

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E METABOLISMO

MARIANA ARRUDA SILVA

Alteração no perfil de ácidos graxos em crianças e adolescentes após suplementação com barra de leite enriquecida de micronutrientes.

Ribeirão Preto - SP
2022

MARIANA ARRUDA SILVA

Alteração no perfil de ácidos graxos em crianças e adolescentes após suplementação com barra de leite enriquecida de micronutrientes.

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Metabolismo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline Pontes Monteiro.

Ribeirão Preto - SP
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Departamento de Ciências da Saúde - Nutrição e Metabolismo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

SILVA, Mariana Arruda.

Alteração no perfil de ácidos graxos em crianças e adolescentes após suplementação de barra de leite enriquecida com micronutrientes / Mariana Arruda Silva ; orientadora Dr^a. Jacqueline Pontes Monteiro. – Ribeirão Preto, 2022.

130 f. : il.

Tese (Doutorado)--Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências da Saúde. Área de concentração: Nutrição e Metabolismo.

Versão corrigida

1. Ácidos graxos. 2. Vitaminas. 3. Minerais. 4. Crianças. I. Alteração no perfil de ácidos graxos em crianças e adolescentes após suplementação com barra de leite enriquecida de micronutrientes. II. Monteiro, Jacqueline Pontes.

SILVA, M. A. Alteração no perfil de ácidos graxos em crianças e adolescentes após suplementação com barra de leite enriquecida de micronutrientes. 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Nutrição e Metabolismo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^(a). Dr^(a)..:

Instituição:

Julgamento:

Prof^(a). Dr^(a)..:

Instituição:

Julgamento:

Prof^(a). Dr^(a)..:

Instituição:

Julgamento:

*À minha filha Mel Arruda Borges, minha mãe Celuta Pires
M. Arruda e à minha orientadora e grande amiga Jacqueline
Pontes Monteiro, pelo incentivo, apoio e carinho, sem o qual
eu não teria chegado até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À toda a equipe de professores, alunos, pós-graduandos, técnicos de laboratório, pesquisadores e cientistas que fizeram parte do *Brazil Micronutrient Project*, um trabalho pioneiro, de colaboração entre a USP e a *Nestlé Health Science* e de grande importância para a área da Nutrição.

À todas as crianças e adolescentes, aos seus familiares e às escolas que participaram deste estudo, pelo empenho e colaboração com a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do processo 12/20421-8.

Ao Curso de Nutrição e Metabolismo da FMRP-USP pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos meus colegas nutricionistas do HC Criança do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por todo o apoio diário.

Ao meu colega Danilo Silva pelas aulas de linguagem computacional que foram de grande importância para que eu pudesse desenvolver as análises estatísticas no programa R.

Aos professores da Pós-graduação da USP de Ribeirão Preto, das Faculdades de Medicina e de Filosofia, Ciências e Letras, pelo aprendizado.

Às minhas amigas Carolina Hunger Malek Zadeh e Vanessa Balbino da Silva que são minha família em Ribeirão Preto, por estarem comigo em todos os momentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, M. A. **Alteração no perfil de ácidos graxos em crianças e adolescentes após suplementação com barra de leite enriquecida de micronutrientes.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Nutrição e Metabolismo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

Este ensaio clínico *N-of-1* de natureza longitudinal e retrospectiva, avalia a reprodutibilidade das alterações no perfil de ácidos graxos eritrocitários em 232 crianças saudáveis de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com 12 vitaminas e 5 minerais nos anos de 2013 e 2014, e descreve variáveis preditoras para as alterações encontradas no perfil de ácidos graxos. A significância da resposta à intervenção foi avaliada por meio da análise de regressão para a média. A regressão LASSO com técnica de reamostragem em 1000 *bootstrapping* foi realizada para a seleção de variáveis preditoras para a resposta dos ácidos graxos. As variáveis preditoras incluíram 363 variáveis de dados bioquímicos, antropométricos, ingestão alimentar, níveis de ácidos graxos eritrocitários e vitaminas plasmáticas. A suplementação com a barra de leite enriquecida com micronutrientes levou ao aumento dos ácidos graxos oleico, dihomo-gama-linolênico, araquidônico e docosaetanoico e estes resultados foram replicados nas populações. Foram encontradas 22 variáveis preditoras para o aumento do oleico que incluíram o aumento de retinol plasmático, o aumento de triglicerídeos e a redução da glicemia. Alguns ácidos graxos foram preditores para a resposta do dihomo-gama-linolênico, araquidônico e docosaetanoico. A suplementação com a barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais levou à uma melhora no perfil de ácidos graxos nas populações deste estudo. Este trabalho evidencia o impacto de múltiplas variáveis, incluindo os micronutrientes, no metabolismo dos ácidos graxos. Os resultados encontrados neste estudo precisam ser investigados em outras populações de crianças e adolescentes.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Vitaminas. Minerais. Crianças.

ABSTRACT

SILVA, M. A. **Fatty acids response to supplementation with milk bar enriched with micronutrients in children and adolescents.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Nutrição e Metabolismo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

This longitudinal and retrospective N-of-1 clinical trial evaluates the replication of changes in erythrocytes fatty acids in 232 children aged 9 to 13 years of age supplemented with fortified milk bar with 12 vitamins and 5 minerals in 2013 and 2014 and describes predictor variables for the changes in fatty acid profile. The significance of response was assessed by regression to the mean. LASSO regression with 1000 bootstrapping was performed to select predictors for fatty acid response. Predictor variables included 363 variables of clinical biochemistry, body measures, dietary components, fatty acid and vitamin levels. The milk bar supplementation led to increasing levels of oleic, dihomo-gamma-linolenic, arachidonic, and docosahexaenoic and these results were replicable among populations. Twenty-two predictor variables for increased oleic were found, which included increased plasma retinol, increased triglycerides, and decreased blood glucose. Some fatty acids were predictors for dihomo-gamma-linolenic, arachidonic, and docosahexaenoic changes. Supplementation with the milk bar fortified with vitamins and minerals led to an improvement in fatty acid profile in the populations of this study. This work highlights the impact of multiple variables on fatty acid metabolism, including micronutrients. The results found in this study need to be investigated in other populations of children and adolescents.

Keywords: Fatty acids. Vitamins. Minerals. Children.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas, antropométricas e clínicas de 232 crianças e adolescentes que participaram do estudo nos anos de 2013 e 2014.	51
Tabela 2 - Lipidograma de 110 crianças e adolescentes antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2013. ...	53
Tabela 3 - Lipidograma de 122 crianças e adolescentes antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2014. ...	53
Tabela 4 - Características do consumo alimentar antes e após suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em 110 crianças e adolescentes que participaram do estudo em 2013.	54
Tabela 5 - Características do consumo alimentar antes e após suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em 122 crianças e adolescentes que participaram do estudo em 2014.	55
Tabela 6 - Perfil vitamínico basal das crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade que participaram do estudo nos anos de 2013 e de 2014.	58
Tabela 7 – Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2013.	59
Tabela 8 - Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2014.	61
Tabela 9 - Ácidos graxos eritrocitários basais de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos que participaram do estudo em 2013 e 2014.	64
Tabela 10 - Alteração no perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes em 2013.	65
Tabela 11 - Alteração no perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes em 2014.	67
Tabela 12 - Visão geral das alterações nos ácidos graxos eritrocitários de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade, submetidas à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais, que participaram do estudo nos anos de 2013 e 2014.	69
Tabela 13 - Análise longitudinal do perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de 48 crianças e adolescentes que participaram do estudo em ambos os anos de 2013 e 2014.	70
Tabela 14 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade que participaram do estudo nos anos de 2013 e de 2014.	73

Tabela 15 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2013, agrupadas por níveis de ácido graxo linoleico.....	74
Tabela 16 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2014, agrupadas por níveis de ácido graxo linoleico.....	74
Tabela 17 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2013, agrupadas por níveis de ácido graxo alfa-linolênico.	75
Tabela 18 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2014, agrupadas por níveis de ácido graxo alfa-linolênico.	76
Tabela 19 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO associadas ao aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.....	77
Tabela 20 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO com reamostragem associadas ao aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação de vitaminas e minerais na população do estudo.	77
Tabela 21 - Resultados das análises de regressão linear para as variáveis preditoras do aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais.	79
Tabela 22 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.....	80
Tabela 23 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO associadas ao aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	82
Tabela 24 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO com reamostragem associadas ao aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	82
Tabela 25 - Resultados da análise de regressão linear simples para as variáveis preditoras do aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais.....	83
Tabela 26 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	84

Tabela 27 - Variáveis preditoras associadas ao aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.....	86
Tabela 28 - Resultados da regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	86
Tabela 29 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	86
Tabela 30 - Variáveis preditoras associadas ao aumento do ácido graxo docosaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.....	88
Tabela 31 - Resultados da regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo docosaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	88
Tabela 32 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo docosaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delineamento das análises estatísticas.....	49
Figura 2 – Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2013.....	60
Figura 3 - Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2014.....	62
Figura 4 – Alterações dos ácidos graxos nos eritrócitos de 110 crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes que participaram do estudo no ano de 2013.....	71
Figura 5 – Alterações dos ácidos graxos nos eritrócitos de 122 crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes que participaram do estudo no ano de 2014.....	72
Figura 6 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.....	81
Figura 7 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.....	81
Figura 8 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo dihomogama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.	85
Figura 9 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo dihomogama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.....	85
Figura 10 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.	87
Figura 11 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.	87
Figura 12 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo docosaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.	89
Figura 13 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo docosaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.	89

Figura 14 - Via metabólica dos ácidos graxos.....	93
Figura 15 - Mecanismos que explicam a relação da vitamina A com os ácidos graxos preditores do aumento do oleico.....	95
Figura 16 - Mecanismos que explicam a relação da vitamina A com a glicemia, os triglicerídeos e o ácido graxo oleico.	97
Figura 17 – Regulação da glicemia exercida pelo ácido graxo oleico.	98

LISTA DE SIGLAS

AAL	Alfa-linolênico
AG	Ácido graxo
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGNE	Ácido graxo não-esterificado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AGT	Ácido graxo <i>trans</i>
AL	Ácido linoleico
ALC	Ácido linoleico conjugado
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
AO	Ácido oleico
ARA	Araquidônico
ATP	Adenosina trifosfato
CEBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein-alpha</i>
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
CPT	Carnitina Palmitoil Transferase
CT	Colesterol Total
D5D	Delta 5 dessaturase
D6D	Delta 6 dessaturase
D9D	Delta 9 dessaturase
DAG	Diacilglicerol
DHA	Docosaexaenoico
DHGL	Dihomo-gama-linolênico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
ELO	Elongase
EPA	Eicosapentaenoico
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo

FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HETE	Hidroxieicosatetraenoico
HNF-4 α	<i>Hepatic nuclear fator-4 alpha</i>
HPETE	Hidroperóxido eicosatetraenoico
ICAM	<i>Intercellular cell-adhesion molecule</i>
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LASSO	<i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
LHS	Lipase Hormônio-sensível
LOX	Lipoxigenase
LPL	Lipoproteína lipase
LT	Leucotrieno
LXR	<i>Liver X receptor</i>
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NASH	<i>Nonalcoholic Steatohepatitis</i>
NF κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
PGC1 α	Coativador-1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC θ	<i>Protein kinase C theta</i>
PLA2	<i>Phospholipase A2</i>
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
QSFA	Questionário semiquantitativo de frequência alimentar
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RARE	<i>Retinoic acid response element</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RXR	<i>Retinol X receptor</i>

SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SCD1	<i>Stearyl CoA desaturase-1</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
TDP	<i>Thiamine diphosphate</i>
TPP	<i>Thiamine pyrophosphate</i>
USP	Universidade de São Paulo
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 ÁCIDOS GRAXOS	21
2.1.1 Ácidos graxos saturados.....	22
2.1.2 Ácidos graxos trans	23
2.1.3 Ácidos graxos insaturados	25
2.1.4 Ácidos graxos monoinsaturados.....	25
2.1.5 Ácidos graxos poli-insaturados.....	27
2.1.6 Dessaturases e Elongases	30
2.1.7 Ácidos graxos na transcrição gênica.....	31
2.2 MICRONUTRIENTES E SUAS INTERAÇÕES COM OS ÁCIDOS GRAXOS	32
2.2.1 Vitaminas lipossolúveis	33
2.2.2 Vitaminas hidrossolúveis	36
2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	40
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO	42
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	42
4.3 AMOSTRAGEM.....	43
4.4 AVALIAÇÃO DOS PARTICIPANTES	43
4.5 CONSUMO ALIMENTAR	44
4.6 COLETA E ANÁLISE DOS METABÓLITOS.....	44
4.7 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL	45
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADO	50
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO.....	50
5.2 PERFIL LIPÍDICO DAS POPULAÇÕES.....	53
5.3 CARACTERÍSTICAS DO CONSUMO ALIMENTAR	54
5.4 PERFIL DE VITAMINAS.....	56
5.5 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS	63
5.6 REPRODUTIBILIDADE DA RESPOSTA À SUPLEMENTAÇÃO	73
5.7 VARIÁVEIS PREDITORAS	76

5.7.1 Ácido graxo Oleico	76
5.7.2 Ácido graxo Dihomo-gama-linolênico	82
5.7.3 Ácido graxo Araquidônico	86
5.7.4 Ácido graxo Docosaexaenoico	88
6 DISCUSSÃO	90
6.1 ÁCIDO GRAXO OLEICO	90
6.2 ÁCIDO GRAXO DIHOMO-GAMA-LINOLÊNICO.	100
6.3 ÁCIDOS GRAXOS ARAQUIDÔNICO E DOCOSAEXAENOICO.....	101
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	102
8 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	122
ANEXO A - COMPOSIÇÃO DA BARRA DE LEITE (NESTROVIT - NESTLÉ®).....	122
ANEXO B – QUESTIONÁRIO SEMI-QUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR	123
ANEXO C – MÉTODOS PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA	128
APÊNDICES	130
APÊNDICE A – FUNÇÃO DE REGRESSÃO PARA A MÉDIA	130

1 INTRODUÇÃO

Se por um lado observamos o aumento da obesidade na população infanto-juvenil no Brasil e no mundo (AIELLO *et al.*, 2015), paradoxalmente observamos também o aumento de deficiências nutricionais, sobretudo de micronutrientes (YAKOOB e LO, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006) que podem levar a danos irreversíveis à saúde (RAUTIAINEN *et al.*, 2016) com prejuízos no desenvolvimento cognitivo (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007). Esse cenário reflete mudanças em padrões alimentares, caracterizados principalmente pelo aumento do consumo de alimentos de baixa densidade nutricional (ENGLE-STONE *et al.*, 2020; HESS e SLAVIN, 2014), o aumento do sedentarismo e a insegurança alimentar (ENGLE-STONE *et al.*, 2020). Na última Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) realizada entre os anos de 2017 e 2018 no Brasil, e publicado em 2020, foi demonstrado um aumento no consumo de alimentos ultraprocessados (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020a) e a inadequação da ingestão de micronutrientes tais como a vitamina A, vitaminas do complexo B, vitamina C, cálcio, magnésio e zinco, na população com faixa etária de 10 a 18 anos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020b). A inadequação de ingestão de micronutrientes, seja por falta ou por excesso, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas (SCOTT-BOYER *et al.*, 2016; AMES, 2006; FENECH, 2010).

As vitaminas e os minerais desempenham importantes funções no organismo humano, como cofatores de reações enzimáticas e como componentes de estruturas metabólicas. Embora os micronutrientes sejam frequentemente estudados individualmente, estudo de análise de rede demonstrou a interação de 49 cofatores com mais de 2000 proteínas em processos biológicos diversos que levam à manutenção da saúde ou à progressão de doenças (SCOTT-BOYER *et al.*, 2016).

Investigações científicas que buscam demonstrar associações de (in)adequação de um único nutriente com desfechos clínicos evidenciam resultados contraditórios (SHENKIN, 2006; MAYNE, FERRUCCI e CARTMEL, 2012; TABESH *et al.*, 2014; MOREIRA-LUCAS *et al.*, 2017). Os achados das ciências ômicas nos estudos da nutrição humana demonstram os variados efeitos regulatórios dos micronutrientes nos sistemas metabólicos lançando luz para novos paradigmas na Nutrição moderna (BLUMBERG, 2012; LEVATTE *et al.*, 2022).

O *Harmonized Micronutrient Project* foi um estudo de intervenção realizado entre os anos de 2013 e 2014, com uma coorte composta por crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade, residentes em Ribeirão Preto – SP. Análise genômica, proteômica e lipidômica foram

realizadas com o objetivo de melhor definir como indivíduos geneticamente distintos necessitam de diferentes intervenções para melhorar seu potencial de metilação e *status* nutricional (CLINICALTRIALS.GOV, 2014)

Neste estudo, 253 crianças e adolescentes receberam suplementação por meio de uma barra de leite enriquecida com 12 vitaminas e 5 minerais por 6 semanas, e houve melhora no perfil lipídico e redução nos níveis de glicemia. Esta resposta metabólica foi atribuída a algum ou à combinação de alguns micronutrientes suplementados (MATHIAS *et al.*, 2018).

Na avaliação lipidômica dessa mesma coorte, foi observado que as vitaminas alfa-tocoferol e retinol potencialmente contribuíram para a melhora do perfil lipídico da população. A análise proteômica integrada sugeriu forte evidência de associação das alterações em fosfolipases e piruvato desidrogenase quinase 1, mediadas pelos micronutrientes suplementados (CHAKRABARTI *et al.*, 2020).

A investigação das alterações do perfil de ácidos graxos (AGs) diante de intervenções nutricionais pode trazer contribuições importantes para a melhor elucidação das associações entre AGs e desfechos clínicos. Neste contexto, é importante considerar a complexa rede de interações entre os nutrientes e as características metabólicas, resultantes da expressão genotípica de cada organismo no qual estas interações estão inseridas.

Resultados da análise de alguns micronutrientes evidenciam associações com o metabolismo de AGs. Por exemplo, a vitamina A exerce controle na expressão de genes envolvidos na homeostase de AGs (TANOURY, PISKUNOV e ROCHETTE-EGLY, 2013) e a vitamina E protege os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), presentes nos fosfolipídios das membranas celulares e nas lipoproteínas plasmáticas, contra a peroxidação lipídica (VALK e HORNSTRA, 2000). As vitaminas do complexo B desempenham papéis importantes como cofatores em reações enzimáticas para produção de energia, oxidação de AGs e inibição da peroxidação lipídica (DEPEINT *et al.*, 2006). A vitamina D pode induzir a oxidação de AGs e influenciar o armazenamento de lipídios regulando expressões gênicas (CHANG e KIM, 2016).

Os ácidos graxos não esterificados (AGNEs) estão envolvidos na fisiopatologia da disfunção endotelial por meio de mecanismos que incluem, a via de sinalização da insulina, o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e ativação do sistema renina-angiotensina (GHOSH *et al.*, 2017). Compreender os mecanismos pelos quais os micronutrientes e os AGs interagem pode ajudar a direcionar as intervenções nutricionais para prevenir e tratar doenças.

Diante dos resultados encontrados no *Harmonized Micronutrient Project*, podemos fazer alguns questionamentos: a) de que maneira a suplementação com barra de leite

enriquecida com micronutrientes impacta no perfil de AGs? b) qual conjunto de micronutrientes estaria envolvido nestas alterações e melhor explicaria os efeitos observados?

O presente estudo buscou investigar os efeitos da suplementação com barra de leite enriquecida com 12 vitaminas e 5 minerais no perfil de AGs em população pediátrica e descrever variáveis que explicam o efeito observado. Além disso, o trabalho também avalia a reprodutibilidade dos resultados e discute as possíveis interações que explicam o perfil metabólico encontrado.

