comum na cromatografia gasosa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABDULLAH, A.; OTHMAN, A. Growth and lipid metabolism responses in rats fed different dietary fat sources. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.51, p.159-167, 2000.

ACKMAN, R.G.; MAG, T.K. Trans fatty acids and the potential for less in technical products. In: SÉBÉDIO, J.-L.; CHRISTIE, W.W., eds. **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: Oily Press, 1998. cap.2, p.35-58.

ALLISON, D.B. Trans fatty acids and coronary heart disease risk: epidemiology. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, n.3, suppl., p.S670-S678, 1995.

ARMSTRONG, R.A.; CHARDIGNY, J.M.; BEAUFRÉRE, B.; BRETILLON, L.; VERMUNT, S.H.F.; MENSINK, R.P.; MACVEAN, A.; ELTON, R.A.; SÉBÉDIO, J.-L.; RIEMERSMA, R.A. No effect of dietary trans isomers of α -linolenic acid on platelet aggregation and haemostatic factors in European Health Men: the TRANSLinE study. **Thromb. Res.**, New York, v.100, p.1333-141, 2000.

ARO, A.; VAN AMELSCOORT, J.; BEEKER, W.; VAN ERP-BAART, M.-A.; KAFATOS, A.; LETH, T.; VAN POPPEL, G. Trans fatty acids in dietary fats and oils from 14 European countries: the TRANSFAIR study. **J. Food Compos. Anal.**, Orlando, v.11, p.137-149, 1998.

ARUB, L. Biomarkers of fat and fatty acid intake. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, suppl., p.925S-932S, 2003.

¹ De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1997.

- ASCHERIO, A.; HENNEKENS C.H.; BURING, J.E.; MASTER, C.; STAMPFER, M.J. Trans fatty acids intake and risk of myocardial infarction. **Circulation**, Baltimore, v.89, p.94-101, 1994.
- ASCHERIO, A.; WILLET, W.C. Health effects of trans fatty acids. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.66, suppl., p.1006-1010, 1997.
- BANERJEE, I.; SAHA, S.; DUTTA, J. Comparison of the effects of dietary fish oils with different n-3 polyunsaturated fatty acid composition on plasma and liver lipids in rats. **Lipids**, Champaign, v.27, n.6, p.425-428, 1992.
- BASSO, R.; ALMEIDA-GONÇALVES, I.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação qualitativa dos ácidos graxos trans em gorduras vegetais hidrogenadas. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.33, n.1, p.57-63, 1999.
- BAYARD, C.C.; WOLFF, R.L. Trans-18:1 acids in French tub margarines and shortenings; recent trends. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.72, n.12, p.1485-1489, 1995.
- BAYLIN, A.; KABAGAMBE, E.K.; SILES, X.; CAMPOS, H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.76, p.750-757, 2002.
- BAYLIN, A.; KABAGAMBE, E.K.; ASCHERIO, A.; SPIEGELMAN, D.; CAMPOS, H. High 18:2 *trans*-fatty acids in adipose tissue are associated with increased risk of nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rican adults. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.1186-1191, 2003.
- BERDEAUX, O.; BLOND, J.P.; BRETILLON, L.; CHARDGNY, J.M.; MAIROT, T.; VATÉLE, J.M.; POUILLAIN, D.; SÉBÉDIO, J.-L. *In vitro* desaturation or elongation of monotrans isomers of linoleic acid by rat liver microsomes. **Mol. Cell Biochem.**, Dordrecht, v.185, p.17-25, 1998.

- BERDEUAX, O.; CHARDIGNY, J.-M.; SÉBÉDIO, J.-L.; MARIOT, T.; POUILLAIN, D.; VATELE, J.M.; NOËL, J.P. Effects of a trans isomer of arachidonic acid on rat platelet aggregation and eicosanoid production. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.37, p.2244-2250, 1996.
- BERGER, A.; GERMAN, J.B. Phospholipid fatty acid composition of various mouse tissues after feeding α -linolenate (18:3 n-3) or eicosatrienoate (20:3 n-3). **Lipids**, Champaign, v.25, n.8, p.473-480, 1990.
- BERGER, A.; GERMAN, B.; GERSHWIN, M.E. Biochemistry of cardiolipin: sensitivity to dietary fatty acids. **Adv. Food Nutr. Res.**, San Diego, v.37, p.259-238, 1993.
- BEYERS, E.C.; EMKEN, E.A. Metabolites of cis,trans, and trans,cis isomers of linoleic acid in mice and incorporation into tissue lipids. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1082, n.3, p.275-284, 1991.
- BEYNEN, A.C.; HERMUS, R.J.; HAUTVAST, J.G. A mathematical relationship between the fatty acid composition of the diet and that of the adipose tissue in man. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.33, p.81-85, 1980.
- BLOCK, J.M.; BARRERA-ARELLANO, D. Produtos hidrogenados no Brasil: Isômeros trans, características físico-químicas e composição em ácidos graxos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v.44, n.4, p.281-285, 1994.
- BLOND, J.P.; CHARDIGNY, J.M.; SÉBÉDIO, J.L.; GRANDGIRARD, A. Effects of dietary 18:3 n-3 trans isomers on the Δ^6 desaturation of α -linolenic acid. **J. Food Lipids**, Trumbull, v.2, p.99-106, 1995.
- BODY, D.R. The lipid composition of adipose tissue. **Prog. Lipid Res.**, Oxford, v.27, p.39-60, 1988.
- BOUÉ, C.; COMBE, N.; BILLEAUD, C.; MIGNEROT, C.; ENTRESSANGLES, B.; THERY, G.; GEOFFRION, H.; BRUN, J.L.; DALLAY, D.; LENG, J.J.

Trans fatty acids in adipose tissue of French women in relation to their dietary sources. **Lipids** Champaign, v.35, p.561-566, 2000.

BOURRE, J.M.; FRANCOIS, M.; YOUYOU, A.; DUMONT, O.; PICIOTTI, M.; PASCAL, G.; DURAND, G. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.119, p.1880-1892, 1989.

BOURRE, J.M.; FRANCOIS, M.; YOUYOU, A.; DUMONT, O.; PICIOTTI, M.; PASCAL, G.; DURAND, G. Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs: minimal requirement of linoleic acid. **Lipids**, Champaign, v.25, n.8, p.465-472, 1990.

BRETILLON, L.; CHARDINGY, J.M.; NOËL, J.P.; SÉBÉDIO, J.-L. Desaturation and chain elongation of [1-¹⁴C] mono-trans isomers of linoleic and α -linolenic acids in perfused rat liver. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.39, p.2228-2236, 1998.

BYSTED, A.; HØLMER, G.; LUND, P. Influence of moderated amounts of trans fatty acids on the formation of polyunsaturated fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.75, p.225-234, 1998.

CARLSON, S.E.; CLANDININ, M.T.; COOK, H.W.; EMKEN, E.A.; FILIER Jr., L.J. Trans fatty acids: infant and fetal development. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.66, p.717-736, 1997.

CARRIÉ, I.; CLÉMENT, M.; JAVEL, D.; FRANCÈS, H.; BOURE, J.-M. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice: effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.41, p.465-472, 2000a.

CARRIÉ, I.; CLÉMENT, M.; JAVEL, D.; FRANCÈS, H.; BOURRE, J.-M. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical

alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.41, p.473-480, 2000b.

CHA, M.C.; JONES, P.J.H. Tissue fatty acid deposition is influenced by an interaction of dietary oil source and energy intake level in rats. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.7, p.650-658, 1996.

CHARDIGNY, J.M.; BONHOMME, B.; SÉBÉDIO, J.-L.; JUANÉDA, P.; VATÈLE, J.M.; DOLY, M.; GRANDGIRARD, A. Effects of trans n-3 polyunsaturated fatty acids on the rat electroretinogram. **Nutr. Res.**, New York, v.18, n.10, p.1711-1721, 1998.

CHO, H.P.; NAKAMURA, M.T.; CLARKE, S.D. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.274, p.471-477, 1999.

CHOY, P.C.; TRAN, K.; HATCH, G.M.; KROEGER, E.A. Phospholipid metabolism in the mammalian heart. **Prog. Lipid Res.**, Oxford, v.36, n.2/3, p.85-101, 1997.

CHRISTENSEN, M.S.; HøY, C.E.; BECKER, C.C.; REDGRAVE, T. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.61, p.56-61, 1995.

CLANDININ, M.T.; JUMPSSEN, J. Fatty acid metabolism in brain in relation to development, membrane structure, and signaling. In: YEHUDA, S.; MOSTOFISKY, D.I. **Handbook of essential fatty acid biology: biochemistry, physiology, and behavioral neurobiology.** Totowa: Humana Press, 1997. cap.2, p.15-65.

CLANDININ, M.T. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. **Lipids**, Champaign, v.34, p.131-137, 1999.

- CULLIS, P.R.; FENSKE, D.B.; HOPE, M. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In: VANCE, D.E.; VANCE, J.E., eds. **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. Amsterdam, New York: Elsevier, 1996. cap.1, p.1-34. (New comprehensive biochemistry, v.31).
- CUNNANE, S.C.; ANDERSON, M.J. Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturated, and [1-¹⁴C] linoleate oxidation. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.38, p.805-812, 1997a.
- CUNNANE, S.C.; ANDERSON, M.J. The majority of dietary linoleate in growing rats is β -oxidized or stored in visceral fat. **J. Nutr.**, Bethesda, v.127, p.146-152, 1997b.
- DASHTI, N.; FENG, Q.; FREEMAN, M.R.; GANDHI, M.; FRANKLIN, F.A. Trans polyunsaturated fatty acids have more adverse effects than saturated fatty acids on the concentration and composition of lipoproteins secreted by human hepatoma HepG2 cells. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, p.2651-2659, 2002.
- DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.822, p.1-42, 1985.
- DENKE, M.A. Trans fatty acids and coronary heart disease risk: serum lipid concentrations in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** Bethesda, v.62, suppl., p.693-700, 1995.
- DIEHL, B.W.K. Multinuclear high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: HAMILTON, R.J., ed. **Lipid analysis in oils and fats**. London, New York: Blackie Academic & Professional, 1998. cap.4, p.87-135.
- DIETSCHY, J.M. Trans fatty acids and coronary heart disease risk: experimental mechanism: regulation of plasma LDL cholesterol. **Am. J. Clin. Nutr.** Bethesda, v.62, suppl., p.S679-S688, 1995.