Na seção a seguir, uma breve revisão da literatura sobre os AGs e suas interações com os micronutrientes será apresentada, a fim de contextualizar alguns mecanismos do metabolismo desses compostos que serão abordados nas seções posteriores desta tese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÁCIDOS GRAXOS

Considerando o número de duplas ligações na cadeia carbônica, os AGs podem ser divididos em saturados (AGSs), que não possuem duplas ligações, monoinsaturados (AGMIs), que possuem uma dupla ligação, e AGPIs que possuem mais de uma dupla ligação (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). Os ácidos graxos insaturados (AGIs), por possuírem duplas ligações, são considerados quimicamente mais instáveis (MOREIRA, CURI e MANCINI-FILHO, 2002). As duplas ligações que ocorrem naturalmente nos AGIs são encontradas frequentemente na posição *cis*, ou seja, os átomos de hidrogênio das duplas ligações estão localizados no mesmo lado da cadeia carbônica (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Os AGs são estocados na forma de triglicerídeos no tecido adiposo e, em parte, também no tecido muscular. A liberação de triglicerídeos do tecido adiposo é catalisada pela lipase hormônio-sensível (LHS), que é estimulada por adrenalina, noradrenalina e glucagon, e é inibida por insulina. Após a ingestão alimentar, a insulina aumenta a deposição de AGs por meio do estímulo à lipoproteína lipase (LPL) e inibe a ação da LHS. Por outro lado, no exercício físico e na resposta ao estresse metabólico, a adrenalina e a noradrenalina aumentam a atividade da LHS e a liberação AGNEs. O estímulo à LHS também ocorre no jejum, sob a ação do glucagon (BURDGE e CALDER, 2015).

Os AGs chegam até as células como complexos lipoproteicos, como por exemplo, os quilomícrons e VLDLs (*very low-density lipoproteins*), ou como AGNEs. Os triglicerídeos dos quilomícrons e VLDLs são hidrolisados pela ação da LPL e os AGNEs adentram no meio intracelular através de transportadores. Lipoproteínas remanescentes são então captadas no fígado e hidrolisadas pelas lipases hepáticas. Uma vez no meio intracelular, os AGNEs são rapidamente convertidos a tioésteres de AGs acil-Coenzima A (CoA) pela ação da acil-CoA sintetase. As concentrações de AGNEs e AGs acil-CoA são baixas no meio intracelular, e a maior parte dos AGNEs e AGs acil-CoA estão ligados a proteínas. A conversão de AGNEs em AGs acil-CoA pela ação da enzima acil-CoA sintetase é uma etapa determinante na β -oxidação (mitocondrial e peroxissomal), alongação/dessaturação e síntese de triglicerídeos, ésteres de colesterol ou fosfolipídios (JUMP, 2002).

Os AGs liberados pela hidrólise dos triglicerídeos são primariamente utilizados para a produção de energia via β -oxidação nas mitocôndrias e peroxissomos. A concentração de

AGNEs no plasma é capaz de regular a β -oxidação. Os AGs de cadeia curta e média conseguem penetrar facilmente as mitocôndrias, enquanto os AGs de cadeia longa dependem do transporte da enzima carnitina palmitoil transferase (CPT). Em comparação com a β -oxidação mitocondrial, a β -oxidação peroxissomal tem maior especificidade de substrato, sendo mais ativa para AGs de cadeia longa. A reação determinante da β -oxidação peroxissomal é catalisada pela acil-CoA oxidase (BURDGE e CALDER, 2015).

A composição de AGs da bicamada lipídica impacta na fluidez das membranas celulares, influencia na atividade celular e na interação com proteínas e fornece substratos para a produção de mensageiros lipídicos nas vias de transdução de sinais (BURDGE e CALDER, 2015).

2.1.1 Ácidos graxos saturados

Embora não se tenha uma definição universal, os AGSs podem ser classificados em subgrupos de acordo com o tamanho da cadeia carbônica em (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010):

- a) AGSs de cadeia curta: possuem de 3 a 7 átomos de carbono;
- b) AGSs de cadeia média: possuem de 8 a 13 átomos de carbono;
- c) AGSs de cadeia longa: possuem de 14 a 20 átomos de carbono;
- d) AGSs de cadeia muito longa: possuem 21 ou mais átomos de carbono.

Na alimentação humana, os AGSs são encontrados principalmente nos alimentos de origem animal, como por exemplo nas carnes, no leite e nos produtos derivados do leite. Também são encontrados em óleos vegetais como no óleo de palma e de coco. Dentre os AGSs mais comuns na alimentação humana podemos citar os ácidos butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, docosanoico e tetracosanoico (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). O AG palmítico (C16:0) é o principal produto da *de novo* lipogênese (ASTRUP *et al.*, 2020).

Com relação às características físicas, os AGSs com ≥ 10 carbonos são sólidos em temperatura ambiente e quanto maior a cadeia carbônica, maior é o ponto de fusão. Os AGSs com 12 a 16 carbonos aumentam triglicerídeos no plasma, tais como HDL-c (*High-Density Lipoprotein Cholesterol*) e LDL-c (*Low-Density Lipoprotein Cholesterol*). A substituição de ácidos mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) por carboidratos resulta em pouca mudança na relação plasmática CT:HDL (Coolesterol total:HDL-c). O ácido graxo esteárico (C18:0) não tem efeito significativo sobre o CT, o LDL-colesterol ou a relação CT:HDL e seus efeitos não são

estatisticamente diferentes dos efeitos encontrados com o ácido oleico (C18:1n-9). Há evidências convincentes que a substituição de AGSs por óleos vegetais não hidrogenados ricos em AGs *cis*-insaturados resulta em uma redução na razão CT:HDL (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (FALUDI *et al.*, 2017) o tratamento não farmacológico para dislipidemias inclui a restrição do consumo de gorduras saturadas para < 10 ou 7% do valor energético total da dieta. Por outro lado, as evidências científicas mais recentes não sustentam a afirmativa de que a restrição do consumo de gorduras saturadas reduz o risco de doenças cardiovasculares (ASTRUP *et al.*, 2020). A redução do risco cardiovascular por meio da restrição do consumo de gorduras saturadas parece ter pouca sustentação científica, pelo fraco argumento de que essa relação pode ser inferida através da capacidade dos AGSs em aumentar o LDL-c (ASTRUP *et al.*, 2020).

O objeto de estudo na vasta maioria das pesquisas em nutrição humana é a gordura saturada que, por definição, é diferente de AGS. Enquanto a gordura saturada pode ser compreendida como uma mistura complexa de todos os principais AGSs em proporções diferentes, bem como de outros ácidos graxos e componentes químicos diversos; os AGSs por sua vez, possuem propriedades fisiológicas distintas (ASTRUP *et al.*, 2020).

Os AGSs com mais de 20 carbonos possuem uma associação inversa com risco cardiovascular (LIU *et al.*, 2020; MALIK *et al.*, 2015). Por outro lado, o AGS palmítico (C16:0) tem sido associado com o aumento do risco de desenvolvimento de síndrome metabólica (WARENSJÖ, RISÉRUS e VESSBY, 2005), diabetes (FOROUHI *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2003) e doença cardiovascular (WANG *et al.*, 2003). Os AGSs com 15 e 17 carbonos são biomarcadores do consumo de leite e derivados e têm sido associados com menor risco de doenças coronarianas e diabetes (CHOWDHURY *et al.*, 2014; IMAMURA *et al.*, 2018). O conjunto de componentes encontrados nos alimentos, como exemplo o leite, que possui uma complexa matriz de probióticos, vitaminas e minerais, levantam questionamentos sobre a atuação de um único nutriente na predição de risco de doenças (ASTRUP *et al.*, 2020).

2.1.2 Ácidos graxos *trans*

Os ácidos graxos *trans* (AGTs) são AGIs com pelo menos uma dupla ligação na configuração *trans*, o que resulta em uma estrutura física mais linear do que uma ligação dupla em uma configuração *cis*. Os AGTs podem ser divididos em dois grupos: AGTs artificiais

(produzidos pela indústria) e AGTs naturais (encontrados em animais ruminantes) (BROUWER, WANDERS e KATAN, 2013).

Os AGTs artificiais são formados por meio do processo de hidrogenação de óleos vegetais e de peixe. Este processo transforma óleos em gorduras semissólidas que são mais fáceis de processar. Os AGTs naturais, encontrados em animais ruminantes, são produzidos no rúmen de vacas e ovelhas e estão presentes no leite e nas carnes desses animais. Finalmente, o ácido linoleico conjugado (ALC) é um AGT natural, primeiramente descoberto no leite, e que posteriormente passou a ser produzido pela indústria na forma de suplemento (BROUWER, WANDERS e KATAN, 2013).

O AG vacênico (C18:1*trans*-11) é o principal AGT natural encontrado em animais ruminantes, enquanto o AG elaídico (C18:1*trans*-9) é o AGT artificial mais comum (BROUWER, WANDERS e KATAN, 2013). O ALC possui duas duplas ligações, sendo uma na posição *trans* e outra na configuração *cis*. A dupla ligação é conjugada, ou seja, na estrutura física do ALC a dupla ligação é separada por apenas um único átomo de carbono, ao invés de dois átomos, como é usual nos AGPIs. O ALC *cis*-9 *trans*-11 é encontrado em pequenas quantidades na gordura de animais ruminantes. Nos suplementos de ALC, manufaturados a partir de óleos vegetais, encontram-se ALC *cis*-9 *trans*-11 e ALC *trans*-10 *cis*-12 (MA *et al.*, 1999; YANG e LIU, 2004; BROUWER, WANDERS e KATAN, 2013).

Os AGTs aumentam o LDL-c e a substituição de 1% do valor energético no consumo de AGTs por carboidratos, ácido graxo oleico (AO) ou ácido graxo linoleico (AL) leva à uma redução na razão CT:HDL-c (MOZAFFARIAN e CLARK, 2009; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Estudos observacionais de incidência de risco cardiovascular e estudos de intervenção clínica sobre o metabolismo das lipoproteínas demonstram que os AGTs artificiais possuem efeitos deletérios à saúde humana, levando ao risco aumentado de doenças cardiovasculares (BROUWER, WANDERS e KATAN, 2010; MOZAFFARIAN *et al.*, 2006; BROUWER, WANDERS e KATAN, 2013). Os AGTs artificiais também têm sido associados à repercussão patológica no fígado e no sistema nervoso central (LONGHI, 2019). Estes resultados levaram vários países a fazerem recomendações de limite de consumo de AGTs artificiais. Neste contexto, não há recomendações para a limitação do consumo de AGTs naturais, dada a falta de evidências científicas que associem os AGTs naturais ao risco de doenças, embora os AGTs naturais também suscitem aumento de lipoproteínas, como o LDL-c (BROUWER, WANDERS e KATAN, 2013).

Alguns estudos associam efeitos benéficos dos AGTs naturais e ALC na saúde humana (IMAMURA *et al.*, 2018; POPPITT, 2020). No que diz respeito ao ALC, há evidências de repercussão na redução de LDL-c. Contudo, os estudos foram feitos em modelos animais e foram observados efeitos indesejáveis, como o aumento da resistência à insulina e lipodistrofia após suplementação de ALC (DERAKHSHANDE-RISHEHRI *et al.*, 2015), de maneira que não há dados quanto à dose segura de ingestão em humanos.

Algumas limitações podem ser apontadas à despeito dos estudos sobre associação de AGTs naturais e desfechos clínicos: a) os AGTs naturais representam uma parcela muito pequena dos AGs encontrados nos alimentos, de maneira que há uma limitada compreensão de sua repercussão metabólica no organismo humano; b) leite e seus derivados são os principais alimentos-fonte de AGTs naturais, que também possuem outros compostos como probióticos, cálcio, vitamina D e proteínas (POPPITT, 2020), capazes de exercer efeitos no metabolismo lipídico.

2.1.3 Ácidos graxos insaturados

Os AGIs diferenciam-se fisicamente quanto ao tamanho da cadeia carbônica e, embora não se tenha consenso, podemos classificá-los em (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010):

- a) AGIs de cadeia curta: possuem 19 átomos de carbono ou menos;
- b) AGIs de cadeia longa: possuem entre 20 e 24 átomos de carbono;
- c) AGIs de cadeia muito longa: possuem 25 ou mais átomos de carbono.

2.1.4 Ácidos graxos monoinsaturados

Os AGMIs mais comumente encontrados na alimentação humana são os AGs oleico (AO), palmitoleico, vacênico, gadoleico, erúcico e nervônico (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

O AO (C18:1n-9) é o principal AGMI presente na dieta e nos triglicerídeos plasmáticos (REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020). Com uma dupla ligação localizada entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, o AO é designado como AGMI ômega-9. Este AG pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo os seres humanos (MOREIRA, CURI e MANCINI-FILHO, 2002).

Dietas ricas em AGMIs promovem redução na glicemia plasmática e na pressão arterial sistólica (QIAN *et al.*, 2016). Especificamente, o AO exerce um papel importante na proteção contra doenças hepáticas (XU *et al.*, 2020); na prevenção e tratamento da resistência à insulina e do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020; COLL *et al.*, 2008) na prevenção de aterogênese, doenças cardiovasculares (BOWEN *et al.*, 2019) e hipertensão arterial (MASSARO *et al.*, 2020); e na modulação da resposta inflamatória (COLL *et al.*, 2008). Considerando o efeito no perfil lipídico, o AO possui um efeito neutro no LDL-c (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Foram descritos diversos mecanismos pelos quais o AO atua na melhora da sensibilidade à insulina. Um desses mecanismos estaria relacionado à influência do AO na produção de diacilglicerol (DAG). O AO possui o efeito de diminuir os níveis de DAG, por meio da síntese de triglicerídeos, atuando na melhora da sinalização da via metabólica da insulina (REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020). A oxidação incompleta de AGs devido à disfunção mitocondrial é considerada um marcador importante de resistência à insulina e DM2 (PINTI *et al.*, 2019), e a disfunção mitocondrial está interligada com a agregação intracelular de DAG, que bloqueia a sinalização da via metabólica da insulina (SERGI *et al.*, 2019).

O AO possui um efeito protetor na indução da resposta inflamatória promovida pelos AGSs. O AGS palmítico (C16:0) eleva os níveis de DAG e ativa a resposta inflamatória via proteína quinase C *theta* – fator nuclear *kappa* B (PKC θ – NF κ B), resultando em aumento da interleucina-6 (IL-6). O AO é capaz de reverter esse mecanismo através da diminuição dos níveis de DAG (COLL *et al.*, 2008; PALOMER *et al.*, 2018).

O AG palmitoleico (C16:1n-7), um dos principais AGMIs, é um importante produto da lipogênese endógena (FUKUCHI *et al.*, 2004). Por ser encontrado em baixas quantidades nos alimentos e pelo aumento expressivo de suas concentrações no organismo humano após ingestão de carboidratos, o palmitoleico é considerado um biomarcador da lipogênese (ASTRUP *et al.*, 2020).

A administração de sacarose na indução de obesidade em ratos aumenta as concentrações de palmitoleico e de AO no plasma e no fígado (FUKUCHI *et al.*, 2004), o que demonstra a relação de carboidratos com a lipogênese. Em estudo de Okada *et al.* (2005) foi observada uma associação estatisticamente significativa entre obesidade em crianças e concentrações plasmáticas de palmitoleico. A associação do palmitoleico com adiposidade também foi descrita em estudo de Kunesová *et al.* (2002), com gêmeos monozigóticos, onde os autores discutem a possibilidade de estreita regulação metabólica do palmitoleico por fatores genéticos.

O AG nervônico (C24:1n-9) pode ser sintetizado a partir da elongação do AO e encontrado em óleos vegetais, como no óleo extraído da semente de moringa (*Malania oleifera*) (LI *et al.*, 2019). Trata-se de um AGMI ômega-9 importante na mielinização do sistema nervoso, e tem sido associado com redução de marcadores inflamatórios (LEWKOWICZ *et al.*, 2019).

2.1.5 Ácidos graxos poli-insaturados

As famílias de AGPIs mais importantes, em termos de saúde e nutrição humana, são àqueles onde a primeira dupla ligação encontra-se nas posições n-3 e n-6 da cadeia carbônica. Os AGs membros da família n-3 são os AGs alfa-linolênico (AAL), estearidônico, EPA e DHA; e os AGs membros da família n-6 são os AGs AL, gama-linolênico, dihomogama-linolênico (DHGL), ARA, docosatetraenoico e docosapentaenoico (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

AL e AAL são considerados AGs essenciais pois não podem ser sintetizados no organismo humano (BURDGE e CALDER, 2015) e podem ser dessaturados e alongados para formar outros AGPIs de suas respectivas séries n-6 (ômega-6) e n-3 (ômega-3). Os óleos vegetais são responsáveis pela maior parte do suprimento de AGs essenciais na alimentação humana. A ocorrência de AAL presente numa dieta convencional é proporcionalmente menor quando comparada à ocorrência de AL (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

O ARA é um dos AGPIs mais abundantes presentes no organismo humano, encontrado tipicamente na forma esterificada nas membranas fosfolipídicas (MARTIN, BRASH e MURPHY, 2016) e é considerado um importante AG da série n-6 precursor de eicosanoides. O ARA pode ser encontrado em pequenas quantidades nas carnes, ovos, peixes e algas marinhas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Eicosanoides são um grupo de mediadores lipídicos que são derivados oxigenados dos AGPIs DHGL, ARA e EPA. Incluídos neste grupo estão as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, coletivamente denominados como prostanoides; e os leucotrienos (LTs), lipoxinas, ácidos hidroperóxido eicosatetraenoico (HPETEs) e hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) (BURDGE e CALDER, 2015; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). O ARA é o maior precursor de eicosanoides, os quais desempenham importantes funções biológicas na sinalização da resposta inflamatória. A liberação de ARA da membrana fosfolipídica é catalisada pela enzima fosfolipase A2

(BURDGE e CALDER, 2015). A via metabólica na síntese dos eicosanoides se inicia com a ação da enzima ciclooxigenase (COX), que produz os prostanoïdes, ou com a lipoxigenase (LOX) na formação de LTs, HPETEs, HETEs e lipoxinas (BURDGE e CALDER, 2015; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). Há dois tipos de COX, a COX-1, a qual é mais constitutiva, e que desempenha o papel fisiológico dos eicosanoides, e a COX-2, a qual é induzida por processos de ativação como, por exemplo, pela inflamação (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). A quantidade e a natureza dos eicosanoides são determinados, dentre outros fatores, pela disponibilidade de ARA, EPA e DHGL no organismo. O DHGL e o EPA competem com o ARA na formação de eicosanoides (BURDGE e CALDER, 2015). DHGL origina prostanoïdes da série-1 e LTs da série-3, ARA origina prostanoïdes da série-2 e LTs da série-4 e EPA dá origem a prostanoïdes da série-3 e LTs da série-5 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). EPA e DHA originam docosanoïdes denominados resolvinas e protectinas que são importantes mediadores na resposta inflamatória, exercendo ação anti-inflamatória (BURDGE e CALDER, 2015). Os eicosanoides derivados do ARA e do EPA, e os docosanoïdes derivados do DHA, estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos que incluem, a modulação da resposta inflamatória, agregação plaquetária, resposta imune, crescimento e proliferação celular e contratilidade e dilatação do tecido muscular liso (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Embora o principal mecanismo anti-inflamatório do EPA e do DHA seja mediado pelo antagonismo metabólico ao ARA, estes AGPIs ômega-3 possuem outros mecanismos anti-inflamatórios. Estudos com culturas de células têm demonstrado que os AGPIs ômega-3 diminuem a expressão endotelial de uma variedade de moléculas de adesão leucocitária induzidas por citocinas pró-inflamatórias. O DHA exerce ação na redução da expressão endotelial de E-selectina, da molécula de adesão intercelular- 1 (ICAM-1 - *intercellular cell-adhesion molecule 1*) e da molécula de adesão vascular 1 (VCAM- 1 - *vascular cell adhesion molecule 1*) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Devido à ação pró-inflamatória de vários eicosanoides derivados do ARA e da capacidade dos AGPIs ômega-3 em reduzir a produção destes eicosanoides, o efeito terapêutico de AGPIs ômega-3 têm sido foco de atenção em diversos estudos clínicos. Evidências científicas de benefício terapêutico com administração de AGPIs ômega-3 foram encontradas para o tratamento de asma em crianças, doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide.