- DIETSCHY, J.M. Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.65, n.5, p.1581-1589, 1997.
- DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are these so many lipids? **Annu. Ver. Biochem.**, Palo Alto, v.66, p.199-232, 1997.
- EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. **J. Chromatogr., Biomed. Appl.**, Amsterdam, v.671, n.1/2, p.113-131, 1995.
- ELIAS, S.L.; INNIS, S.M. Bakery foods are the major dietary source of trans-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.102, p.46-56, 2002.
- EMKEN, E.A. Trans fatty acids and coronary heart disease risk: physicochemical properties, intake, and metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, p.659-669, 1995.
- FELDMAN, E.B.; KRIS-ETHERSON, P.M.; KRITHEVISKY, D.; LICHTENSTEIN, A.H. Position paper on trans fatty acids. ASCN/AIN task force on trans fatty acids. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.63, p.663-670, 1996.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.226, p.497-509, 1957.
- GARLAND, SACKS, F.M.; COLDITZ, G.A.; RIMM, E.B.; SAMPSON, L.A.; WILLET, W.C.; HUNTER, D.J. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.67, p.25-30, 1998.
- GATTO, L.M.; LYONS, M.A.; BROWN, A.J.; SAMMAN, S. Trans fatty acids and cholesterol metabolism: mechanism studies in rats and rabbits fed

- semipurified diets. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.52, p.435-441, 2001.
- GATTO, L.M.; LYONS, M.A.; BROWN, A.J.; SAMMAN, S. Trans fatty acids affect metabolism in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, p.1242-1248, 2002.
- GRADGIRARD, A.; BOURRE, J.M.; JULLIARD, F.; HOMAYOUN, P.; DUMONT, O.; PICIOTTI, M., SEBEDIO, J.L. Incorporation of trans long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in rat brain structures and retina. **Lipids**, Champaign, v.29, n.4, p.251-258, 1994.
- GUESNET, P.; ALASNIER, C.; ALESSANDRI, J.M.; DURAND, G. Modifying the n-3 fatty acid content of the maternal diet to determine the requirements of fetal and suckling rat. **Lipids**, Champaign, v.32, p.527-534, 1997.
- GUNSTONE, F.D. The composition of hydrogenated fats by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.70, n.10, p.965-970, 1993.
- GUNSTONE, F.D.; SHUKLA, V.K.S. NMR of lipids. **Annu. Rep. NMR Spectrosc.**, San Diego, v.33, p.219-237, 1995.
- GUZMÁN, M.; KLEIN, W.; Del PULGAR, T.G.; GREELEN, MJH. Metabolism of trans fatty acids by hepatocytes. **Lipids**, Champaign, v.34, p.381-386, 1999.
- HøY, C.E., HøLMER, G. Incorporation of cis-octadecenoic acids into the rat liver mitochondrial membrane phospholipids and adipose tissue triglycerides. **Lipids**, Champaign, v.16, p.102-108, 1981.
- HøY, C.E., HøLMER, G. Dietary linoleic acid and the fatty acid profiles in rats fed partially hydrogenated marine oils. **Lipids**, Champaign, v.23, p.973-980, 1988.

- HøY, C.E., HøLMER, G. Influence of dietary linoleic acid and trans fatty acids on the fatty profile of cardiolipins in rats. **Lipids**, Champaign, v.25, n.8, p.455-459, 1990.
- HARTMAN, L.; LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-477, 1973.
- HAZEL, J.R.; WILLIAMS, E.E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. **Progr. Lipid Res.**, Oxford, v.29, p.167-227, 1990.
- HOCK, F.L. Cardiolipin and biomembrane function. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1113, p.71-133, 1992.
- HORNSTRA, G. Importance of polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 families for early human development. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v.103, p.379-389, 2001.
- HU, F.B.; MANSON, J.E.; WILLET, W.C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.20, n.1, p.5-19, 2001.
- HU, F.B.; STAMPFER, M.; MANSON, J.E.; TIMM, E.B.; WOLK, A.; COLDTIZ, G.A.; HENNEKENS, C.H.; WILLET, W.C. dietary intake of α -linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.69, p.890-897, 1999.
- INNIS, S.; KING, D.J. Trans fatty acids in human milk are inversely associated with concentrations of essential all-cis n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids of breast-fed infants. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, p.383-390, 1999.
- JUDD, J.T.; CLEVIDENCE, B.A.; MUESING, R.A.; WITTES, J.; SUNKIN, M.E.; PODCZASY, J.J. Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids

and lipoproteins of health men and women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.59, p.861-868, 1994.