Através dos resultados observados de estudos controlados e randomizados, a dose necessária para exercer efeito terapêutico em algumas doenças crônicas parece ser de 3g/dia (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Os AGPIs ômega-3 e ômega-6 inibem a enzima ácido graxo sintase (FAS— *fatty acid synthase*) no tecido adiposo, atuando, portanto, na inibição da lipogênese. Além disso, esses AGs também atuam na transcrição do gene leptina, conhecido por atuar na regulação do apetite, no peso corporal e no tecido adiposo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Um consumo excessivo de AGPIs ômega-6 (abundante na dieta ocidental) pode aumentar a inflamação e contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas como a síndrome metabólica, o DM2 e a obesidade (GARAULET *et al.*, 2001). As dietas ricas em AGPIs ômega-6 também estão associadas ao aumento da resistência à leptina (NUERNBERG *et al.*, 2011; PHILLIPS *et al.*, 2010). O ARA atenua o efeito da leptina no metabolismo hepático de glicose e dos lipídios, revertendo a expressão de RNAm de genes envolvidos na gliconeogênese, transporte de glicose, lipogênese e síntese de colesterol (CHENG *et al.*, 2015).

Em neonatos, o ARA, juntamente com o DHA, é de vital importância no desenvolvimento cerebral. Não obstante, as concentrações de ARA no leite humano são tipicamente maiores do que as concentrações de DHA, e sofrem menor influência da dieta materna, evidenciando a grande importância desse AG no desenvolvimento humano (CARLSON e COLOMBO, 2016).

Considerando o efeito no perfil lipídico, os AGPIs, em especial o AL, diminuem levemente o LDL-c. Quando consumido na proporção acima de 12% do valor energético total, o AL reduz o HDL-c (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). A suplementação com ômega-3, na dose de 3g/dia, diminui em média 27% de triglicerídeos no plasma, mas possui efeitos variados quanto ao LDL-c e o HDL-c, de maneira que, em média, há um aumento nas concentrações de 6% no LDL-c e de 1,4% no HDL-c (BALK *et al.*, 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

A suplementação com doses acima de 3g/dia de ômega-3 reduz marcadores inflamatórios (LI *et al.*, 2014; BLOK *et al.*, 1997; THEOBALD *et al.*, 2007; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010) e doses ≥ 450 mg de DHA + EPA demonstram benefícios no desenvolvimento cognitivo de crianças e adolescentes (VAN DER WURFF, MEYER e DE GROOT, 2020).

2.1.6 Dessaturases e Elongases

A *de novo* lipogênese reflete a capacidade adaptativa do organismo em resposta à uma maior oferta de carboidratos, de maneira que os carboidratos em excesso são convertidos em triglicérides e AGs (CHONG *et al.*, 2008; SCHUTZ, 2004). A *de novo* lipogênese envolve a utilização endógena de acetil-CoA na síntese de AGS que, por sua vez, por meio de processos de alongamento e dessaturação, são convertidos em outros AGs como, palmitoleico (C16:1n-7), AO ou vacênico (C18:1n-7) (PATON e NTAMBI, 2009).

Em mamíferos, a reação de dessaturação dos AGs ocorre primariamente no retículo endoplasmático. Essa reação é catalisada pelas enzimas dessaturases. Os principais AGS substratos para a reação de dessaturação são os AGs palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). Nessa reação há uma inserção de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 dos AGs palmitoleico e AO, respectivamente. Esta reação é catalisada pela Δ^9 -dessaturase (D9D), também conhecida como estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD1 – *stearoyl CoA desaturase-1*) (BURDGE e CALDER, 2015).

Os AGs essenciais AAL e AL são convertidos em outros AGs de suas respectivas séries pela mesma via metabólica, por meio da ação da Δ^6 -dessaturase (D6D). A cadeia carbônica é aumentada de 18 para 20 átomos de carbono pela ação da elongase-5 (ELO-5) e, posteriormente, uma nova dupla ligação é inserida pela ação da Δ^5 -dessaturase (D5D), formando os ácidos graxos EPA e ARA das séries n-3 e n-6, respectivamente. Elongases aumentam a cadeia carbônica formando AGs com 24 carbonos e, posteriormente, uma nova dupla ligação é inserida pela D6D formando os AGs tetracosaeanoico (C24:6n-3) e tetracosapentaenoico (C24:5n-6) das séries n-3 e n-6, respectivamente. Estes AGs são transportados do retículo endoplasmático para os peroxissomos onde ocorre a β -oxidação com a remoção de dois átomos de carbono formando os AGs DHA (C22:6n-3) e docosapentaenoico (C22:5n-6) das séries n-3 e n-6, respectivamente. Nos seres humanos as vias metabólicas de alongação e dessaturação ocorrem majoritariamente no fígado (BURDGE e CALDER, 2015).

Nas reações de alongação, ou seja, de aumento da cadeia carbônica dos AGs, as elongases iniciam a reação com a condensação de malonil-CoA com um AG acil-CoA. Esta etapa é seguida por reações de redução e desidratação para formar uma cadeia hidrocarbonada saturada (LEONARD *et al.*, 2004; BURDGE e CALDER, 2015). Até o momento foram descritas sete elongases que diferem entre si pela seletividade por AGs com diferentes comprimentos da cadeia carbônica e graus de insaturação. As ELOs 1, 3, 6 e 7 catalisam

preferencialmente a extensão de AGSs e AGMIs, enquanto as outras ELOs, 2, 4 e 5, atuam preferencialmente nos AGPIs (BURDGE e CALDER, 2015).

Alguns fatores ambientais podem afetar a atividade das dessaturases D5D e D6D e, por sua vez, a conversão de AL e AAL em seus derivados de cadeia longa. A ingestão alimentar de colesterol e dietas hiperlipídicas diminuem a atividade das dessaturases; a atividade da D5D parece ser menor em indivíduos diabéticos; baixos níveis de insulina e deficiência de proteínas e minerais como ferro, zinco, cobre e magnésio diminuem a atividade da D6D (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

2.1.7 Ácidos graxos na transcrição gênica

Embora tenha-se bem estabelecida a função dos derivados dos AGs, como por exemplo os eicosanoides, na sinalização metabólica, há evidências que os próprios AGs também exerçam esta função, em parte por meio de regulação da transcrição gênica (GEORGIADI e KERSTEN, 2012).

AGSs e AGMIs impactam na expressão de genes no fígado quando consumidos em altas quantidades, por exemplo cerca de 40% de calorias (JUMP, 2002). AGNEs intracelulares regulam a atividade dos fatores de transcrição gênica: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR - *peroxisome proliferators activated*) e receptor hepático X (LXR - *liver X receptor*) (JUMP, 2002; DESVERGNE e WAHLI, 1999; OU *et al.*, 2001; XU *et al.*, 1999); enquanto tioésteres de AGs acil-CoA regulam atividade do fator nuclear hepático 4 α (HNF-4 α - *hepatic nuclear factor – 4 alpha*) (HERTZ *et al.*, 1998).

O AO possui a capacidade de regular a expressão de genes que aumentam a oxidação de AGs na mitocôndria via desacetilação do coativador-1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1 α), um regulador nodal da biogênese mitocondrial, através da ativação de proteína quinase dependente de adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPc), também conhecida como proteína quinase A (PKA - *protein kinase A*), no músculo esquelético (LIM *et al.*, 2013; REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020).

Um importante papel biológico dos AGPIs n-3 e n-6 é a regulação de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. Os AGPIs são capazes de ativar a expressão de genes envolvidos no transporte e oxidação de AGs e diminuir a expressão de genes que regulam a síntese *de novo* de AGs (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010). Esse efeito na expressão gênica exercido pelos AGPIs é regulado por fatores de transcrição. Os AGPIs ativam PPAR α , aumentando a oxidação de AGs, e inibem a proteína

de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c - *sterol regulatory element binding protein 1c*), diminuindo a síntese de AGs (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010; DESVERGNE, MICHALIK e WAHLI, 2006). EPA é um potente ativador de PPAR α e o DHA exerce maior controle no SREBP-1c (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010).

Embora o SREBP-1c preferencialmente ative a expressão de genes envolvidos na *de novo* lipogênese, o SREBP-2 possui preferência por genes envolvidos na síntese e captação de colesterol no fígado. Juntos, o SREBP-1c e o SREBP-2 ativam a expressão de mais de 30 genes envolvidos na síntese e captação de colesterol, AGs, triglicerídeos e fosfolipídios (GEORGIADI e KERSTEN, 2012).

De todos os receptores nucleares regulados por AGs, os da família PPARs são os mais extensamente caracterizados na literatura (JUMP, 2002; GEORGIADI e KERSTEN, 2012). Os PPARs são membros da extensa família de receptores nucleares que também incluem receptores das vitaminas lipossolúveis A e D, bem como de hormônios esteroides (GEORGIADI e KERSTEN, 2012). De forma similar a outros receptores nucleares, PPARs formam heterodímeros com o receptor do retinoide X (RXR - *retinol X receptor*) (JUMP, 2002; GEORGIADI e KERSTEN, 2012), que é ativado por um metabólito da vitamina A, o 9-*cis* ácido retinoico (GEORGIADI e KERSTEN, 2012). Os AGIs, como o DHA, ARA, AAL, AL e AO, são ativadores de RXR, pois são capazes de ligarem-se diretamente ao RXR, embora com menor afinidade quanto comparado ao 9-*cis* ácido retinoico (GEORGIADI e KERSTEN, 2012).

Os PPARs demonstram uma preferência geral para ligarem-se aos AGPIs (GEORGIADI e KERSTEN, 2012) e a afinidade de ligação pode estar associada à quantidade de AGNEs no meio intracelular (JUMP, 2002). Há três subtipos de PPARs (PPAR α , PPAR δ , PPAR γ) que são tecido-específicos. Enquanto o PPAR γ é predominante no tecido adiposo (GEORGIADI e KERSTEN, 2012), o PPAR α é o subtipo predominante no parênquima hepático e exerce a função de regular a expressão de genes envolvidos no transporte de AGs, na oxidação lipídica e na atividade das dessaturases (JUMP, 2002). A ativação do PPAR γ pelos AGs pode ter como objetivo a proteção contra a lipotoxicidade, uma vez que essa ativação estimula a capacidade de armazenamento lipídico na forma de triglicerídeos (GEORGIADI e KERSTEN, 2012).

2.2 MICRONUTRIENTES E SUAS INTERAÇÕES COM OS ÁCIDOS GRAXOS

2.2.1 Vitaminas lipossolúveis

Retinoides são todos os compostos relacionados à vitamina A, bem como seus metabólitos e precursores (FREY e VOGEL, 2011). Os principais retinoides são o retinil palmitato, o todo-trans retinol (*all-trans retinol*) e o retinal (THEODOSIOU, LAUDET e SCHUBERT, 2010). A vitamina A também pode se apresentar na forma de ácido retinoico, o qual pode ser encontrado em três formas isoméricas distintas: todo-trans ácido retinoico, 9-*cis* ácido retinoico e 13-*cis* ácido retinoico (THEODOSIOU, LAUDET e SCHUBERT, 2010) (FREY e VOGEL, 2011).

O ácido retinoico é considerado a forma biologicamente ativa mais importante da vitamina A, mais especificamente os isômeros todo-trans e 9-*cis* (KAM *et al.*, 2012). Entre suas principais funções estão a diferenciação e o crescimento celular, o controle do ciclo celular e a modulação da apoptose (ZIOUZENKOVA e PLUTZKY, 2008; THEODOSIOU, LAUDET e SCHUBERT, 2010).

Ativado por retinoides, receptores do ácido retinoico (RARs – *retinoic acid receptors*) e RXRs exercem importantes funções em uma variedade de processos biológicos que inclui a síntese e o metabolismo dos AGs (LI, CAI e BOYER, 2021). A interação entre ligante (todo-trans ácido retinoico) e RAR induz uma alteração conformacional no próprio receptor, promovendo a formação de um heterodímero entre RAR e RXR (AL TANOURY, PISKUNOV e ROCHETTE-EGLY, 2013). Esta conformação estrutural dos receptores é capaz de promover ou inibir a expressão gênica através de ligação a sequências conhecidas como elementos responsivos ao ácido retinoico (RARE – *retinoic acid response element*), encontradas na região promotora dos genes alvos (KAM *et al.*, 2012).

A ativação de RXR aumenta a expressão de SCD1 e de ELO-6 no fígado. A SCD1 atua na síntese dos AGMIs AO e palmitoleico; e a ELO-6 atua na elongação do palmítico à esteárico, do palmitoleico à vacênico e do AO à eicosenoico (WEISS *et al.*, 2011).

A vitamina A e a insulina induzem a expressão de SREBP-1c e, dessa forma, regulam a expressão de genes lipogênicos, aumentando a síntese de lipídios. O SREBP-1c regula a função das células β -pancreáticas aumentando a expressão de genes envolvidos na sinalização glicose-insulina (ZHAO *et al.*, 2012). Além disso, no músculo esquelético o todo-trans ácido retinoico aumenta a oxidação de AGs (AMENGUAL *et al.*, 2008).

A deficiência de vitamina A reduziu a quantidade de células β -pancreáticas e contribuiu para a intolerância à glicose em estudos em ratos (MATTHEWS *et al.*, 2004). Uma dieta rica em vitamina A resultou em aumento da sensibilidade à insulina e redução dos níveis de glicemia

e da adiposidade visceral em experimento com ratos obesos (JEYAKUMAR *et al.*, 2011). Contudo, o aumento exacerbado de SREBP-1c parece reduzir a função das células β -pancreáticas (DIRAISON *et al.*, 2004), o que se relaciona com a lipotoxicidade na contribuição da patogênese do diabetes *mellitus* (ZHAO *et al.*, 2012). Esses resultados evidenciam os riscos de repercussões metabólicas indesejadas decorrentes tanto de depleção quanto de excesso de vitamina A.

A vitamina E corresponde a todos os tocoferóis e trocotrienóis, e a forma biologicamente mais ativa é o α -tocoferol (WEBER, BENDICH e MACHLIN, 1997). A ação antioxidante da vitamina E e seu papel na proteção dos AGPIs contra a peroxidação lipídica estão bem descritos na literatura (VALK e HORNSTRA, 2000; ZINGG e MEYDANI, 2019). Vitamina E AGPIs compartilham vias semelhantes e/ou sobrepostas de absorção, distribuição, metabolismo e ação molecular como componentes estruturais de membrana e mediadores lipídicos (ZINGG e MEYDANI, 2019).

A atividade antioxidante da vitamina E é atribuída ao grupo hidroxila do anel aromático tococromanol que é capaz de doar hidrogênio para neutralizar os radicais livres e espécies reativas do oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) (NAGASHIMADA e OTA, 2019). Dessa forma, a necessidade de ingestão de vitamina E está intimamente relacionada à ingestão de AGPIs, de maneira que as necessidades de ingestão de vitamina E aumentam proporcionalmente ao aumento da ingestão de AGPIs (VALK e HORNSTRA, 2000).

A vitamina E influencia a produção de mediadores lipídicos derivados de AGPIs por meio da capacidade de ligação direta a enzimas envolvidas na biossíntese de AGPIs, como a fosfolipase A2 (PLA2 - *phospholipase A2*); as 5-, 12-, e 15-LOX, e a COX-2. Assim, a vitamina E pode inibir a atividade dessas enzimas por meio de competição pelo sítio de ligação e afetar a ação de mediadores lipídicos derivados de AGPIs (ZINGG e MEYDANI, 2019; AZZI *et al.*, 2004; RIMBACH *et al.*, 2002; NAGASHIMADA e OTA, 2019). O alfa-tocoferol também inibe a liberação de citocinas pro-inflamatórias e exerce regulação na expressão de genes envolvidos na homeostase do colesterol, na resposta inflamatória e na captação de lipídios (ZINGG e MEYDANI, 2019).

Baixos níveis de vitamina C e alfa-tocoferol foram encontrados no sangue de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (PALMIERI *et al.*, 2006). Como o estresse oxidativo é um dos fatores desencadeantes da peroxidação lipídica e danos hepatocelulares na DHGNA, antioxidantes como a vitamina E podem ter efeitos benéficos contra a doença (ALBERTI, GANA e SANTOS, 2020).

Na esteatose hepática não-alcoólica (NASH - *nonalcoholic steatohepatitis*) a vitamina E pode reduzir a inflamação, melhorar a fibrose hepática e atenuar a hiperinsulinemia (NAGASHIMADA e OTA, 2019). Estudos que investigaram o efeito da suplementação de vitamina E, de forma isolada ou com outros antioxidantes na resposta metabólica de crianças e adolescentes com doenças hepáticas, evidenciaram nenhuma resposta ou uma melhora modesta nos biomarcadores de estresse oxidativo e de função hepática (ALBERTI, GANA e SANTOS, 2020). Estudo de revisão sistemática e metanálise, que incluiu ensaios clínicos com adultos e crianças, concluiu que a suplementação de vitamina E melhora os parâmetros bioquímicos e histológicos em pacientes adultos com DHGNA, porém sem eficácia significativa em pacientes pediátricos (AMANULLAH *et al.*, 2019).

Polimorfismos em genes que envolvem a absorção e o transporte de vitamina E influenciam a biodisponibilidade e a bioatividade desta vitamina no organismo. Essas alterações genéticas podem explicar a dificuldade de se encontrar evidências científicas conclusivas a respeito dos benefícios da suplementação de vitamina E em algumas patologias. Alguns dos genes afetados são os mesmos genes que atuam no metabolismo lipídico. Essas alterações genéticas podem ser traduzidas em aumento de risco para aterosclerose, doenças degenerativas, inflamação e síndrome metabólica (ZINGG e MEYDANI, 2019).

Vitamina E e AGPIs essenciais não podem ser sintetizados no cérebro, e doenças graves associadas com baixos níveis plasmáticos de vitamina E e AGPIs associam-se principalmente a alterações na função cerebral (LEBOLD e TRABER, 2014; LEBOLD *et al.*, 2013), sugerindo o importante papel da vitamina E no transporte através da barreira hematoencefálica e proteção dos AGPIs no cérebro (ZINGG e MEYDANI, 2019).

Em um estudo de metabolômica a suplementação com alfa-tocoferol por quatro semanas resultou em aumento dos níveis de lisofosfatidilcolinas, como possível resultado da ativação da PLA2 (WONG e LODGE, 2012), e algumas dessas lisofosfatidilcolinas atuam na via de transdução de sinais na expressão de genes e no transporte de AGs na barreira hematoencefálica (ZINGG e MEYDANI, 2019).

Além de exercer um papel importante na homeostase do cálcio e do fósforo, a vitamina D está envolvida na proliferação e maturação celular em diferentes tecidos humanos (RYAN, ANDERSON e MORRIS, 2015).

A maior prevalência de deficiência de vitamina D em indivíduos obesos e a correlação inversa entre o índice de massa corporal (IMC) e níveis de vitamina D, sustentam as evidências de que essa vitamina exerce um papel importante na modulação da distribuição do tecido adiposo e na atividade dos compostos lipídicos (GIUSTINA *et al.*, 2020).

Para explicar a deficiência de uma vitamina lipossolúvel em pessoas com excesso de tecido adiposo, foram sugeridos alguns possíveis mecanismos, tais como, a alteração na síntese cutânea, menor capacidade de absorção intestinal, alterações metabólicas e sequestro no tecido adiposo (MEHMOOD e PAPANDREOU, 2016).

A suplementação de altas doses de vitamina D em crianças obesas resultou em aumento nas concentrações de insulina (KELISHADI *et al.*, 2014). Resultados animadores como esse suscitam maiores investigações do papel promissor da vitamina D no tratamento da resistência à insulina. Vários estudos associam a deficiência de vitamina D ao DM2, doenças cardiovasculares e obesidade. Contudo, não há evidências científicas de benefícios da suplementação de vitamina D na prevenção dessas doenças (BOUILLON *et al.*, 2022; GIUSTINA *et al.*, 2020).

A deficiência de vitamina D foi associada à maiores níveis de ARA, redução da atividade da SCD1 e aumento da atividade da D5D em modelos animais. Estes resultados demonstram que a vitamina D é capaz de orquestrar a atividade das dessaturases e de outras enzimas, influenciando a composição de AGs nos tecidos (NANDI, WADHWANI e JOSHI, 2019).

Em estudo experimental com células 3T3-L1, a administração de vitamina D levou à uma redução da expressão dos genes lipogênicos SCD1, CEBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein-alpha*), FAS, PPAR γ e ao aumento dos genes que estão envolvidos na β -oxidação CPT1 α , PGC1 α , PPAR α e UCP1 (termogenina ou *Uncoupling Protein 1*). Além disso, a vitamina D aumentou a expressão genética e a atividade de sirtuína 1 (SIRT1), e aumentou as concentrações de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e da relação NAD:NADH. Os autores especulam que os mecanismos de regulação gênica observados estão relacionados à via NAD-sirtuína, por meio da atuação dos receptores de vitamina D (VDR – *vitamin D receptor*) (CHANG e KIM, 2016).

O VDR é um fator nuclear que se liga à forma ativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D (1,25D) e exerce uma série de atividades biológicas através da regulação de vias de transcrição gênica e de sinalização intracelular (RYAN, ANDERSON e MORRIS, 2015).

2.2.2 Vitaminas hidrossolúveis

As vitaminas do complexo B são vitaminas hidrossolúveis importantes como cofatores em reações enzimáticas na função celular e produção de energia (DEPEINT *et al.*, 2006).

As formas ativas da vitamina B1 são tiamina pirofosfato (TPP - *thiamine pyrophosphate*) (DEPEINT *et al.*, 2006) e a tiamina difosfato (TDP – *thiamine diphosphate*) (BELTRAMO, MAZZEO e PORTA, 2021).

TPP é cofator nas reações de desidrogenase em complexos enzimáticos mitocondriais que catalisam a descarboxilação oxidativa de α -cetoácidos para liberar dióxido de carbono (CO₂). No processo, NAD⁺ (forma oxidada de NAD) é convertido em NADH (forma reduzida de NAD), que pode ser reoxidado para NAD⁺ pelo transporte mitocondrial de elétrons para gerar três moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para cada NADH formado. A TPP também é cofator em reações enzimáticas citosólicas desempenhando um papel importante na função celular na produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (DEPEINT *et al.*, 2006). A TDP participa como cofator em diversas reações enzimáticas do metabolismo da glicose (DEPEINT *et al.*, 2006).

A absorção da tiamina aumenta no estado de hipovitaminose e diminui pela ação do hormônio tireoidiano, no diabetes, no consumo de etanol e com o avançar da idade. A combinação de deficiência marginal de vitamina B1 com condições de estresse oxidativo ou à administração de glicose leva a alterações neurodegenerativas semelhantes às observadas na doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e na síndrome de Wernicke-Korsakoff (ZIMITAT e NIXON, 1999).

A vitamina B1 exerce ação antioxidante, sendo capaz de prevenir a peroxidação lipídica e a oxidação do AO (DEPEINT *et al.*, 2006), além de estar relacionada à melhora na glicemia de pacientes diabéticos atuando de forma sinérgica com a insulina (BELTRAMO, MAZZEO e PORTA, 2021). Enquanto Valério *et al.* (1999) não encontraram diferença na hemoglobina glicosilada em crianças com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) suplementadas com tiamina, em estudo de Arora, *et al.* (2006) foi observada uma melhora da função endotelial e a redução da progressão de aterosclerose em pacientes com DM2 com infusão endovenosa de tiamina. Além disso, González-Ortiz *et al.* (2011) também demonstraram redução da glicemia e da leptina em pacientes com DM2 suplementados com tiamina. Esses resultados demonstram benefícios do uso terapêutico da vitamina B1 no tratamento de pacientes diabéticos sem insuficiência de células β -pancreáticas.

O uso de tiamina no tratamento de neuropatia diabética está bem documentado (STRACKE, LINDEMANN e FEDERLIN, 1996; WINKLER *et al.*, 1999; STRACKE *et al.*, 2008; BELTRAMO, MAZZEO e PORTA, 2021). Os mecanismos pelos quais a tiamina neutraliza os danos microvasculares do diabetes estão associados à redução das concentrações

de lactato e da formação de produtos finais de glicação avançada (AGE - *advanced glycation end products*) e à redução da formação de ROS (BELTRAMO, MAZZEO e PORTA, 2021).

A vitamina B2 ou riboflavina é um precursor da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e da flavina mononucleotídeo (FMN) que atuam como transportadores de elétrons. Como grupo prostético, estes compostos são essenciais na atividade das flavoenzimas que incluem, oxidases, redutases e desidrogenases. As flavina-oxidases usam oxigênio como aceptor de elétrons e transferem dois elétrons para formar H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) ou quatro elétrons para formar H₂O (água). As flavina-redutases catalisam a redução de substratos. Um exemplo típico de uma flavina-redutase é glutatona redutase, na qual usa NADPH como substrato redutor. As flavina-desidrogenases catalisam a remoção de hidrogênio de um substrato e a transferência do hidrogênio a um aceptor em uma reação de oxirredução (DEPEINT *et al.*, 2006). A mitocôndria contém cinco acil-CoA desidrogenases que utilizam FAD. Essas desidrogenases catalisam a primeira etapa no ciclo da β -oxidação de AGs (DEPEINT *et al.*, 2006).

A maior parte da riboflavina é estocada no fígado como FAD. O perfil de vitamina B2 no plasma é composto por 50% de riboflavina, 40% de FAD e 10% de FMN (DEPEINT *et al.*, 2006).

A deficiência de vitamina B2 cursa com uma redução importante na atividade das flavina-desidrogenases, levando à redução da β -oxidação de AGs na mitocôndria (NAGAO e TANAKA, 1992). Em ratos, a deficiência de vitamina B2 levou à inibição da atividade da succinato desidrogenase, à redução da β -oxidação, à um aumento dos níveis de AL e redução dos níveis de ARA (POWERS, 2003).

Anemia normocítica e normocrômica ocorre na deficiência de riboflavina como resultado da redução da formação do grupo heme nas hemácias, da redução da absorção de ferro intestinal e da menor mobilização da ferritina (ATAMNA, 2004; DEPEINT *et al.*, 2006). Além disso, a deficiência de riboflavina afeta o metabolismo de outras vitaminas como o folato, a vitamina B6, a vitamina B12 e a colina (DEPEINT *et al.*, 2006). Os efeitos da suplementação de vitamina B2 na respiração celular e produção de ATP e na β -oxidação parecem promissores e tem sido alvo de estudos (DEPEINT *et al.*, 2006).

A vitamina B3 ou niacina é um precursor dos grupos redutores da NAD⁺ e da NADP⁺. Essas moléculas estão envolvidas em mais de 500 reações enzimáticas incluindo reações associadas à respiração mitocondrial, glicólise e β -oxidação de AGs (DEPEINT *et al.*, 2006).

Ao entrar nas células, a nicotinamida é majoritariamente metabolizada de forma imediata em NAD⁺, que funciona como um transportador de elétrons para formar ATP por meio da respiração mitocondrial. NADP⁺ funciona como doador de hidrogênio nas reações de

redução na biossíntese de AGs e esteroides ou como coenzima na via das pentoses (DEPEINT *et al.*, 2006).

A deficiência de NAD⁺ leva à diminuição da síntese de ATP e da glicólise e ao aumento de sinais inflamatórios (JACOBSON *et al.*, 2001). Além disso, a deficiência de niacina reduz os processos de reparação do DNA (HAGEMAN e STIERUM, 2001). Estudos com modelos experimentais sugerem que a deficiência de niacina tem efeitos genotóxicos, resultando em mutações genéticas e instabilidade dos cromossomos (KIRKLAND, 2003).

A vitamina B3 participa de reações de dessaturação dos AGs. As dessaturases contêm um domínio N-terminal do citocromo b5 que é necessário para a transferência de elétrons da NADH do citocromo b5 redutase e do AG para o oxigênio molecular, produzindo um AG com uma ligação dupla adicional, H₂O e NAD⁺ (KIM *et al.*, 2019; NAKAMURA e NARA, 2004). As reações catalisadas pelas D5D e D6D, enzimas-chave responsáveis pela síntese de AGPIs, regeneram NAD⁺ a partir de NADH (KIM *et al.*, 2019).

O ácido pantotênico é o precursor da coenzima A (CoA), uma molécula essencial para 4% de todas as reações enzimáticas conhecidas no organismo humano. A CoA possui um papel importante na síntese do grupo heme, no metabolismo lipídico e como grupo prostético no ciclo de Krebs (DEPEINT *et al.*, 2006).

A biotina é um grupo prostético que desempenha papel importante no metabolismo lipídico. Por atuar como coenzima de cinco carboxilases mitocondriais, a biotina é essencial para o crescimento, desenvolvimento e a homeostase mitocondrial e celular (DEPEINT *et al.*, 2006). A biotina regula a expressão de genes importantes no metabolismo da glicose, favorecendo a glicólise e inibindo a gliconeogênese (FERNANDEZ-MEJIA, 2005). Essa vitamina exerce efeito na glicoquinase, por meio da ativação de fatores de transcrição que estimulam a atividade desta enzima-chave na glicólise (DAKSHINAMURTI e CHEAH-TAN, 1968; DAKSHINAMURTI, TARRAGO-LITVAK e HONG, 1970; CHAUHAN e DAKSHINAMURTI, 1991). Além disso, a biotina também estimula a expressão gênica de insulina (ROMERO-NAVARRO *et al.*, 1999) e inibe a atividade de fatores de transcrição na expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, enzima que atua na síntese de glicose no fígado (DAKSHINAMURTI e LI, 1994). De La Vega e Stockert (2000) observaram que a biotina também atua no aumento da atividade do receptor de insulina em nível pós-transcricional por meio de sinalização de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP).

Estudos em modelos animais e em humanos demonstraram resultados da suplementação de biotina (FERNANDEZ-MEJIA, 2005) na redução de glicemia (REDDI *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 1996; MAEBASH *et al.*, 1993; COGGESHAL *et al.*, 1985; HEMMATI, BABAEI e

ABDOLSALEHEI, 2013), do VLDL-c (REVILLA-MONSALVE *et al.*, 2006) e dos triglicerídeos (BÁEZ-SALDAÑA *et al.*, 2004; REVILLA-MONSALVE *et al.*, 2006).

O perfil de biotina no organismo é comumente avaliado pela excreção de biotina e de 3-hidroxivalerato, além da biotina plasmática e das concentrações de AGs de cadeia ímpar no plasma (DEPEINT *et al.*, 2006).

A deficiência de biotina é rara, mas pode ocorrer em erros inatos do metabolismo e como consequência da ingestão de clara de ovo cru (DEPEINT *et al.*, 2006). Na deficiência de biotina, a atividade das carboxilases está diminuída. A menor atividade da propionil-CoA descarboxilase leva ao acúmulo dos níveis de propionil-CoA. Este, por sua vez, compete com o acetil-CoA na via metabólica da síntese de AGs de cadeia ímpar, resultando em aumento desses AGs no plasma. Dessa forma, os níveis aumentados de pentadecílico (C15:0) e margárico (C17:0) são biomarcadores de deficiência de biotina (LIU *et al.*, 1993; MOCK *et al.*, 2002; DEPEINT *et al.*, 2006).

2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como vimos, os estudos demonstram associações de determinados micronutrientes, isoladamente, ao metabolismo lipídico. Contudo, no metabolismo humano, uma rede complexa de compostos orgânicos atua em combinação e exercem forças sinérgicas ou antagônicas que influenciam de forma direta ou indireta o metabolismo lipídico. É possível que muitos resultados contraditórios quantos aos efeitos de nutrientes na prevenção ou tratamento de doenças seja devido à ausência ou escassez de estudos que considerem as diferentes combinações nutriente-nutriente e nutriente-ambiente.

O caminho para a resolução desse problema parece ser o uso de métodos científicos apropriados com ferramentas analíticas mais sofisticadas para que possamos melhor compreender as ciências da nutrição e transferir este conhecimento para a prática. Ensaio clínicos do tipo *N-of-1*, com abordagem que analise os efeitos da exposição de nutrientes em doses seguras por período longo, combinada à avaliação genética, dietética e de parâmetros fisiológicos podem trazer avanços nesse sentido (MONTEIRO, KUSSMANN e KAPUT, 2015). Estudos do tipo *N-of-1* são apropriados para aplicação nas ciências da nutrição, por considerar as variações interindividuais de necessidades nutricionais.

3 OBJETIVOS

Este estudo possui dois objetivos:

- a) Avaliar a reprodutibilidade da resposta metabólica de 23 AGs eritrocitários após suplementação com vitaminas e minerais em duas populações compostas por crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade.

Os ácidos graxos eritrocitários são: mirístico (C14:0), pentadecílico (C15:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1n-7), margárico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), eláidico (C18:1*trans*-9), oleico (C18:1n-9), vacênico (C18:1*trans*-11), linoleico (C18:2n-6), alfa-linolênico (C18:3n-3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1n-9), eicosadienoico (C20:2n-6), dihomogama-linolênico (C20:3n-6), araquidônico (C20:4n-6), eicosapentaenoico (C20:5n-3), docosanoico (C22:0), erúcico (C22:1n-9), docosaexaenoico (C22:6n-3), tetracosanoico (C24:0) e nervônico (C24:1n-9).

- b) Descrever variáveis preditoras para as respostas metabólicas nos AGs após a suplementação.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população estudada compreendeu a coorte do *Harmonized Micronutrient Project*, também conhecida como *Brazil Micronutrient Project*, composta por crianças e adolescentes, de 9 a 13 anos de idade, recrutados de duas escolas públicas, a Escola Estadual Professor Rafael Leme Franco e a Escola Estadual Professor Walter Ferreira; e uma escola particular, o Colégio Viktor Frankl. Trata-se de um ensaio clínico realizado entre os anos de 2013 e 2014, pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

Voluntários de 9 a 13 anos, 11 meses e 29 dias de idade, sem diagnóstico prévio de doença e clinicamente estáveis foram incluídos no estudo. Os participantes elegíveis para o estudo e seus respectivos pais e/ou responsáveis assinaram um Termo de Consentimento Esclarecido. O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) cujo número é 00969412.6.0000.5440, e registrado no ClinTrials.gov (NCT01823744).

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente trabalho é um estudo longitudinal retrospectivo do tipo ensaio clínico *N-of-1*. Neste tipo de ensaio clínico, os sujeitos são submetidos a períodos de intervenção e de *washout*, sendo os participantes os seus próprios controles.

Para todos os participantes da pesquisa foram avaliados dados dietéticos, antropométricos e metabólicos no momento basal (T1), após seis semanas de intervenção (T2) e após seis semanas de *washout* (T3). Compreende-se neste estudo o termo “resposta” ou o Δ (delta) de uma determinada variável como sendo a diferença de seu valor mensurado antes e depois da intervenção (T2-T1).

A intervenção consistiu na suplementação com barra de leite enriquecida com 12 vitaminas (A, B1, B2, B3, B6, B12, C, D, E, folato, biotina, pantotenato) e 5 minerais (ferro, fósforo, cálcio, magnésio e zinco), durante 5 dias consecutivos, por 6 semanas. Essa suplementação se deu por meio de uma barra de leite, de nome comercial “Nestrovit”, da marca “NESTLÉ®”, que não era comercializada no Brasil no momento da pesquisa e ainda se mantém fora do mercado brasileiro. A composição nutricional deste produto está descrita no ANEXO A. A quantidade de barra de leite fornecida aos participantes foi de 2 (10g) a 3 (15g) barras e a quantidade de vitaminas e minerais suplementados não ultrapassou o limite máximo de ingestão

diária recomendada (UL - *Upper Intake Levels*). A quantidade de barra de leite suplementada foi determinada com o objetivo de garantir a ingestão de 100% das recomendações de ingestão diária para as vitaminas de acordo com a faixa etária da população (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997, 1998, 2000, 2001).

4.3 AMOSTRAGEM

A técnica de amostragem utilizada no *Brazil Micronutrient Project* foi a não probabilística. Para o recrutamento dos participantes, foram contatadas cinco escolas da região e as três escolas mencionadas previamente aceitaram participar da pesquisa.

No primeiro momento, os participantes foram avaliados por um médico pediatra para o estadiamento puberal, de acordo com critérios de Tanner (TANNER, 1962) e, posteriormente, nos três momentos do estudo (T1, T2 e T3), para avaliar o estado clínico do participante.

Foram considerados como critérios de exclusão a presença de um ou mais episódios de temperatura axilar maior que 37°C nos últimos 15 dias que precederam a coleta de sangue, três ou mais episódios de fezes líquidas nas últimas 24 horas antes da avaliação, o consumo de qualquer tipo de suplemento vitamínico ou mineral, a prática de dieta para redução de peso ou qualquer outro tipo de dieta restritiva, diagnóstico de doença crônica que poderia interferir nos resultados da pesquisa e participação de outra pesquisa clínica nas últimas 4 semanas precedentes ao início do estudo.

Para este trabalho foram considerados todos os participantes do *Brazil Micronutrient Project* que completaram o estudo até o momento T3 nos anos de 2013 (n=136) e de 2014 (n=135). Foram excluídos da amostra os *outliers* para as concentrações de vitaminas e minerais no sangue no T1, participantes que eram irmãos e/ou que tiveram dados incompletos na concentração de ácidos graxos eritrocitários. Após este procedimento obteve-se uma amostra final de 232 participantes, os quais 110 foram avaliados em 2013 e 122 em 2014. Destes, 48 indivíduos participaram nos dois momentos da pesquisa, em 2013 e em 2014.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARTICIPANTES

A avaliação dos participantes ocorreu aos sábados e aos domingos em todos os momentos do estudo (T1, T2 e T3), com cerca de 60 a 70 participantes por dia. Pesquisadores treinados realizaram todas as entrevistas e medidas corporais que incluíram questionário de frequência semiquantitativa de alimentos, medidas antropométricas e análise corporal por

bioimpedância elétrica. O nível socioeconômico foi avaliado por meio de questionário da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA, 2014).

4.5 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi aferido por questionário semiquantitativo de frequência alimentar (QSFA) previamente validado para crianças de 5 a 10 anos de idade (ANEXO B) (FUMAGALLI *et al.*, 2008).

O QSFA contém 64 itens alimentares, questões sobre a ingestão habitual de gordura visível das carnes, o tipo de gordura utilizada no preparo das refeições, a frequência do consumo de produtos do tipo *light* e o fracionamento da dieta, e uma questão sobre outros alimentos habitualmente consumidos que não constavam no questionário (FUMAGALLI *et al.*, 2008). Para este estudo, o QSFA foi escolhido por avaliar a ingestão alimentar de um período de tempo maior quando comparado ao recordatório alimentar de 24 horas.

O QSFA foi aplicado na forma de entrevista, por equipe previamente treinada, na presença dos pais ou responsáveis legais, com auxílio de álbum fotográfico com porções alimentares (MONTEIRO *et al.*, 2007).

As informações obtidas foram referentes ao consumo alimentar do último mês. A conversão da frequência de consumo alimentar em quantidade diária foi realizada proporcionalmente associada à unidade de tempo. Os escores foram multiplicados pelo peso da porção alimentar indicada pelo participante para a determinação da quantidade diária ingerida. Para exemplificação, a conversão da porção diária de consumo de 50g de pão francês para um indivíduo que consome este alimento 5 vezes na semana, resultaria em uma quantidade de 35,71g/dia ($5 \times 50 \div 7 = 35,71$).

O cálculo do aporte nutricional foi realizado no *DietWin Professional Software*® versão 2011. Para este trabalho foram considerados os cálculos da ingestão de energia, carboidrato, proteína, lipídio, colesterol, AGS, AGPI, AGMI, fibras, vitaminas (A, D, E, K, B1, B2, B3, B6, B12, ácido fólico) e minerais (cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, sódio, potássio e iodo).