JUDD, J.T.; BAER, D.J.; CLEVIDENCE, B.A.; KRIS-ETHERTON, P.; MUESING, R.A.; IWANE, M. Dietary cis and trans monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. **Lipids**, Champaign, v.37, p.123-131, 2002.

KATAN, M.B.; ZOCK, P.L.; MENSINK, R.P. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. **Ann. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.15, p.473-493, 1995.

KINSELLA, J.E.; BRUCKNER, G.; MAI, J.; SHIMP, J. Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.34, p.2307-2318, 1981.

KOGA, T.; NONAKA, M.; GU, J.Y.; SUGANO, M. Linoleic and α -linolênic acids differently modify the effects of elaidic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and some immune indices in rats. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.77, p.645-656, 1997.

KRINKE, G.J., ed. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000. 756p. (The handbook of experimental animals).

KRIS-ETHERTON, P.; YU, S. Individual fatty acids effects on plasma lipids and lipoproteins; human studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.65, suppl., p.1628-1644, 1997.

KWAN, K.Y.; WANG, L., CHAM, K.P.; CHEN, Z.Y. Inhibitory effect of linoleic acid on chain elongation and desaturation of 18:2 *c,t* isomers in lactating and neonatal rats. **Lipids**, Champaign, v.33, n.4, p.409-416, 1998.

- LARQUÉ, E.; PÉREZ-LLAMAS, F.; PUERTA, V.; GIRÓN, M.D.; SUÁREZ, M.D.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids affect docosahexaenoic acid concentration in plasma and liver but not brain of pregnant and fetal rats. **Pediatr. Res.**, Baltimore, v.47, p.278-283, 2000.
- LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids affect the essential fatty acids concentration of rat milk. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.847-851, 2000.
- LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids affect the essential fatty-acid concentration of rat milk. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.847-851, 2000.
- LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. **Early Hum. Dev.**, Oxford, v.65, suppl., p.S31-S41, 2001.
- LEAT, W.M.F. Dietary linoleic acid and tissue function in rodents. In: GALLI, C.; SIMOPOULUS, A.P., eds. **Dietary w3 and w6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality**. New York: Plenum Press, 1989. p.219-226. (NATO ASI series. Series A, Life sciences, v.171), (NATO Advanced Research Workshop on Dietary [Omega] 3 and [Omega] 6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality, 1988, Belgirate).
- LEE, J.H.; FUKUMOTO, M.; NISHIDA, H.; IKEDA, I.; SUGANO, M. The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.119, p.1893-1899, 1998.
- LEE, J.; YU, B.P.; HERLIHY, J.T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.26, n.3/4, p.260-265, 1999.
- LEMAITRE, R.N.; KING, I.B.; RAGHUNATHAN, T.E.; PEARCE, R.M.; WEINMANN, S.; KNOPP, R.H.; COPASS, M.K.; COBB, L.A.;

- SISCOVICK, D.S. Cell membrane *trans*-fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. **Circulation**, Baltimore, v.105, p.697-701, 2002.
- LICHTENSTEIN, A.H. Dietary fat: a history. **Nutr. Rev.**, New York, v.57,n.1, p.11-14, 1999.
- LICHTENSTEIN, A.H.; JAUHAINEN, M.; McGLADDERY, S.; AUSMNM, L.M.; JALBERT, S.M.; VILELLA-BACH, M.; FROHLICH, J.; SCHAEFER, E.J. Impact of hydrogenated fat on high density lipoprotein subfractions and metabolism. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.42, p.597-604, 2001.
- LOI, C.; CHARDIGNY, J.-M.; ALMANZA, S.; LECLERE, L.; GINIES, C.; SÉBÉDIO, J.-L. Incorporation and metabolism of dietary trans isomers of linolenic acid alter the fatty acid profile of rat tissues. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.2550-2555, 2000.
- LOÏ, C.; CHARDIGNY, J.M.; BERDEAUX, O.; VATÈLE, J.M.; POUILLAIN, D.; NOËL, J.P.; SÉBÉDIO, J.L. Effects of three trans isomers of eicosapentaenoic acid on rat platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.80, p.656-661, 1998.
- LOÏ, C.; CHARDIGNY, J.-M.; ALMANZA, S.; LECIERE, L.; GINIES, C.; SÉBÉDIO, J.-L. Incorporation and metabolism of dietary trans isomers of linolenic acid alter the fatty acid profile of rat tissues. **J. Nutr.**, Bethesda, v.103, p.2550-2555, 2000.
- MA, B.J.; TAYLO, W.A.; DOLINSKY, V.W.; HATCH, G.M. Acylation of monolysocardiolipin in rat heart. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.40, p.1837-1845, 1999.
- McGEE, C.D.; LIEBERMAN, P.; GREENWOOD, C.E. Dietary fatty acid composition induces comparable changes in cardiolipin fatty acid profile of heart and brain mitochondria. **Lipids**, Champaign, v.31, p.611-616, 1996.