4.6 COLETA E ANÁLISE DOS METABÓLITOS

Cerca de 20 ml de sangue foram coletados após 12 horas de jejum. As amostras de sangue foram codificadas no momento da coleta, centrifugadas, separadas e congeladas à -80°C.

Para as análises bioquímicas (hemograma, lipidograma, ferro, albumina, proteínas totais, glicemia, sódio, potássio, cloro e proteína C reativa) as amostras foram encaminhadas imediatamente após a coleta de sangue ao Laboratório do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP.

A determinação de glicose no soro ou plasma foi feita por método enzimático (kit comercial Glicemia enzimática AA®, linha líquida, Wiener lab. 2000 Rosario – Argentina). O colesterol total em soro ou plasma foi dosado por método enzimático (kit comercial Colestat enzimático AA®, linha líquida, Wiener lab. 2000 Rosario – Argentina). O HDL-c foi dosado por método colorimétrico sem precipitação (kit comercial HDL Colesterol monofase AA plus®, Wiener lab. 2000 Rosario – Argentina). Os triglicerídeos em soro ou plasma foram dosados por método enzimático (kit comercial TG Color GPO/PAP AA®, linha líquida, Wiener lab. 2000 Rosario – Argentina). O LDL-c e o VLDL-c foram determinados por meio da fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, LEVY e FREDRICKSON, 1972).

As análises bioquímicas dos AGs e vitaminas foram realizados em laboratórios na Suíça (*Nestlé Research Center, Institute of Health Sciences - Lausanne, Suíça*) e na Noruega (*Vitas Analytical Services - Oslo, Noruega*). Os AGs nos eritrócitos foram avaliados por cromatografia líquida-gasosa de acordo com métodos descritos (MASOOD, STARK e SALEM, 2005; DESTAILLATS e CRUZ-HERNANDEZ, 2007).

As vitaminas A, E e os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida com detectores por ultravioleta ou fluorescência conforme metodologia descrita no ANEXO C. As vitaminas hidrossolúveis, tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido pantotênico e biotina foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem, conforme métodos publicados (MEISSER REDEUIL *et al.*, 2015). O ácido fólico e seus metabólitos foram avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem conforme metodologia descrita no ANEXO C. Cobalamina e folato total foram analisados no laboratório Vitas® (Oslo, Noruega) com método MonoBind Elisa AM-396 (www.vitas.no) (Folate/Vitamin B12 Anemia Panel VAST test system, Monobind, Lake Forest, CA 92630, USA). A 25-hidroxi Vitamin D3 (25-OH-VitD3) e metabólitos (25-OH-VitD2 e 3-epi-25OH VitD3) foram analisados no laboratório Vitas® (Oslo, Noruega), conforme métodos publicados (KHAW, LUBEN e WAREHAM, 2014).

4.7 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL

Peso e estatura foram aferidos em jejum, imediatamente após a coleta de sangue, de acordo com procedimentos padronizados (JELLIFE, 1968). O IMC foi utilizado como critério para classificar o estado nutricional. Os participantes foram considerados com magreza grave, se $IMC < \text{percentil } 3$; magreza, se $\text{percentil } 3 \leq IMC < \text{percentil } 15$; peso adequado, se $\text{percentil } 15 \leq IMC < \text{percentil } 85$; sobrepeso, se $\text{percentil } 85 \leq IMC < \text{percentil } 97$ e obesidade se $IMC \geq \text{percentil } 97$, conforme as curvas de IMC para idade para indivíduos de cinco a 19 anos da Organização Mundial da Saúde (ONIS *et al.*, 2007).

A circunferência da cintura também foi aferida com o indivíduo em jejum. A medida da circunferência da cintura foi aferida no nível imaginário da linha horizontal na região mediana entre a última costela e a crista ilíaca (HEYWARD e STOLARCZYK, 1996) ou com a cicatriz umbilical como ponto de referência.

A composição corporal dos indivíduos foi analisada utilizando-se aparelho de impedância bioelétrica tetrapolar da marca *Biodynamics 450*[®], com técnicas e procedimentos padronizados (LUKASKI *et al.*, 1986). O aparelho da *Biodynamics 450*[®] utiliza equações padronizadas para o cálculo de massa gorda, massa livre de gordura e água corporal total (HOUTKOOPE *et al.*, 1992; DANFORD, SHOELLER e KUSHNER, 1992). A classificação de acordo com o percentual de gordura corporal foi definida segundo McCarthy *et al.* (2006).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kolmogorov-Smirnov seguido de análise dos gráficos de distribuição e de densidade foram utilizados para avaliar a normalidade dos dados. A análise de componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*) foi realizada para a exclusão de *outliers*.

Para comparação entre as populações foi realizada o teste do qui-quadrado para as variáveis nominais e o teste de Mann-Whitney para as variáveis quantitativas contínuas. Para avaliação longitudinal dos níveis de AGs foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. O teste de regressão para a média (*regression to the mean*) foi utilizado para avaliar se a alteração observada pode ser atribuída ao efeito da intervenção (MEE e CHUA, 1991). A função em linguagem R criada para análise de regressão para a média encontra-se no APÊNDICE A.

No método de regressão para a média deve-se especificar a média real da população para cada variável analisada. Devido à ausência de avaliação em nível populacional para vários AGs, a média real populacional foi considerada como sendo a média aritmética entre os valores dos AGs nos momentos T1 e T3. Como os AGPIs AL e AAL são considerados essenciais, ou

seja, somente podem ter sido provenientes da alimentação, e como estes AGPIs essenciais podem influenciar na síntese endógena de outros AGs (NTAMBI e MIYAZAKI, 2004a; RIOUX, LEMARCHAL e LEGRAND, 2000) a análise da regressão para a média também foi realizada de forma agrupada. As populações foram agrupadas com base nas medianas de AL e AAL no T2. Em 2013 a população foi agrupada em AL < 19 mg/dL e \geq 19 mg/dL e AAL < 0,25 mg/dL e \geq 0,25 mg/dL. Em 2014 foi seguido o mesmo critério com os valores de medianas de 17 mg/dL e 0,20 mg/dL para o AL e o AAL, respectivamente.

Para identificar as variáveis associadas às alterações observadas nos AGs foi realizada a análise de regressão de Rede Elástica (*Elastic Net Regression*) com validação cruzada. O modelo de Rede Elástica, é um método de regressão penalizada que funciona através do encolhimento das magnitudes dos regressores no modelo. O modelo de regressão de Rede Elástica é uma combinação dos modelos LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) e *Ridge*, com um termo de regularização que combina as penalidades estipuladas nos dois modelos (ZOU e HASTIE, 2005).

O modelo LASSO é uma abordagem de regularização para estimação de modelos lineares, na qual o algoritmo é capaz de realizar estimativas de parâmetros e seleção de variáveis de forma simultânea. O objetivo principal é selecionar o melhor subconjunto de variáveis a partir de um conjunto maior de preditores, bem como melhorar a precisão do modelo para torná-lo mais interpretável. O método LASSO é uma boa alternativa para os casos em que há muitas variáveis e a relação delas com a variável dependente não é tão clara. O modelo minimiza a soma dos quadrados dos resíduos, sujeito à restrição de que a soma dos valores absolutos dos coeficientes da regressão é menor que uma constante de valor positivo, especificada como limite superior. Esta restrição faz com que os coeficientes de regressão para algumas variáveis encolham em direção a zero. O processo de encolhimento permite uma melhor interpretação do modelo e identifica as variáveis mais fortemente associadas com a variável-alvo correspondente. No processo de seleção de variáveis, aquelas que ainda possuem coeficiente diferente de zero após o processo de regularização são selecionadas para o modelo. O modelo obtém um subconjunto de preditores que minimiza o erro de estimação (TIBSHIRANI, 1996).

O modelo de regressão *Ridge* é um método de regularização que tem como principal objetivo analisar dados de regressão múltipla que apresentam multicolinearidade. A regressão *Ridge* reduz os erros da regressão através da penalização que inclui um viés e reduz os valores dos regressores à próximo a zero. Com isso os atributos de menor contribuição para o poder preditivo do modelo são levados para a irrelevância, porém não são excluídos do modelo (WHITTAKER, THOMPSON e DENHAM, 2000).

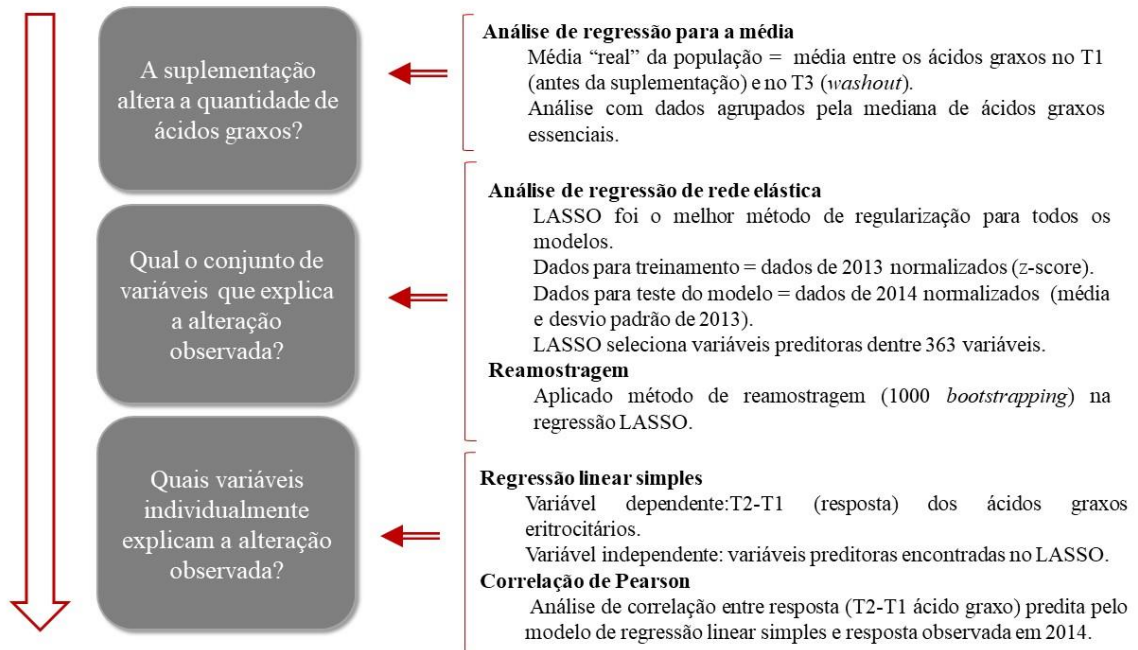
A análise de regressão de rede elástica auxilia na decisão de qual o melhor modelo de penalização para uma dada amostra. No presente estudo obteve-se melhor ajuste para todos os modelos testados com a penalização por LASSO. As regressões foram realizadas com validação cruzada e reamostragem em 1000 *bootstrapping*. A reamostragem teve por finalidade, observar a consistência dos coeficientes de regressão. Na regressão LASSO os dados de 2013 foram normalizados em *z-score*, e utilizados para treinamento, de modo que os modelos de regressão foram desenvolvidos com a amostra de 2013. Os dados de 2014 foram normalizados utilizando-se a média e o desvio-padrão dos dados de 2013. Os modelos de regressão (determinados com dados da população de 2013) foram testados para prever os valores de AGs da população de 2014. Os valores preditos pelos modelos e os valores reais observados foram avaliados quanto à concordância. Esta análise teve como objetivo avaliar a acurácia dos modelos em prever os valores de AGs da população de 2014. Para a análise de concordância foi realizada a correlação de Pearson.

Para cada resposta (Δ ou T2-T1) de AG como variável dependente foram incluídas nas análises de regressão LASSO 363 variáveis preditoras, dentre medidas antropométricas, de composição corporal, do consumo alimentar, dos exames bioquímicos e dos AGs eritrocitários, nos momentos T1, T2 e T2-T1 (Δ). Foi realizada a imputação dos dados para as variáveis com dados incompletos e, foram excluídas àquelas com mais de 25% de dados incompletos.

Análise de regressão linear simples foi realizada para cada variável preditora do conjunto de variáveis selecionadas pelo LASSO. Esta análise teve como objetivo obter uma perspectiva da contribuição individual de cada variável para os modelos. Modelos de regressão linear múltipla também foram testados quando possível.

O software R (versão 3.5.3 ou mais avançada) foi utilizado para as análises estatísticas e está disponível para *download* gratuitamente em <https://www.r-project.org/>. O nível de significância de $p < 0,05$ foi considerado para todas as análises estatísticas. O delineamento dos métodos estatísticos utilizados neste estudo está ilustrado na Figura 1.

Figura 1- Delineamento das análises estatísticas.



Fonte: Elaboração própria.

Para avaliar se houve diferença nos níveis de ácidos graxos foi aplicado o teste pareado de Wilcoxon e a regressão para a média (*regression to the mean*) foi utilizada para avaliar se a alteração observada nos ácidos graxos pode ser atribuída à intervenção com suplementação com barra de leite enriquecida com micronutrientes. A análise de rede elástica e a regressão por LASSO auxiliaram na seleção do conjunto de variáveis preditoras que explicam as alterações observadas nos ácidos graxos. Os modelos de predição foram testados quanto à acurácia e as variáveis preditoras também foram testadas individualmente para avaliar o grau de importância para os modelos de predição.

5 RESULTADO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

As características demográficas, antropométricas e clínicas das populações encontram-se descritas na Tabela 1. A prevalência de magreza, eutrofia, sobrepeso e obesidade na população total foi de 3,4%, 50,9%, 21,6% e 24,1%, respectivamente. Não houve diferença estatística para as proporções de magreza, eutrofia, sobrepeso e obesidade entre as populações de 2013 e 2014. Levando em consideração a classificação do percentual de gordura corporal, 49% e 36% da população de 2013 e 2014, respectivamente, tinham excesso de gordura corporal. Não houve diferença estatística no percentual de gordura corporal entre as populações de 2013 e de 2014.

Quanto à classificação socioeconômica, tanto para a população de 2013 quanto para a população de 2014, a maioria das famílias se encontravam nas categorias B2 e C1. De acordo com dados obtidos da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) estas categorias representavam uma renda mensal de cerca de R\$ 1.800,00 para a categoria C1 e de R\$ 3.000,00 para a categoria B2 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA, 2014).

Levando em consideração a hemoglobina sérica $< 12\text{g/dL}$, definida como parâmetro indicador de anemia pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004), a prevalência de anemia no momento basal encontrada na população de 2013 foi de 1,8% (n=2) e na população de 2014 foi de 2,5% (n=3).

Tabela 1 - Características demográficas, antropométricas e clínicas de 232 crianças e adolescentes que participaram do estudo nos anos de 2013 e 2014.

	Mediana T1 (2013)	1º Qt	3º Qt	Mediana T1 (2014)	1º Qt	3º Qt	p-valor 2013 vs 2014
N	110	-	-	122	-	-	-
Sexo (% feminino)	56,4	-	-	52,5	-	-	5,51 x 10 ⁻⁰¹
Estágios de Tanner (n)*	9 ^a /50 ^b /36 ^c /11 ^d /4 ^e	-	-	6/29/57/28/2	-	-	1,02 x 10 ⁻⁰³
Status socioeconômico (n)	0 ^a /5 ^b /18 ^c /37 ^d /32 ^e /14 ^f /4 ^g	-	-	0/4/15/46/32/16/9	-	-	7,30 x 10 ⁻⁰¹
Idade (anos)*	12,00	11,00	12,00	12,00	11,00	13,00	6,62 x 10 ⁻⁰⁵
Peso (kg)	46,53	37,44	58,45	46,80	38,20	58,59	7,61 x 10 ⁻⁰¹
Altura (cm)	152,75	146,83	157,70	155,00	150,50	160,18	6,08 x 10 ⁻⁰²
IMC (kg/m ²)	20,42	16,54	23,11	19,42	16,58	23,25	6,96 x 10 ⁻⁰¹
Classificação IMC (n)	5 ^a /47 ^b /29 ^c /29 ^d	-	-	3/71/21/27	-	-	9,97 x 10 ⁻⁰²
Circunferência da cintura (cm)	73,60	63,08	83,53	67,75	60,53	83,95	1,78 x 10 ⁻⁰¹
Massa livre de gordura (%)	74,77	68,22	79,72	76,35	70,75	81,11	1,26 x 10 ⁻⁰¹
Massa gorda (%)	25,17	20,17	31,67	23,63	18,89	29,20	1,44 x 10 ⁻⁰¹
Excesso de gordura corporal (n)	54 (49%)	-	-	44 (36%)	-	-	6,11 x 10 ⁻⁰²
Colesterol total (mg/dL)	167,00	142,50	188,00	161,00	141,00	179,75	3,44 x 10 ⁻⁰¹
Triglicerídeos (mg/dL)	70,00	50,00	93,00	61,50	46,00	83,50	8,65 x 10 ⁻⁰²
VLDL colesterol (mg/dL)	14,00	10,00	19,00	12,00	9,00	16,75	7,13 x 10 ⁻⁰²
LDL colesterol (mg/dL)	107,00	85,00	122,50	100,00	83,25	119,00	3,88 x 10 ⁻⁰¹
HDL colesterol (mg/dL)	45,00	38,00	52,00	45,00	39,00	52,00	9,22 x 10 ⁻⁰¹
Glicemia de jejum (mg/dL)	92,00	88,00	97,00	94,00	90,00	98,00	2,17 x 10 ⁻⁰¹
Albumina sérica (g/dL)	4,50	4,40	4,70	4,50	4,40	4,70	5,26 x 10 ⁻⁰¹
Ferro sérico (µg/dL)*	92,00	72,25	114,00	79,50	63,00	103,00	4,13 x 10 ⁻⁰³
UIBC (µg/dL)	237,5	209,5	265,75	229	200	256,5	2,37 x 10 ⁻⁰¹
Leucócitos (x10 ³ cél./mm ³ [µL])	6,68	5,52	8,13	6,56	5,58	7,92	9,97 x 10 ⁻⁰¹
Plaquetas (x10 ³ cél./mm ³ [µL])*	278,5	244,25	321,75	251	222,25	294	5,79 x 10 ⁻⁰⁴
Hemoglobina (g/dL)	13,90	13,20	14,38	13,85	13,40	14,30	9,28 x 10 ⁻⁰¹
Hematócrito (%)*	41,8	40,25	43,83	38	37,2	39,18	2,45 x 10 ⁻²⁶
Volume corpuscular médio (µm ³)*	85,00	82,38	87,68	82,50	80,73	84,60	3,28 x 10 ⁻⁰⁸

Cálcio total no sangue (mg/dL)*	10,40	10,20	10,60	10,80	10,50	11,00	1,80 x 10 ⁻¹⁴
Fósforo sanguíneo (mg/dL)	4,90	4,60	5,30	4,75	4,40	5,10	1,14 x 10 ⁻⁰¹
Proteína C Reativa no sangue (mg/L)*	0,07	0,03	0,20	0,05	0,01	0,16	1,19 x 10 ⁻⁰²
Sódio no sangue (mmol/L)*	139,80	138,63	141,23	138,30	137,60	139,20	6,18 x 10 ⁻⁰⁵
Potássio no sangue (mmol/L)	4,30	4,10	4,40	4,30	4,10	4,50	5,76 x 10 ⁻⁰¹
Cloro no sangue (mmol/L)*	101,95	100,55	103,08	103,21	102,41	104,10	2,92 x 10 ⁻¹⁰
Proteínas totais no sangue (g/dL)*	7,40	7,10	7,60	7,80	7,53	8,00	4,31 x 10 ⁻¹⁰

*Marcação para diferença estatística entre 2013 e 2014. O teste qui-quadrado foi realizado para as variáveis sexo, estágio Tanner, *status* socioeconômico, classificação IMC e excesso de gordura corporal. O teste de Mann Whitney foi aplicado para as demais variáveis. Excesso de gordura corporal refere-se à um valor maior do que o percentil 85 para a idade de referência (MCCARTHY *et al.*, 2006). Estágios de Tanner a=Estágio 1, b=Estágio 2, c=Estágio 3, d=Estágio 4, e=Estágio 5. *Status* socioeconômico a=A1 (12.000,00 reais), b=A2 (8.000,00 reais), c=B1 (6.000,00 reais), d=B2 (3.000,00 reais), e=C1 (1.800,00 reais), f=C2 (1.200,00 reais), g=D (895,00 reais). Classificação IMC a= Magreza grave e Magreza, b=Eutrofia, c=Sobrepeso, d=Obesidade. T1=momento basal, ou seja, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. Abreviações: IMC - Índice de Massa Corporal; VLDL – *Very Low-Density Lipoprotein*; LDL – *Low-Density Lipoprotein*; HDL – *High-Density Lipoprotein*. UIBC - *Unbound Iron Bind Capacity*.