- MAHFOUZ, M.; HOLMAN, R.T. Desaturation of isomeric cis 18:1 acids, **Lipids**, Champaign, v.15, n.1, p.63-65, 1980.
- MAHFOUZ, M.M.; SMITH, T.L.; KUMMEROW, F.A. Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat liver microsomes. **Lipids**, Champaign, v.19, p.214-222, 1984.
- MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Hydrogenated fat high in trans monoenes with an adequate level of linoleic acid has no effect on prostaglandin synthesis in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, p.15-24, 1999.
- MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Hydrogenated fat high in trans monoenes with an adequate level of linoleic acid has no effect on prostaglandin synthesis in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, p.15-24, 1999.
- MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos trans: formação, detecção e implicações na saúde humana. In: MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; PEREIRA, J.L.; PASTORE, G.M., eds. *Ciências de alimentos: avanços e perspectivas*. Campinas: UNICAMP, 2001. v.11, cap.44, p.166-168. (Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 3, Campinas, 2001).
- MANN, G.V. Metabolic consequences of dietary trans fatty acids. **Lancet**, London, v.343, p.1268-1271, 1994.
- MARZO, I.; ALAVA, M.A.; PIÑEIRO, A.; NAVAL, J. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in human cells: evidence that two different Δ^6 desaturase activities may exist. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1301, p.263-272, 1996.
- MATTHAN, N.R.; JONES, P.T.H. Differential effects of individual trans fatty acids isomers on lipoprotein assembly and metabolism. **Nutr. Rev.**, New York, v.57, n.9, p.283-284, 1999.

- McDONALD, R.E.; MOSSOBA, M.M. *Trans fatty acids: labeling, nutrition, and analysis*. In: SEBEDIO, J.L.; PERKINS, E.G. **New trends in lipid and lipoprotein analysis**. Champaign: AOCS Press, 1995. cap.8, p.161-197.
- MCGEE, C.D.; LIEBERMAN, P.; GREENWOOD, C.E. Dietary fatty acid composition induces comparable changes in cardiolipin fatty acid profile of heart and brain mitochondria. **Lipids**, Champaign, v.31, p.611-616, 1996.
- McKEIGUE, P. Trans fatty acids and coronary heart disease: weighing the evidence against hardened fat. **Lancet**, London, v.345, p.269-270, 1995.
- MIYAKE, Y.; YOKOMIZO, K. Determination of Cis- and Trans-18:1 fatty acid isomers in hydrogenated vegetable oils by high-resolution carbon nuclear magnetic resonance. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.75, n.7, p.801-805, 1998.
- MOORE, C.E.; ALFIN-SLATER, R.B.; AFTERGOOD, L. Incorporation and disappearance of trans fatty acids in rat tissues. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.33, p.2318-2323, 1980.
- MOORE, C.E.; DHOPESHWARKAR, G.A. Placental transport of trans fatty acids in the rat. **Lipids**, Champaign, v.15, p.1023-1028, 1980.
- MOREIRA, N.X. **Estudo comparativo da influência de diferentes fontes lipídicas sobre a incorporação de ácidos graxos em ratos Wistar portadores do tumor de Walker-256**. São Paulo, 1997. 121p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- MOREIRA, N.X.; CURI, R.; PADOVESE, R.; MANCINI-FILHO, J. Incorporation of dietary trans monounsaturated fatty acids into tissues of

Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.34, p.501-508, 2001.

MORGADO, N.; SANHUEZA, J.; GALLEGUILLOS, A.; GARRIDO, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Effect of the degree of hydrogenation of dietary fish oil on the trans fatty acid content and enzymatic activity of rats hepatic microsomes. **Lipids**, Champaign, v.33, p.669-673, 1998.

MORGADO, N.; SANHUEZA, J.; GALLEGUILLOS, A.; GARRIDO, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Effect of dietary hydrogenated fish oil on the plasma lipoprotein profile and on the fatty acid composition of different tissues of the rat. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v.43, p.310-318, 1999.

NELSON, G.J. Dietary fat, trans fatty acids, and risk of coronary heart disease. **Nutr. Rev.**, New York, v.56, n.8, p.250-252, 1998.

NESTEL, P.; NOAKES, M.; BELLING, B.; McARTHUR, R.; CLIFTON, P.; JANUS, E.; ABBEY, M. Plasma lipoprotein lipid and lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.33, p.1029-1036, 1992.

NICOLOSI, R.J. Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.65, suppl., p.1617-1627, 1997.

NTAMBI, J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.40, p.1549-1558, 1999.

PADOVESE, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos trans. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura & os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. cap.36, p.509-521.

- PALOMBO, J.D.; DEMICHELE, S.J.; LIU, J.W.; BISTRAN, B.R.; HUANG, Y.S. Comparison of growth and fatty acid metabolism in rats fed diets containing equal levels of γ -linolenic acid canola oil or borage oil. **Lipids**, Champaign, v.35, n.9, p.975-981, 2000.
- PARKS, J.S.; HUGGINS, K.W.; GEBRE, A.K.; BURLESON, E.R. Phosphatidylcholine fluidity and structure affect lecithin: cholesterol acyltransferase activity. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.41, p.546-553, 2000.
- PAWLOSKEY, R.J.; WARD, G.; SALEM Jr., N. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. **Lipids**, Champaign, v.31, p.S103-S107, 1996.
- PECK, M.D. Interactions of lipids with immune function I: biochemical effects of dietary lipids on plasma membranes. **J. Nutr.**, Bethesda, v.15, p.466-478, 1994.
- PFEFFER, P.E.; LUDDY, F.E.; UNRUH, J. Analytical ^{13}C NMR: a rapid, nondestructive method for determining the cis, trans composition of catalytically treated unsaturated lipid mixtures. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.54, p.380-386, 1977.
- PERONA, J.S.; PORTILHO, M.P.; MACARULLA, M.T.; TUEROS, A.I.; RUIZ-GUTIEREZ, V. Influence of dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.84, p.765-774, 2000.
- PETTERSON, J.; OPSTVEDT, J. *Trans* fatty acids. Fatty acid composition of lipids of the brain and other organs in suckling piglets. **Lipids**, Champaign, v.27, p.761-769, 1992.
- PORTERO-OTÍN, M.; BELLMUNT, M.J.; RUIZ, M.C.; BARJA, G.; PAMPLONA, R. Correlation of fatty acid unsaturation of the major liver mitochondrial phospholipids classes in mammals to their maximum life span potential. **Lipids** Champaign, v.36, p.491-498, 2001.

- POUMÈS-BALLIHAUT, C.; LANGELIER, B.; HOULIER, F.; ALESSANDRI, J.-M.; DURAND, G.; LATGE, C.; GUESNET, P. Comparative bioavailability of dietary α -linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. **Lipids**, Champaign, v.36, p.793-800, 2001.
- PRECHT, D.; MOLKENTIN, J. Overestimates of oleic and linoleic acid contents in materials containing trans fatty acids and analyzed with short packed gas chromatographic columns. **Lipids**, Champaign, v.36, n.2, p.213-215, 2001.
- PRECHT, D.; MOLKENTIN, J. Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.6, p.791-809, 1996.
- RACLOT, T.; HOLM, C.; LANGIN, D. A role for hormone-sensitive lipase in the selective mobilization of adipose tissue fatty acids. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1532, p.88-96, 2001.
- RATNAYAKE, W.M.N.; HOLLYWOOD, R.; O'GRADY, E.; BEARE-ROGERS, J.L. Determination of cis and trans-Octadecenoic acids in margarines by gas liquid chromatography-infrared spectrophotometry. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.67, n.11, p.804-810, 1990.
- RATNAYAKE, W.M.N.; CHEN, Z.Y.; PELLETIER, G.; WEBER, D. Occurrence of 5c,8c,11c,15t - Eicosatetraenoic acid and other unusual polyunsaturated fatty acids in rats fed partially hydrogenated canola oil. **Lipids**, Champaign, v.29, n.10, p.707-714, 1994.
- RATNAYAKE, W.M.N. Analysis of *trans* fatty acids. In: SÉBÉDIO, J.-L.; CHRISTIE, W.W., eds. **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: Oily Press, 1998. cap.4, p.115-162.
- RATNAYAKE, W.M.N.; PELLETIER, G.; HOLLYWOOD, R.; BACLER, S.; LEYTE, D. Trans fatty acids in Canadian margarine: recent trends. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.75, p.1587-1594, 1998.

- RAZ, A.; KAMIN-BELSKY, N.; PRZEDECKI, F.; OBUKOWICZ, M.G. Fish oil inhibits $\Delta 6$ desaturase activity in vivo: utility in dietary paradigm to obtain mice depleted to arachidonic acid. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.8, p.558-565, 1997.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee and the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- ROCQUELIN, G.; GUENOT, L.; ASTORG, P.O.; DAVID, M. Phospholipid content and fatty acid composition of human heart. **Lipids**, Champaign, v.24, n.9, p.775-781, 1989.
- ROOS, N.M.; SCHOUTEN, E.G.; KATAN, M.B. Consumption of a solid fat rich in lauric acid results in a more favorable serum lipid profile in healthy men and women than consumption of a solid fat rich in trans-fatty acids. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.242-245, 2001.
- ROOS, N.M.; SIEBELINK, E.; BOTS, M.L.; VAN TOL, A.; SCHOUTEN, E.G.; KATAN, M.B. Trans monoinsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.56, n.7, p.674-679, 2002.
- SACCHI, R.; ADDEO, F.; PAOLILLO, L. ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil: an overview. **Magn. Reson. Chem.**, Bognor Regis, v.35, suppl., p.133-145, 1997.
- SANTORA, J.E.; PALMQUIST, D.L.; ROEHIRG, K.L. Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.298-215, 2000.
- SALMINEN, I.; MUTANEN, M.; JAUHAINEN, M.; ARO, A. Dietary trans fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.9, p.93-98, 1998.