5.2 PERFIL LIPÍDICO DAS POPULAÇÕES

De acordo com os valores de referência estabelecidos pela SBC (FALUDI *et al.*, 2017), o perfil lipídico na população em 2013 evidenciou uma incidência de CT > 170 mg/dL de 44,5% (n=49), LDL-c > 110mg/dL de 44,5% (n=49), triglicerídeos > 90 mg/dL de 28% (n=31) e HDL-c < 45 mg/dL de 46% (n=51). Em 2014 essa incidência foi na ordem de 37% (n=45), 34% (n=41), 17% (n=21) e de 48% (n=59), respectivamente. Não houve diferença estatística quanto à presença de dislipidemia entre as populações ($p= 0,4195$).

Após a suplementação, na população de 2013, houve uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de CT e de LDL-c ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística nos níveis de triglicerídeos plasmáticos, VLDL-c ou HDL-c (Tabela 2). Na população de 2014, houve uma redução estatisticamente significativa nos níveis séricos de CT ($p=0,04$) e de LDL-c ($p < 0,01$), bem como um aumento estatisticamente significativo nas concentrações de VLDL-c e de triglicerídeos após a suplementação com micronutriente ($p<0,01$). Não houve diferença estatística nos níveis de HDL-c (Tabela 3).

Tabela 2 - Lipidograma de 110 crianças e adolescentes antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2013.

Lipidograma	Antes da suplementação			Depois da suplementação			Wilcoxon pareado
	Mediana	1° Qt	3° Qt	Mediana	1° Qt	3° Qt	p -valor
Colesterol total*	167,00	142,50	188,00	156,00	135,50	174,75	$1,02 \times 10^{-06}$
HDL-colesterol	45,00	38,00	52,00	45,00	39,00	52,00	$4,89 \times 10^{-01}$
LDL-colesterol*	107,00	85,00	122,50	93,00	80,00	111,00	$4,39 \times 10^{-09}$
VLDL-colesterol	14,00	10,00	19,00	14,00	9,00	20,00	$6,87 \times 10^{-01}$
Triglicerídeos	70,00	50,00	93,00	68,50	46,25	100,75	$5,58 \times 10^{-01}$

*Marcação para diferença estatística. VLDL – *Very Low-Density Lipoprotein*; LDL – *Low-Density Lipoprotein*; HDL – *High-Density Lipoprotein*.

Tabela 3 - Lipidograma de 122 crianças e adolescentes antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2014.

Lipidograma	Antes da suplementação			Depois da suplementação			Wilcoxon pareado
	Mediana	1° Qt	3° Qt	Mediana	1° Qt	3° Qt	p -valor
Colesterol total*	161,00	141,00	179,75	157,00	143,00	175,75	$3,98 \times 10^{-02}$
HDL-colesterol	45,00	39,00	52,00	45,00	39,00	51,00	$4,67 \times 10^{-01}$
LDL-colesterol*	100,00	83,25	119,00	98,00	80,50	111,00	$3,56 \times 10^{-04}$
VLDL-colesterol*	12,00	9,00	16,75	13,00	10,00	19,00	$3,22 \times 10^{-03}$
Triglicerídeos*	61,50	46,00	83,50	67,00	50,25	93,75	$3,72 \times 10^{-03}$

*Marcação para diferença estatística. VLDL – *Very Low-Density Lipoprotein*; LDL – *Low-Density Lipoprotein*; HDL – *High-Density Lipoprotein*.

5.3 CARACTERÍSTICAS DO CONSUMO ALIMENTAR

Como esperado, o consumo alimentar da maioria das vitaminas e minerais aumentou com a suplementação nas duas populações.

Na população de 2013, foi observado uma redução significativa no consumo energético total e na quantidade de carboidratos, proteínas, lipídios e fibras. Também foi observada uma redução no consumo de gordura saturada, colesterol, ômega 3, ômega 6, AGMIs, AO, ARA e DHA. Houve um aumento no consumo de vitaminas lipossolúveis E, A e D e uma diminuição no consumo de vitamina K. Para as vitaminas hidrossolúveis, houve um aumento significativo de todas as vitaminas analisadas, exceto as vitaminas C e B12. Houve um aumento significativo no consumo de todos os minerais analisados, exceto iodo, fósforo, potássio e sódio (Tabela 4).

Na população de 2014, foi evidenciada uma diminuição do consumo de carboidratos, fibras, ARA e DHA. Não houve diferença estatística no consumo de proteínas, lipídios, energia, colesterol, gordura saturada, ômega 6, ômega 3, AGMIs e AO. Houve um aumento significativo do consumo de todas as vitaminas, exceto a vitamina K. O consumo de todos os minerais aumentou após a suplementação, com exceção do iodo, potássio e sódio onde foi observada uma redução (Tabela 5).

Tabela 4 - Características do consumo alimentar antes e após suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em 110 crianças e adolescentes que participaram do estudo em 2013.

Consumo alimentar	Antes da suplementação			Depois da suplementação			Wilcoxon pareado
	Mediana	1° Qt	3° Qt	Mediana	1° Qt	3° Qt	<i>p</i> -valor
Energia total (kcal)*	1916,50	1535,25	2457,00	1678,30	1330,25	2165,45	1,75x10 ⁻⁰⁶
Lipídios totais (g)*	66,97	52,57	81,49	58,95	43,15	73,88	5,60x10 ⁻⁰⁵
Fibras totais (g)*	19,51	13,80	25,51	17,27	12,24	23,27	1,14x10 ⁻⁰²
Proteínas (g)*	71,16	53,04	86,29	53,36	43,05	75,80	2,25x10 ⁻⁰⁷
Carboidratos (g)*	253,88	209,84	337,61	228,82	171,58	306,84	1,95x10 ⁻⁰⁴
Colesterol (mg)*	223,18	152,71	286,27	164,50	109,50	239,03	2,06x10 ⁻⁰⁶
Gordura Saturada (g)*	19,90	15,79	26,30	15,88	11,28	20,53	1,10x10 ⁻¹⁰
Ômega 6 (g)*	9,19	6,43	12,33	7,82	5,60	10,93	2,63x10 ⁻⁰³
Ômega 3 (g)*	0,92	0,68	1,33	0,82	0,63	1,04	1,08x10 ⁻⁰²
AGMI (g)*	15,82	12,19	19,49	11,71	8,62	15,43	2,03x10 ⁻¹⁰
Oleico (g)*	12,29	9,62	16,53	9,29	6,93	12,40	2,74x10 ⁻¹⁰
ARA (g)*	0,03	0,02	0,04	0,02	0,01	0,04	1,21x10 ⁻¹⁶
DHA (g)*	0,03	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02	3,13x10 ⁻⁰²
Vitamina A (mcg)*	371,28	252,76	546,58	786,07	660,55	964,08	3,43x10 ⁻¹⁷
Vitamina D (mcg)*	2,66	1,67	4,13	5,66	4,40	7,09	3,45x10 ⁻¹⁶
Vitamina E (mg)*	13,40	9,16	18,18	16,51	14,61	20,96	9,32x10 ⁻¹¹
Vitamina K (mcg)*	24,12	6,04	42,16	12,07	2,47	34,95	1,98x10 ⁻⁰³

Tabela 4 - Características do consumo alimentar antes e após suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em 110 crianças e adolescentes que participaram do estudo em 2013.

	(conclusão)						
Vitamina C (mg)	83,83	38,85	164,43	95,83	67,33	147,73	1,23x10 ⁻⁰¹
Ácido fólico (mcg)*	98,68	69,56	120,52	195,03	163,04	240,02	6,43x10 ⁻¹⁹
Vitamina B1 (mg)*	1,22	0,99	1,69	1,84	1,52	2,33	3,90x10 ⁻¹³
Vitamina B2 (mg)*	1,42	1,13	1,98	2,25	1,79	2,94	6,49x10 ⁻¹⁶
Vitamina B3 (mg)*	17,58	13,82	22,56	24,12	20,19	31,45	6,50x10 ⁻¹⁴
Vitamina B6 (mg)*	1,27	1,01	1,67	2,09	1,80	2,66	1,90x10 ⁻¹⁶
Vitamina B12 (mcg)	2,72	1,90	3,63	2,72	2,04	3,64	7,35x10 ⁻⁰¹
Cálcio (mg)*	674,62	469,89	848,32	730,53	583,50	1025,64	3,72x10 ⁻⁰⁵
Iodo (mcg)	245,02	185,68	348,88	231,54	176,77	322,44	6,32x10 ⁻⁰²
Ferro (mg)*	9,57	7,20	12,72	11,69	9,36	14,81	6,74x10 ⁻⁰⁸
Magnésio (mg)*	265,73	214,51	330,47	289,64	240,02	376,60	3,06x10 ⁻⁰³
Fósforo (mg)	978,17	793,38	1261,25	937,42	744,40	1239,20	4,45x10 ⁻⁰¹
Zinco (mg)*	9,70	7,38	12,45	11,53	9,15	13,86	1,68x10 ⁻⁰⁶
Potássio (mg)*	2034,44	1675,95	2479,91	1608,59	1209,37	2259,83	8,11x10 ⁻⁰⁷
Sódio (mg)*	2689,70	2095,10	3469,49	2532,72	1805,86	3298,54	1,65x10 ⁻⁰²

*Marcação para diferença estatística no teste pareado de Wilcoxon. AGMI: ácido graxo monoinsaturado. ARA: araquidônico. DHA: docosaenoico. Vitamina A representa retinol e equivalentes de retinol. Vitamina E representa tocoferóis.

Tabela 5 - Características do consumo alimentar antes e após suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em 122 crianças e adolescentes que participaram do estudo em 2014.

Consumo alimentar	Antes da suplementação			Depois da suplementação			Wilcoxon pareado p-valor
	Mediana	1° Qt	3° Qt	Mediana	1° Qt	3° Qt	
Energia total (kcal)	1717,00	1283,50	2336,75	1650,30	1300,25	2144,75	2,49x10 ⁻⁰¹
Lipídios totais (g)	56,20	41,50	80,61	57,17	47,04	76,94	2,37x10 ⁻⁰¹
Fibras totais (g)*	19,89	12,22	25,25	17,44	11,24	22,07	1,80x10 ⁻⁰³
Proteínas (g)	61,67	47,63	81,26	60,69	46,69	78,95	7,83x10 ⁻⁰²
Carboidratos (g)*	232,69	176,84	315,37	225,10	158,49	277,40	8,31x10 ⁻⁰³
Colesterol (mg)	180,62	122,27	245,49	162,21	117,95	236,80	2,97x10 ⁻⁰¹
Gordura Saturada (g)	16,44	12,71	23,99	18,57	12,96	23,93	1,51x10 ⁻⁰¹
Ômega 6 (g)	8,50	6,28	11,90	8,70	5,74	10,97	6,56x10 ⁻⁰²
Ômega 3 (g)	0,89	0,64	1,24	0,89	0,61	1,23	9,45x10 ⁻⁰²
AGMI (g)	12,78	9,56	18,69	12,95	10,65	18,16	6,84x10 ⁻⁰¹
Oleico (g)	10,22	7,41	14,58	10,51	7,93	15,46	3,64x10 ⁻⁰¹
ARA (g)*	0,03	0,01	0,04	0,02	0,01	0,04	1,24x10 ⁻¹⁷
DHA (g)*	0,03	0,02	0,06	0,01	0,01	0,05	3,13x10 ⁻⁰²
Vitamina A (mcg)*	313,76	187,32	532,32	823,33	701,15	964,31	6,62x10 ⁻¹⁹
Vitamina D (mcg)*	2,61	1,49	4,15	5,82	4,53	7,90	4,96x10 ⁻²⁰
Vitamina E (mg)*	12,58	8,81	16,17	18,40	14,75	22,33	3,55x10 ⁻¹⁹
Vitamina K (mcg)	21,06	1,44	57,02	12,04	1,56	42,08	1,50x10 ⁻⁰¹
Vitamina C (mg)*	68,72	35,02	149,19	92,73	66,06	138,10	2,87x10 ⁻⁰²
Ácido fólico (mcg)*	83,46	58,43	130,33	205,37	181,54	245,97	4,97x10 ⁻²⁰
Vitamina B1 (mg)*	1,22	0,86	1,59	1,92	1,65	2,35	2,49x10 ⁻¹⁵

Tabela 5 - Características do consumo alimentar antes e após suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em 122 crianças e adolescentes que participaram do estudo em 2014.

	(conclusão)						
Vitamina B2 (mg)*	1,44	0,87	2,00	2,38	1,89	2,98	$1,33 \times 10^{-19}$
Vitamina B3 (mg)*	15,82	12,05	21,33	26,64	22,77	32,29	$2,89 \times 10^{-19}$
Vitamina B6 (mg)*	1,15	0,87	1,54	2,37	1,99	2,83	$4,38 \times 10^{-21}$
Vitamina B12 (mcg)*	2,38	1,57	3,67	3,03	2,19	4,28	$4,39 \times 10^{-07}$
Cálcio (mg)*	608,93	442,96	840,87	802,18	568,03	991,22	$5,80 \times 10^{-10}$
Iodo (mcg)*	239,34	173,35	329,22	210,61	164,80	286,45	$2,57 \times 10^{-02}$
Ferro (mg)*	8,93	6,46	11,89	11,65	9,90	14,01	$6,94 \times 10^{-12}$
Magnésio (mg)*	242,02	173,81	329,66	314,25	246,33	374,39	$1,09 \times 10^{-09}$
Fósforo (mg)*	874,72	647,35	1158,45	1046,56	833,54	1273,97	$7,59 \times 10^{-06}$
Zinco (mg)*	8,72	6,36	10,90	12,01	9,96	13,95	$3,02 \times 10^{-14}$
Potássio (mg)*	1801,83	1309,30	2385,35	1641,86	1288,82	2302,62	$7,08 \times 10^{-03}$
Sódio (mg)*	2607,45	1948,67	3342,81	2245,12	1807,74	2929,69	$1,40 \times 10^{-03}$

*Marcação para diferença estatística no teste pareado de Wilcoxon. AGMI: ácido graxo monoinsaturado. ARA: araquidônico. DHA: docosaenoico. Vitamina A representa retinol e equivalentes de retinol. Vitamina E representa tocoferóis.

5.4 PERFIL DE VITAMINAS

Na Tabela 6 pode-se observar que algumas vitaminas no plasma das populações de 2013 e de 2014 encontravam-se abaixo dos valores de normalidade no momento basal, em especial as vitaminas alfa e gama-tocoferol, as vitaminas B1, B2, B12 e o folato, evidenciando um perfil de insuficiência vitamínica nas populações.

Na população de 2013, as vitaminas lipossolúveis retinol e gama-tocoferol reduziram significativamente e não houve diferença estatística de vitamina D e beta-caroteno após a suplementação. A maioria das vitaminas hidrossolúveis aumentaram significativamente após a suplementação, exceto a nicotinamida mononucleotídeo (NM - vitamina B3) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD - vitamina B2) (Tabela 7). Após o *washout* houve redução de todas as vitaminas, exceto da FAD onde não foi observada diferença estatística e do gama-tocoferol onde foi observado um aumento significativo (Tabela 7).

Na população de 2014, a resposta das vitaminas lipossolúveis foi idêntica à resposta observada na população de 2013, ou seja, houve uma redução de retinol e gama-tocoferol e não houve diferença estatística de vitamina D e beta-caroteno após a suplementação. Com relação às vitaminas hidrossolúveis, houve um aumento significativo para a maioria delas, exceto a nicotinamida mononucleotídeo (NM – vitamina B3), a tiamina monofosfato e metabólitos da tiamina (Subclasse da vitamina B1) que reduziram significativamente, e as vitaminas B9 (ácido p-aminobenzoilglutâmico), tiamina e B2 (flavina adenina dinucleotídeo) em que não houve

diferença estatística após a suplementação (Tabela 8). Após o *washout* a maioria das vitaminas reduziram significativamente com exceção da flavina adenina dinucleotídeo e do gama-tocoferol que aumentaram significativamente, e da tiamina, retinol e beta-caroteno que não tiveram diferença estatística (Tabela 8).

As Figuras 2 e 3 ilustram, de forma complementar, os níveis de vitaminas antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais, e após o período de *washout* em 2013 e em 2014.

Tabela 6 - Perfil vitamínico basal das crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade que participaram do estudo nos anos de 2013 e de 2014.

Vitamina no plasma	T1 (2013)	T1 (2014)	Mann Whitney <i>p</i> -valor	Média ou Mediana Ref	IC95% Ref	Idade (anos)	Ref
Beta Caroteno (precursor da vitamina A) (µg/mL)	0,19	0,18	9,15x10 ⁻⁰¹	0,13	0,12 – 0,14	6 a 11	1
Retinol (Vit A) (µg/mL)*	0,34	0,38	4,69x10 ⁻⁰⁴	0,36	0,36 - 0,37	6 a 11	1
Gama Tocoferol (Vit E) (µg/mL)	0,81	0,82	4,73x10 ⁻⁰¹	1,82	1,7 – 1,9	6 a 11	1
				1,79	1,7 – 1,9	12 a 19	1
Alfa Tocoferol (Vit E) (µg/mL)	5,81	6,10	6,52x10 ⁻⁰¹	8,2	8,0 – 8,4	6 a 11	1
Ácido p-aminobenzoilglutâmico (Vitamina B9) (nmol/L)*	3,60	7,50	1,85x10 ⁻¹²	11,9 ± 7,6	-	40 ± 1	2
Piridoxal 5'-fosfato (Vitamina B6) (nmol/L)	32,15	32,00	9,69x10 ⁻⁰¹	60,5	56,9 – 64,4	6 a 11	3
Piridoxal (Vitamina B6) (nmol/L)	7,30	7,80	1,46x10 ⁻⁰¹	21,1	8,8 – 58,7	1 a 18	3
Ácido pantotênico (Vitamina B5) (nmol/L)	215,50	198,50	1,37x10 ⁻⁰¹	sem referência	-	-	-
N1-metil-2-piridona-5-carboxamida (Vitamina B3) (nmol/L)	924,00	934,00	6,03x10 ⁻⁰¹	sem referência	-	-	-
Nicotinamida Mononucleotídeo (Vitamina 3) (nmol/L)*	383,50	465,00	2,35x10 ⁻⁰⁶	261,0 ± 217	-	20 a 34	4
Flavina Mononucleotídeo (Vitamina B2) (nmol/L)*	10,55	7,50	1,83x10 ⁻⁰⁶	13,02 ± 0,74	10,24 – 18,35	10 a 18	5
Flavina Adenina Dinucleotídeo (Vitamina B2) (nmol/L)*	45,40	32,15	8,39x10 ⁻¹⁴	65,35 ± 5,23	33,34 – 94,20	10 a 18	5
Riboflavina (Vitamina B2) (nmol/L)	11,30	10,90	2,96x10 ⁻⁰¹	20,08 ± 3,03	12,53 – 44,49	10 a 18	5
Tiamina Monofosfato (Vitamina B1) (nmol/L)*	8,50	10,10	2,69x10 ⁻⁰³	6,82	5,84 – 8,91	5 a 12	6
Tiamina (Vitamina B1) (nmol/L)*	3,40	2,90	1,70x10 ⁻⁰²	6,82	4,47 – 7,02	5 a 12	6
25-hidróxi-colecalciferol (25-OH-VitD3) (nmol/L)	63,70	69,50	3,50x10 ⁻⁰¹	63,8	61,6 – 66,1	6 a 11	1
Vitamina B12 (pg/mL)	375,00	402,00	1,68x10 ⁻⁰¹	728	713 - 743	6 a 11	1
Folato (vitamina B9) (ng/mL)*	4,86	4,33	1,02x10 ⁻⁰²	16,1	15,6 - 16,6	6 a 11	1

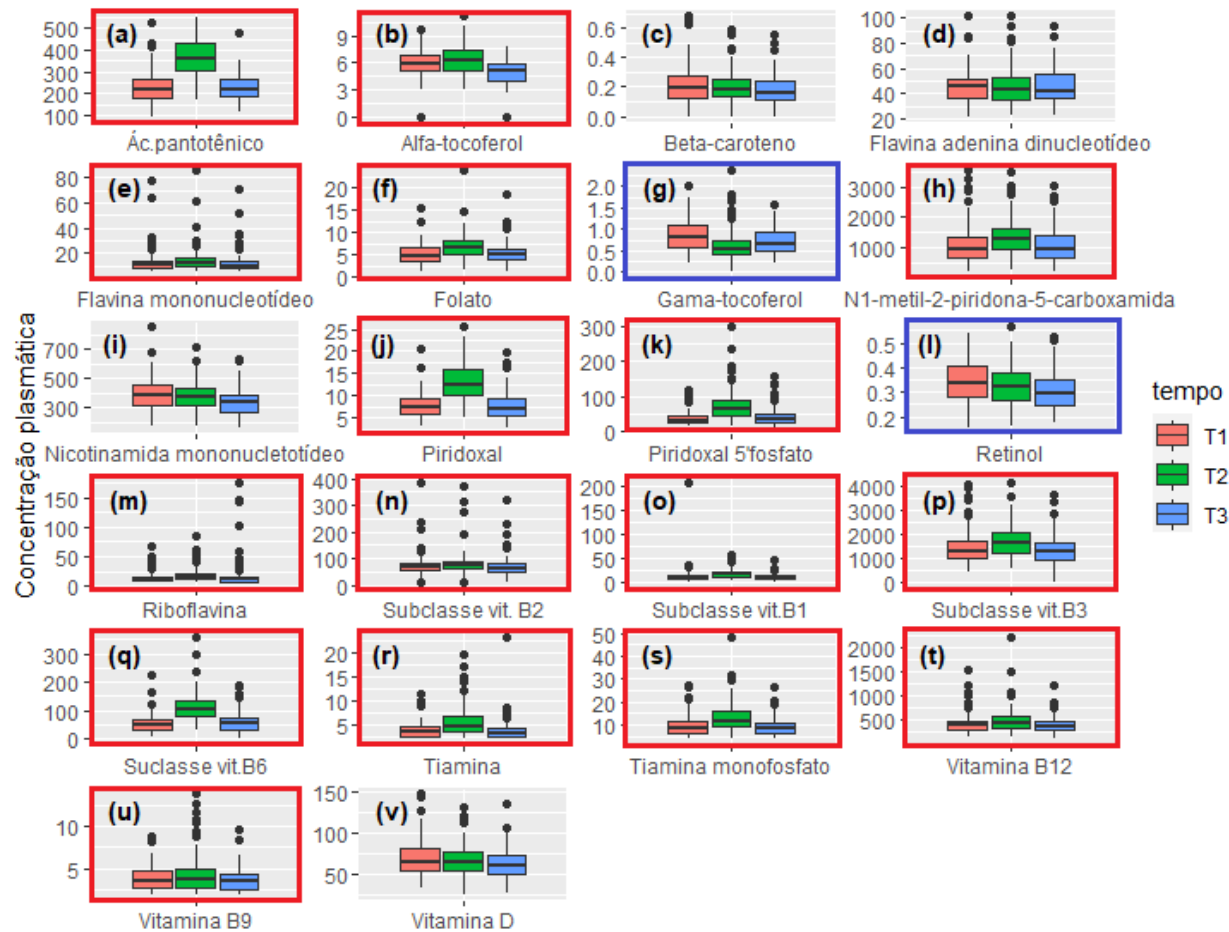
*Marcação para diferença estatística. T1 representa o nível de vitaminas no plasma no momento basal (antes da suplementação). Valores de referência de normalidade para as vitaminas: 1- (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012); 2 - (SOKORO *et al.*, 2006); 3 - (ALBERSEN *et al.*, 2015); 4 - (RIOS-AVILA *et al.*); 5 - (CAPO-CHICHI *et al.*, 2000); 6 - (ANWAR *et al.*, 2016).

Tabela 7 – Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2013.

Vitamina no plasma	T1	T2	T2-T1	p-valor (T2 versus T1)	T3-T2	p-valor (T3 versus T2)
Beta Caroteno (µg/mL) (Vit A)	0,19 (n=110)	0,18 (n=110)	0,00	6,24x10 ⁻⁰¹	-0,02	6,16x10 ⁻⁰⁴
Retinol (µg/mL) (Vit A)*	0,34 (n=110)	0,32 (n=110)	-0,01	3,10x10 ⁻⁰²	-0,04	4,24x10 ⁻⁰³
Gama Tocoferol (µg/mL) (Vit E)*	0,81 (n=110)	0,54 (n=110)	-0,20	1,99x10 ⁻⁰⁸	0,12	3,50x10 ⁻⁰³
Alfa Tocoferol (µg/mL) (Vit E)*	5,81 (n=110)	6,25 (n=110)	0,15	2,22x10 ⁻⁰²	-1,52	2,72x10 ⁻¹¹
Ácido p-aminobenzoilglutâmico (Vit B9) (nmol/L)*	3,60 (n=53)	3,70 (n=81)	0,50	4,62x10 ⁻⁰²	-0,70	4,99x10 ⁻⁰³
Subclasse da Vitamina B6(nmol/L)*	51,25 (n=110)	104,35 (n=110)	55,35	8,86x10 ⁻¹⁷	-54,30	1,03x10 ⁻¹⁴
Piridoxal 5'-fosfato (Vit B6) (nmol/L)*	32,15 (n=76)	66,30 (n=97)	29,35	9,36x10 ⁻¹¹	-32,55	1,93x10 ⁻⁰⁸
Piridoxal (Vit B6) (nmol/L)*	7,30 (n=107)	12,60 (n=109)	5,30	2,14x10 ⁻¹⁷	-5,30	1,89x10 ⁻¹⁴
Ácido Pantotênico (Vit B5)*	215,5 (n=110)	360,5 (n=110)	140,00	3,14x10 ⁻¹⁹	-142,00	1,71x10 ⁻¹⁹
Subclasse da Vitamina B3(nmol/L)*	1321,0(n=110)	1642,0 (n=110)	276,50	5,78x10 ⁻⁰⁵	-234,00	5,20x10 ⁻⁰⁷
N1-metil-2-piridona-5-carboxamida (Vit B3) (nmol/L)*	924,0 (n=110)	1274,0 (n=110)	270,50	1,17x10 ⁻⁰⁵	-174,00	3,37x10 ⁻⁰⁶
Nicotinamida mononucleotídeo (Vit 3) (nmol/L)	383,5 (n=110)	372,5 (n=110)	-10,00	4,57x10 ⁻⁰¹	-22,00	5,05x10 ⁻⁰⁴
Subclasse da Vitamina B2(nmol/L)*	66,80 (n=110)	73,70 (n=110)	8,60	2,16x10 ⁻⁰³	-5,80	2,48x10 ⁻⁰³
Flavina Mononucleotídeo (Vit B2) (nmol/L)*	10,55 (n=100)	12,00 (n=105)	1,60	6,21x10 ⁻⁰⁴	-2,70	1,23x10 ⁻⁰⁷
Flavina Adenina Dinucleotídeo (Vit B2) (nmol/L)	45,40 (n=104)	43,80 (n=103)	-1,70	3,93x10 ⁻⁰¹	1,45	3,13x10 ⁻⁰¹
Riboflavina (Vit B2) (nmol/L)*	11,30 (n=100)	16,15 (n=110)	4,85	1,94x10 ⁻¹¹	-4,00	1,11x10 ⁻⁰⁹
Subclasse da Vitamina B1(nmol/L)*	11,00 (n=110)	17,80 (n=110)	5,85	1,57x10 ⁻¹¹	-6,80	1,22x10 ⁻¹¹
Tiamina Monofosfato (Vit B1) (nmol/L)*	8,50 (n=108)	11,75 (n=110)	3,45	4,74x10 ⁻⁰⁹	-3,05	6,57x10 ⁻⁰⁸
Tiamina (Vit B1) (nmol/L)*	3,40 (n=78)	4,50 (n=107)	1,60	7,67x10 ⁻⁰⁹	-1,60	4,80x10 ⁻⁰⁸
25-hidróxi-colecalciferol (25-OH-VitD3) nmol/L	63,70 (n=110)	63,60 (n=108)	-0,50	1,16x10 ⁻⁰¹	-5,20	1,04x10 ⁻⁰³
Vitamina B12 (pg/mL)*	375,0 (n=109)	428,0 (n=105)	33,00	4,46x10 ⁻⁰⁵	-56,00	6,66x10 ⁻⁰⁶
Folato (Vit B9) (ng/mL)*	4,86 (n=108)	6,75 (n=119)	1,75	1,02x10 ⁻⁰⁸	-1,21	9,24x10 ⁻⁰⁷

*Marcação para diferença estatisticamente significativa entre T1 e T2. T1 representa a mediana no momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa a mediana 6 semanas após suplementação. T3 representa 6 semanas após *washout*. T2-T1 representa a mediana da diferença entre T2 e T1. T3-T2 representa a mediana da diferença entre T3 e T2. Após o *washout* houve redução significativa de todas as vitaminas, exceto da flavina adenina dinucleotídeo em que não foi observada diferença estatística e o gama tocoferol que aumentou significativamente.

Figura 2 – Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2013.



Fonte: Elaboração própria.

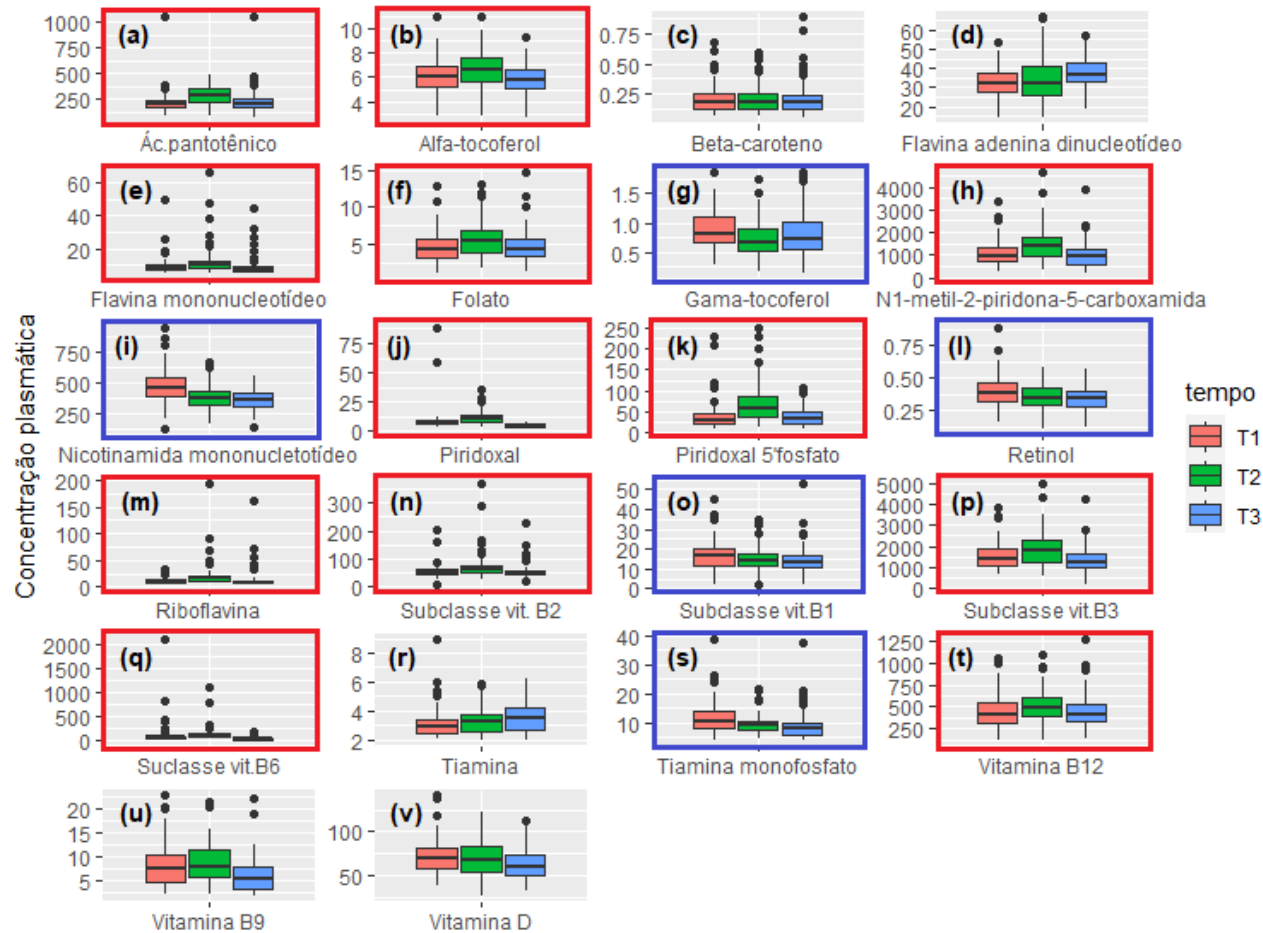
T1 representa o momento basal, T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais e T3 representa o momento após 6 semanas de *washout*. Subclasse representa o total de vitaminas (forma predominante e metabólitos). Contorno vermelho = marcação para aumento significativo no T2 $p < 0,05$. Contorno azul = marcação para redução significativa no T2 $p < 0,05$. Após o *washout* houve redução significativa de todas as vitaminas, exceto da (d) flavina adenina dinucleotídeo (vitamina B2) em que não foi observada diferença estatística e do (g) gama-tocoferol que aumentou significativamente.

Tabela 8 - Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2014.

Vitamina no plasma	T1	T2	T2-T1	p-valor (T2 versus T1)	T3-T2	p-valor (T3 versus T2)
Beta Caroteno ($\mu\text{g/mL}$) (Vit A)	0,18 (n=101)	0,18 (n=122)	0,01	$5,93 \times 10^{-01}$	0,00	$8,54 \times 10^{-01}$
Retinol ($\mu\text{g/mL}$) (Vit A)*	0,38 (n=106)	0,35 (n=122)	-0,04	$8,66 \times 10^{-04}$	-0,02	$1,09 \times 10^{-01}$
Gama Tocoferol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (Vit E)*	0,82 (n=107)	0,68 (n=122)	-0,18	$1,64 \times 10^{-06}$	0,06	$2,61 \times 10^{-02}$
Alfa Tocoferol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (Vit E)*	6,10 (n=107)	6,65 (n=122)	0,46	$3,04 \times 10^{-02}$	-0,64	$8,86 \times 10^{-06}$
Ácido p-aminobenzoilglutâmico (Vit B9) (nmol/L)	7,50 (n=106)	7,90 (n=122)	0,40	$3,56 \times 10^{-01}$	-2,90	$7,43 \times 10^{-08}$
Subclasse da Vitamina B6 (nmol/L)*	57,55 (n=106)	107,00 (n=122)	45,40	$3,84 \times 10^{-08}$	-81,40	$5,07 \times 10^{-18}$
Piridoxal 5'-fosfato (Vit B6) (nmol/L)*	32,00 (n=95)	57,80 (n=122)	25,30	$2,76 \times 10^{-08}$	-20,85	$1,67 \times 10^{-05}$
Piridoxal (Vit B6) (nmol/L)*	7,80 (n=106)	10,55 (n=122)	2,10	$1,42 \times 10^{-07}$	-5,00	$5,18 \times 10^{-19}$
Ácido Pantotênico (Vit B5)*	198,5 (n=106)	289,0 (n=122)	94,00	$8,93 \times 10^{-12}$	-86,00	$6,21 \times 10^{-12}$
Subclasse da Vitamina B3 (nmol/L)*	1423,0 (n=106)	1842,0 (n=122)	186,00	$2,42 \times 10^{-04}$	-354,00	$9,38 \times 10^{-12}$
N1-metil-2-piridona-5-carboxamida (Vit B3) (nmol/L)*	934,0 (n=106)	1424,0 (n=122)	274,00	$3,10 \times 10^{-07}$	-331,00	$5,33 \times 10^{-12}$
Nicotinamida Mononucleotídeo (Vit 3) (nmol/L)*	465,0 (n=106)	372,0 (n=122)	-77,00	$9,65 \times 10^{-07}$	-21,00	$3,60 \times 10^{-02}$
Subclasse da Vitamina B2 (nmol/L)*	51,10 (n=106)	61,85 (n=122)	9,70	$2,49 \times 10^{-06}$	-9,70	$3,52 \times 10^{-09}$
Flavina Mononucleotídeo (Vit B2) (nmol/L)*	7,50 (n=83)	10,00 (n=121)	2,25	$6,52 \times 10^{-07}$	-2,30	$2,30 \times 10^{-09}$
Flavina Adenina Dinucleotídeo (Vit B2) (nmol/L)	32,15 (n=104)	32,00 (n=122)	-0,70	$7,59 \times 10^{-01}$	4,20	$8,34 \times 10^{-03}$
Riboflavina (Vit B2) (nmol/L)*	10,90 (n=101)	16,25 (n=122)	5,10	$1,31 \times 10^{-09}$	-9,50	$2,41 \times 10^{-12}$
Subclasse da Vitamina B1 (nmol/L)*	16,25 (n=102)	13,90 (n=122)	-1,60	$3,56 \times 10^{-02}$	-1,50	$2,71 \times 10^{-02}$
Tiamina Monofosfato (Vit B1) (nmol/L)*	10,10 (n=101)	8,90 (n=122)	-1,10	$4,60 \times 10^{-03}$	-1,50	$1,41 \times 10^{-02}$
Tiamina (Vit B1) (nmol/L)	2,90 (n=80)	3,25 (n=119)	0,40	$5,34 \times 10^{-02}$	0,15	$2,70 \times 10^{-01}$
25-hidróxi-colecalciferol (25-OH-VitD3) nmol/L	69,50 (n=102)	66,55 (n=108)	-2,80	$1,70 \times 10^{-01}$	-7,70	$7,46 \times 10^{-05}$
Vitamina B12 (pg/mL)*	402,00 (n=99)	491,00 (n=105)	55,50	$7,29 \times 10^{-07}$	-58,00	$2,51 \times 10^{-05}$
Folato (Vit B9) (ng/mL)*	4,33 (n=100)	5,43 (n=107)	1,24	$1,11 \times 10^{-05}$	-0,83	$9,84 \times 10^{-05}$

*Marcação para diferença estatisticamente significativa entre T1 e T2. T1 representa a mediana no momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa a mediana 6 semanas após suplementação. T3 representa 6 semanas após *washout*. T2-T1 representa a mediana da diferença entre T2 e T1. T3-T2 representa a mediana da diferença entre T3 e T2. Após o *washout* a maioria das vitaminas reduziram significativamente com exceção da flavina adenina dinucleotídeo (vitamina B2) e do gama tocoferol que aumentaram significativamente e da tiamina, retinol e beta caroteno que não tiveram diferença estatística.

Figura 3 - Alterações de vitaminas no plasma de crianças suplementadas com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais que participaram do estudo no ano de 2014.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação com vitaminas e minerais e T3 representa após 6 semanas de *washout*. Subclasse representa o total de vitaminas (forma predominante e metabólitos). Contorno vermelho = marcação para aumento significativo $p < 0,05$ no T2. Contorno azul = marcação para redução significativa $p < 0,05$ no T2. Após o *washout* a maioria das vitaminas reduziram significativamente com exceção da (d) flavina adenina dinucleotídeo (vitamina B2) e do (g) gama-tocoferol que aumentaram significativamente e da (r) tiamina, (l) retinol e (c) beta-caroteno que não tiveram diferença estatística.