- SCHAEFER, E.J. Lipoprotein, nutrition, and health disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.75, p.191-212, 2002.
- SCHLAME, M.; RUA, D.; GREENBERG, M.L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Prog. Lipid Res.**, Oxford, v.39, p.257-288, 2000.
- SCRIMGEOUR, C.M.; MACVEAN, A.; FERNIE, C.E.; SÉBÉDIO, J.-L.; RIEMERSMA, R.A. Dietary trans α -linolenic acid does not inhibit $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturation of linoleic acid in man. **Eur. J. Lipid Sci. Tech.**, Weinheim, v.103, p.341-349, 2001.
- SÉBÉDIO, J.-L.; CHARDIGNY, C.H. Biochemistry of *trans* polyunsaturated fatty acids. In: SÉBÉDIO, J.-L.; CHRISTIE, W.W., eds. **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: Oily Press, 1998. cap.6, p.191-215.
- SÉBÉDIO, J.L.; GRANDGIRARD, A.; PRÉVOST, J. Linoleic acid isomers in heat-treated sunflower oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.65, p.362-366, 1988.
- SEMMA, M. Trans fatty acids: properties, benefits and risks. **J. Health Sci.**, Tokyo, v.48, n.1, p.7-13, 2002.
- SEPPANNE-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; BACKLUND, P.; VANHANES, H.; VIIKARI, J. Elaidic and trans-vaccenic acids in plasma phospholipids as indicators of dietary intake of 18:1 trans-fatty acids. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v.687, p.371-378, 1996.
- SEPPANNE-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.465, p.39-62, 2002.
- SIMOPOULUS, A.P. Omega-3 fatty acids. Part I: metabolic effects of omega-3 fatty acids and essentiality. In: SPILLER, G.A., ed. **Handbook of lipids in human nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 1996. cap.2.4, p.51-73.

- SIMOPOULUS, A.P. Trans fatty acids. In: SPILLER, G.A., ed. **Handbook of lipids in human nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 1996. cap.2.4, p.91-99.
- SRINIVASARAO, P.; VAJRESWARI, A.; SURYAPRAKASH, P.; RUPALATHA, NARAYANAREDDY, K. Lipid composition and fatty acid profiles of myelin and synaptosomal membranes of rat brain in response to the consumption of different fats. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.8, n.9, p.527-534, 1997.
- SPRECHER, H. (n-3) and (n-6) fatty acid metabolism. In: GALLI, C.; SIMOPOULUS, A.P., eds. **Dietary w3 and w6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality**. New York: Plenum Press, 1989. p.69-67. (NATO ASI series. Series A, Life sciences, v.171), (NATO Advanced Research Workshop on Dietary [Omega] 3 and [Omega] 6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality, 1988, Belgirate).
- SUMMERS, L.K.; BAMES, S.C.; FIELDING, B.A.; BEYSEN, C.; ILIC, V.; HUMPHREYS, S.M.; FRAYN, K.N. Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.71, p.1470-1477, 2000.
- TAHIN, Q.S.; BLUM, M.; CARAFOLI, E. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications. **J. Biochem.**, Tokyo, v.121, p.5-13, 1981.
- The official International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC. IUPAC DEFINITIVE rules for nomenclature of organic chemistry. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.82, n.21, p.5545-5574, 1960.
- TRAN, T.N.; RETTERSTOL, K.; CHRISTOPHERSEN, B.O. Differences in the conversion of the polyunsaturated fatty acids [1-¹⁴C] 22:6 (n-3) in isolated rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1532, p.137-147, 2001.

- TREADWELL, R.M.; PRONCZUK, A.; HAYES, K.C. Glyceride stearic acid content and structure affect the energy available to growing rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, p.3356-3362, 2002.
- TURPEINEN, A.M.; WÜBERT, J.; ARO, A.; LORENTZ, R.; MUTANEN, M. Similar effects of diets rich in stearic acid or trans-fatty acids on platelet function and endothelial prostacyclin production in humans. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.18, p.316-322, 1998.
- VAN GREEVENBROEK, M.M.L.; ROBERTUS-TEUMISSEN, M.G.; ERKELENS, D.W.; BRUIN, T.W.A. Lipoprotein secretion by caco-2 cells is affected differently by trans and cis unsaturated fatty acids: effects of carbon chain length and position of the double bond. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.61, p.617, 1995.
- VAN POPPEL, G.; VAN ERP-BAART, M.A.; LETH, T.; GEVERS, E.; VAN AMELSVOORT, J.; LANZMAMM-PETITHORY, D.; KAFATOS, A.; ARO, A. Trans fatty acids in foods in Europe: the TRANSFAIR study. **J. Food Compos. Anal.**, Orlando, v.11, p.112-136, 1998.
- WAINWRIGHT, P.E. Essential fatty acids and behavior. Is there role for the eicosanóides? In: YEHUDA, S.; MOSTOFSKY, D.I. **Handbook of essential fatty acid biology**: biochemistry, physiology, and behavioral neurobiology. Totowa: Humana Press, 1997. cap.14, p.299-234.
- WATKINS, S.M.; CARTE, L.C.; GERMAN, J.B. Docosahexaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.39, p.1583-1588, 1998.
- WATKINS, S.M.; LIN, T.Y.; DAVIS, R.M.; CHING, J.R.; DePETERS, E.J.; HALPERN, G.M.; WALZEM, R.L.; GERMAN, J.B. Unique phospholipid metabolism in mouse heart in response to dietary docosahexaenoic or α -linolenic acids. **Lipids**, Champaign, v.36, n.3, p.247-254, 2001.

- WAUBEN, I.P.M.; XING, H.-C.; McCHTCHENON, D.; WAINWRIGHT, P.E. Dietary trans fatty acids combined with a marginal essential fatty acid status during the pre- and postnatal periods do not affect growth or brain fatty acids but may alter behavioral development in B6D2F mice. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.1568-1573, 2001.
- WEBER, N.; VOSMANN, K.; BRUHL, L.; MUKHERJEE, K.D. Metabolism of dietary petroselinic acid: a dead-end metabolite of desaturation/chain elongation reactions. **Nutr. Res.**, New York, v.17, n.1, p.89-97, 1997.
- WEBER, N.; MUKHERJEE, K.D. Steep rise of docosahexaenoic acid in phosphatidylethanolamines of heart and liver of rats fed native olive oil or rapeseed oil. **Nutr. Res.**, New York, v.18, n.5, p.851-861, 1998.
- WEBER, N.; KIEWITT, I.; MUKHERJEE, K. Modulation of brain lipids of rats by various dietary oils: sunflower, high-oleic sunflower, olive, rapeseed or coriander oil. **Nutr. Res.**, New York, v.19, n.7, p.997-1007, 1999.
- WEBER, N.; KLEIN, E.; MUKHERJEE, K.D. The composition of the major molecular species of adipose tissue triacylglycerols of rats reflects those of dietary rapeseed, olive and sunflower oils. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, p.726-732, 2002.
- WILLET, W.C.; STAMPFER, M.J.; MASON, J.E. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. **Lancet**, London, v.341, p.581-85, 1993.
- WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.7, p.2-15, 1996.
- WOLFF, R.L.; COMBE, N.A.; ENTESSANGLES, B. Positional distribution of fatty acids in cardiolipin of mitochondria from 21- day-old rats. **Lipids**, Champaign, v.20, p.908-914, 1985.

- WOLFF, R.L.; ENTRESSANGLES, B. Compositional changes of fatty acids in the 1 (')-and 2 (2'')-positions of cardiolipin from liver, heart, and kidney mitochondria of rats fed a low-fat diet. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1082, p.136-142, 1991.
- WOLFF, R.L.; COMBE, N.A.; ENTRESSANGLES, B.; SÉBÉDIO, J.-L.; GRANDGIRARD, A. Preferential incorporation of dietary *cis*-9, *cis*-12, *trans*-15 18:3 acid into rat cardiolipins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1168, p.285-291, 1993.
- WOLFF, R.; PRECHT, D.; MOLKENTIN, J. *Trans*- 18:1 acid content and profile in human milk lipids: critical survey of data in connection with analytical methods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.75, p.661-671, 1998.
- WOLFF, R.L.; COMBE, N.A.; DESTAILLATS, F.; BOUÉ, C. Follow-up of the $\Delta 4$ to $\Delta 16$ *trans*-18:1 isomer profile and content in French processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995-1999: analytical and nutritional implications. **Lipids**, Champaign, v.35, n.8, p.815-825, 2000.
- YAMAOKA, S.; URADE, R.; KITO, M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. **J. Nutr.**, Bethesda, v.118, p.290-296, 1988.
- ZEVENBERGEN, J.L.; HOUTSMULLER, U.M.T.; GOTTENBOS, J.J. Linoleic acid requirement of rats fed *trans* fatty acids. **Lipids** Champaign, v.23, p.178-186, 1988.
- ZHOU, L.; NILSSON, A. Sources of eicosanoids precursor fatty acid pools in tissues. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.42, p.1521-1542, 2001.