5.5 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS

O perfil dos AGs analisados no momento basal nas populações de 2013 e de 2014 está descrito na Tabela 9. Pode-se observar que dos 23 AGs analisados, 20 tinham valores estatisticamente diferentes entre as populações de 2013 e de 2014 no momento basal.

Em 2013, dos 23 AGs analisados, 12 aumentaram e 1 (heptadecenoico) reduziu significativamente depois da intervenção (Tabela 10). Em 2014, 12 AGs aumentaram e 3 reduziram significativamente depois da intervenção (Tabela 11). Dos AGs que tiveram alteração após a suplementação, 7 AGs aumentaram nos dois anos do estudo. São eles: vacênico (C18:1*trans*-11n-7), AO (C18:1n-9), AL (C18:2n-6), eicosenoico (C20:1n-9), eicosadienoico (C20:2n-6), DHGL (C20:3n-6) e ARA (C20:4n-6) (Tabelas 10 e 11). As Figuras 4 e 5 ilustram as variações no perfil dos ácidos graxos antes, após a intervenção e após o *washout*, nas populações de 2013 e de 2014. Um resumo esquemático das alterações observadas nos AGs está descrito na Tabela 12.

Sabe-se que 48 crianças que participaram do estudo em 2013, foram incluídas no estudo novamente em 2014. A Tabela 13 apresenta a análise longitudinal dos AGs para estas 48 crianças e adolescentes. Dos 23 AGs analisados, 11 foram estatisticamente diferentes, incluindo AO, AL, DHGL e ARA. Estas 48 crianças e adolescentes, submetidas ao mesmo protocolo de intervenção, apresentaram respostas metabólicas diferentes após um ano.

Considerando a reprodutibilidade dos resultados, houve um aumento significativo do AO nas duas populações (Tabela 12). A atividade da SCD1, enzima que atua na síntese de AGMIs, pode ser avaliada por meio dos índices oleico/esteárico (C18:1n9/C18:0) e palmitoleico/palmítico (C16:1n-7/C16:0) (PETER *et al.*, 2009). Foi observada uma redução na atividade da SCD1 na síntese do oleico e do palmitoleico na população de 2013, um aumento na síntese de oleico em 2014 (Tabela 12).

Houve um importante aumento nas concentrações de AL (42%) e de AAL (33%) em 2014 (Tabela 11), que contribuiu para o aumento de AGPIs de suas respectivas séries n-6 e n-3 na população (Tabela 12).

Tabela 9 - Ácidos graxos eritrocitários basais de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos que participaram do estudo em 2013 e 2014.

Ácido graxo (mg/mL)		População 2013 (n=110)			População 2014 (n=122)			Mann-Whitney
Representação química	Nomenclatura usual	Mediana	1° Qt	3° Qt	Mediana	1° Qt	3° Qt	p-valor
C14:0*	Mirístico	0,456	0,375	0,531	0,408	0,347	0,475	3,41x10 ⁻⁰³
C15:0*	Pentadecílico	0,182	0,163	0,204	0,218	0,197	0,240	1,10x10 ⁻¹¹
C16:0*	Palmitico	31,513	30,322	32,753	32,423	30,888	34,020	1,11x10 ⁻⁰³
C16:1n-7*	Palmitoleico	0,517	0,422	0,611	0,464	0,400	0,557	2,84x10 ⁻⁰²
C16:1n-7/C16:0*	Palmitoleico/Palmitico	0,016	0,014	0,020	0,014	0,012	0,017	9,27x10 ⁻⁰⁴
C17:0*	Margárico	0,478	0,438	0,533	0,543	0,494	0,617	1,22x10 ⁻⁰⁹
C17:1*	Heptadecenoico	0,883	0,765	0,969	0,696	0,586	0,807	2,59x10 ⁻¹³
C18:0*	Esteárico	25,391	24,527	26,354	26,234	25,038	27,544	1,75x10 ⁻⁰⁴
C18:1(<i>trans</i> -11)n-7	Vacênico	1,154	1,051	1,251	1,148	1,044	1,265	7,13x10 ⁻⁰¹
C18:1n-9/C16:1n-7*	Oleico/Palmitoleico	31,443	26,209	37,529	30,539	26,187	36,143	2,82x10 ⁻²³
C18:1n-9*	Oleico	15,919	15,099	17,205	14,418	13,487	15,769	4,42x10 ⁻¹¹
C18:1n-9/C18:0*	Oleico/Esteárico	0,633	0,600	0,682	0,550	0,511	0,586	8,92x10 ⁻²³
C18:1(<i>trans</i> -9)n-9*	Elaídico	0,836	0,735	0,945	1,022	0,881	1,150	5,83x10 ⁻¹¹
C18:2n-6*	Linoleico	18,225	16,921	20,026	11,831	9,564	13,114	3,52x10 ⁻³⁴
C18:3n-3*	Alfa-Linolênico	0,267	0,227	0,297	0,156	0,130	0,193	7,11x10 ⁻³¹
C18:2n-6/C18:3n-3*	Linoleico/Alfa-Linolênico	70,669	63,200	78,821	72,363	63,727	88,901	1,09x10 ⁻³⁵
C20:0	Araquídico	0,692	0,628	0,774	0,709	0,648	0,771	3,28x10 ⁻⁰¹
C20:1n-9	Eicosenoico	0,311	0,285	0,339	0,298	0,263	0,339	1,07x10 ⁻⁰¹
C20:2n-6*	Eicosadienoico	0,308	0,262	0,368	0,205	0,139	0,280	7,34x10 ⁻¹⁴
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	2,538	2,192	2,872	1,353	1,078	1,663	1,67x10 ⁻²⁹
C20:4n-6*	Araquidônico	23,577	21,998	25,464	10,930	8,721	13,942	4,92x10 ⁻³⁴
C20:4n-6/C18:2n-6*	Araquidônico/Linoleico	1,275	1,166	1,370	0,971	0,853	1,117	1,65x10 ⁻²³
C20:5n-3*	Eicosapentaenoico	0,525	0,442	0,616	0,265	0,201	0,324	1,57x10 ⁻³⁰
C20:4n-6/C20:5n-3*	Araquidônico/Eicosapentaenoico	46,331	39,067	52,030	42,749	34,490	51,776	6,02x10 ⁻³⁵
C22:6n-3/C20:4n-6*	Docosaenoico/ Araquidônico	16,444	14,242	19,885	14,879	12,012	18,629	8,06x10 ⁻⁰³
C22:0*	Docosanoico	3,412	3,187	3,662	3,157	2,994	3,387	1,07x10 ⁻⁰⁶

Tabela 9 - Ácidos graxos eritrocitários basais de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos que participaram do estudo em 2013 (n=110) e em 2014 (n=122).

(conclusão)								
C22:1n-9*	Erúcido	0,374	0,249	0,534	0,167	0,141	0,188	1,62x10 ⁻²⁸
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	5,531	4,612	6,576	2,175	1,700	2,938	4,61x10 ⁻³³
C22:6n-3/C18:3n-3*	Docosaexaenoico/ Alfa-Linolênico	20,879	17,855	25,519	14,806	10,867	18,030	3,95x10 ⁻¹³
C24:0*	Tetracosanoico	10,203	9,010	11,228	8,425	7,002	9,046	1,69x10 ⁻¹⁹
C24:1n-9*	Nervônico	7,570	6,147	8,373	5,566	5,018	6,180	1,73x10 ⁻¹⁷

*Marcação para diferença estatística com teste de Mann-Whitney (2013 *versus* 2014). Níveis de ácidos graxos nos eritrócitos dosados no momento basal, ou seja, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais.

Tabela 10 - Alteração no perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes em 2013.

Ácido graxo (mg/dL)		População de 2013 (n=110)					
Representação química	Nomenclatura usual	T2-T1	%variação	p-valor	T3-T2	% variação	p-valor
C14:0	Mirístico	-0,005	-1,276	3,35x10 ⁻⁰¹	-0,005	-1,104	4,17x10 ⁻⁰¹
C15:0	Pentadecílico	-0,002	-1,200	5,33x10 ⁻⁰¹	0,001	0,336	2,86x10 ⁻⁰¹
C16:0*	Palmítico	1,114	3,570	6,94x10 ⁻⁰⁶	-0,133	-0,455	8,68x10 ⁻⁰¹
C16:1n-7	Palmitoleico	-0,024	-4,500	1,86x10 ⁻⁰¹	-0,059	-15,156	5,52x10 ⁻⁰⁷
C16:1n-7 / C16:0*	Palmitoleico/Palmítico	-0,001	-6,907	5,94x10 ⁻⁰⁴	-0,002	-15,990	1,56x10 ⁻⁰⁷
C17:0*	Margárico	0,014	2,915	9,70x10 ⁻⁰⁵	0,005	1,004	3,68x10 ⁻⁰¹
C17:1*	Heptadecenoico	-0,090	-9,523	1,29x10 ⁻⁰²	0,147	19,392	1,92x10 ⁻⁰⁷
C18:0*	Estearico	1,186	4,773	2,57x10 ⁻¹⁰	-0,036	-0,131	4,04x10 ⁻⁰¹
C18:1(trans-11)n-7*	Vacênico	0,053	4,398	4,16x10 ⁻⁰³	0,062	5,138	1,30x10 ⁻⁰⁴
C18:1n-9*	Oleico	0,666	3,911	1,30x10 ⁻⁰⁵	-0,248	-1,521	1,80x10 ⁻⁰¹
C18:1n-9 / C18:0*	Oleico/Estearico	-0,009	-1,369	1,55x10 ⁻⁰³	-0,002	-0,315	6,21x10 ⁻⁰¹
C18:1n-9 / C16:1n-7*	Oleico/ Palmitoleico	2,171	6,518	7,67x10 ⁻⁰⁵	4,703	13,679	5,39x10 ⁻⁰⁵
C18:1(trans-9)n-9	Eláídico	0,014	1,913	1,56x10 ⁻⁰¹	0,068	8,560	8,90x10 ⁻⁰⁵
C18:2n-6*	Linoleico	0,334	1,742	2,10x10 ⁻⁰²	-0,132	-0,716	8,28x10 ⁻⁰¹
C18:3n-3	Alfa-Linolênico	-0,011	-4,639	5,11x10 ⁻⁰²	0,000	-0,085	9,41x10 ⁻⁰¹
C18:2n-6 / C18:3n-3*	Linoleico/ Alfa-Linolênico	5,390	7,292	2,57x10 ⁻⁰³	-0,806	-1,097	1,00x10 ⁺⁰⁰

Tabela 10 - Alteração no perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes em 2013. (conclusão)

C20:0*	Araquídico	0,033	4,881	1,53x10 ⁻⁰²	0,026	3,576	3,90x10 ⁻⁰²
C20:1n-9*	Eicosenoico	0,015	4,933	4,87x10 ⁻⁰³	0,002	0,508	3,94x10 ⁻⁰¹
C20:2n-6*	Eicosadienoico	0,077	23,397	2,13x10 ⁻⁰³	-0,225	-59,969	8,12x10 ⁻¹¹
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	0,076	2,968	9,83x10 ⁻⁰⁴	-0,069	-2,516	3,93x10 ⁻⁰³
C20:4n-6*	Araquidônico	1,316	5,851	2,32x10 ⁻⁰⁷	-0,776	-3,154	7,29x10 ⁻⁰⁵
C20:4n-6 / C18:2n-6*	Araquidônico/Linoleico	0,030	2,336	1,05x10 ⁻⁰³	-0,041	-3,222	7,52x10 ⁻⁰⁴
C20:5n-3	Eicosapentaenoico	-0,007	-1,260	4,89x10 ⁻⁰¹	-0,042	-8,032	1,30x10 ⁻⁰⁷
C20:4n-6 / C20:5n-3*	Araquidônico/Eicosapentaenoico	1,690	4,835	2,97x10 ⁻⁰²	2,314	4,183	1,17x10 ⁻⁰⁴
C22:0	Docosanoico	-0,052	-1,576	8,16x10 ⁻⁰¹	0,146	4,366	1,40x10 ⁻⁰³
C22:1n-9*	Erúcico	0,125	34,541	5,44x10 ⁻⁰³	-0,022	-5,245	9,85x10 ⁻⁰²
C22:6n-3	Docosaexaenoico	0,213	3,898	8,05x10 ⁻⁰²	-0,861	-14,666	2,12x10 ⁻¹²
C22:6n-3 / C18:3n-3*	Docosaexaenoico/Alfa-Linolênico	1,863	10,014	2,75x10 ⁻⁰³	-3,108	-13,786	2,53x10 ⁻⁰⁶
C22:6n-3 / C20:4n-6	Docosaexaenoico/Araquidônico	-0,004	-1,145	8,58x10 ⁻⁰¹	-0,030	-12,579	3,10x10 ⁻¹¹
C24:0	Tetracosanoico	-0,220	-2,128	7,95x10 ⁻⁰²	-0,224	-2,331	1,58x10 ⁻⁰⁴
C24:1n-9	Nervônico	-0,313	-4,019	6,36x10 ⁻⁰²	-0,519	-7,843	1,61x10 ⁻⁰⁵

*Marcação para diferença estatística entre T2 e T1 (antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais) no teste pareado de Wilcoxon. Marcação em negrito representa a reprodutibilidade dos resultados, ou seja, quando a resposta foi similar nos anos de 2013 e 2014. T1 representa o momento basal, antes da suplementação. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T3 representa o momento após 6 semanas de *washout*. T2-T1 representa a mediana da diferença entre antes e após a suplementação. T3-T2 representa a mediana da diferença entre o *washout* e após 6 semanas de suplementação. Aumentaram significativamente no *washout* heptadecenoico, vacênico, elaídico, araquídico e docosanoico. Reduziram significativamente no *washout* palmitoleico, eicosadienoico, dihomogama-linolênico, araquidônico, eicosapentaenoico, docosaexaenoico, tetracosanoico e nervônico. As razões entre os ácidos graxos refletem a atividade enzimática e/ou suas proporções no sangue.

Tabela 11 - Alteração no perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes em 2014.

Ácido graxo (mg/mL)		População de 2014 (n=122)					
Representação química	Nomenclatura usual	T2-T1	%variação	p-valor	T3-T2	% variação	p-valor
C14:0	Mirístico	-0,015	-3,598	2,86x10 ⁻⁰¹	0,016	3,257	6,09x10 ⁻⁰¹
C15:0*	Pentadecílico	-0,018	-7,888	2,28x10 ⁻⁰³	0,008	4,380	1,39x10 ⁻⁰¹
C16:0	Palmítico	-0,322	-0,972	1,66x10 ⁻⁰¹	0,181	0,556	9,67x10 ⁻⁰¹
C16:1n-7	Palmitoleico	-0,003	-0,536	7,36x10 ⁻⁰¹	0,010	2,008	6,33x10 ⁻⁰¹
C16:1n-7 / C16:0	Palmitoleico/Palmítico	0,000	0,350	4,95x10 ⁻⁰¹	0,000	0,140	7,71x10 ⁻⁰¹
C17:0*	Margárico	-0,034	-6,596	2,53x10 ⁻⁰³	0,016	2,966	4,63x10 ⁻⁰²
C17:1*	Heptadecenoico	0,240	34,273	2,42x10 ⁻¹⁶	-0,038	-4,005	5,28x10 ⁻⁰¹
C18:0	Esteárico	0,251	0,960	1,25x10 ⁻⁰¹	-0,169	-0,646	6,85x10 ⁻⁰²
C18:1(trans-11)n-7*	Vacênico	0,064	5,754	2,46x10 ⁻⁰³	0,023	1,788	1,69x10 ⁻⁰²
C18:1n-9*	Oleico	1,730	11,607	4,21x10 ⁻¹³	-0,604	-3,937	6,66x10 ⁻⁰⁴
C18:1n-9 / C18:0*	Oleico/Esteárico	0,058	10,637	5,39x10 ⁻¹⁷	-0,015	-2,398	6,06x10 ⁻⁰⁴
C18:1n-9 / C16:1n-7*	Oleico/ Palmitoleico	3,498	11,901	3,82x10 ⁻⁰⁹	-1,232	-3,706	1,14x10 ⁻⁰²
C18:1(trans-9)n-9*	Elaídico	-0,073	-6,544	3,94x10 ⁻⁰⁵	0,039	3,568	9,09x10 ⁻⁰³
C18:2n-6*	Linoleico	4,893	42,157	2,84x10 ⁻¹⁸	-0,363	-2,310	2,75x10 ⁻⁰¹
C18:3n-3*	Alfa-Linolênico	0,050	32,617	1,17x10 ⁻¹³	0,001	0,687	8,52x10 ⁻⁰¹
C18:2n-6 / C18:3n-3	Linoleico/ Alfa-Linolênico	4,685	5,935	1,92x10 ⁻⁰¹	-0,415	-0,694	4,81x10 ⁻⁰¹
C20:0	Araquídico	0,006	0,803	2,26x10 ⁻⁰¹	0,014	1,951	1,38x10 ⁻⁰¹
C20:1n-9*	Eicosenoico	0,014	4,454	1,90x10 ⁻⁰²	0,005	1,582	3,02x10 ⁻⁰¹
C20:2n-6*	Eicosadienoico	0,069	27,912	1,90x10 ⁻⁰²	0,020	6,693	2,48x10 ⁻⁰¹
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	0,773	53,388	4,12x10 ⁻¹⁶	-0,014	-0,347	6,09x10 ⁻⁰¹
C20:4n-6*	Araquidônico	8,762	73,487	6,52x10 ⁻¹⁸	0,091	0,459	5,64x10 ⁻⁰¹
C20:4n-6 / C18:2n-6*	Araquidônico/Linoleico	0,212	22,791	8,06x10 ⁻¹⁶	0,008	0,663	9,92x10 ⁻⁰¹
C20:5n-3*	Eicosapentaenoico	0,161	62,580	6,05x10 ⁻¹⁵	-0,016	-4,147	3,55x10 ⁻⁰¹
C20:4n-6 / C20:5n-3*	Araquidônico/Eicosapentaenoico	3,333	7,638	8,95x10 ⁻⁰⁴	0,098	0,162	9,53x10 ⁻⁰¹
C22:0	Docosanoico	-0,042	-1,331	1,91x10 ⁻⁰¹	0,074	2,269	1,15x10 ⁻⁰⁴

Tabela 11 - Alteração no perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes em 2014. (conclusão)

C22:1n-9	Erúico	0,002	1,291	$5,35 \times 10^{-01}$	0,003	1,805	$7,51 \times 10^{-01}$
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	1,886	82,794	$1,44 \times 10^{-15}$	-0,326	-6,271	$9,83 \times 10^{-02}$
C22:6n-3 / C18:3n-3*	Docosaexaenoico/Alfa-Linolênico	3,768	29,809	$5,12 \times 10^{-08}$	-0,437	-2,407	$1,16 \times 10^{-01}$
C22:6n-3 / C20:4n-6	Docosaexaenoico/Araquidônico	0,003	1,246	$1,86 \times 10^{-01}$	-0,005	-2,225	$5,50 \times 10^{-02}$
C24:0	Tetracosanoico	-0,003	-0,016	$2,47 \times 10^{-01}$	-0,001	0,005	$9,10 \times 10^{-01}$
C24:1n-9*	Nervônico	0,346	7,171	$2,62 \times 10^{-02}$	0,161	2,784	$4,14 \times 10^{-01}$

*Marcação para diferença estatística entre T2 e T1 (antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais) no teste pareado de Wilcoxon. Marcação em negrito representa a reprodutibilidade dos resultados, ou seja, quando a resposta foi similar nos dois anos do estudo. T1 representa o momento basal, antes da suplementação. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T3 representa o momento após 6 semanas de *washout*. T2-T1 representa a mediana da diferença entre antes e após a suplementação. T3-T2 representa a mediana da diferença entre o *washout* e após 6 semanas de suplementação. Aumentaram significativamente no *washout* o margárico, vacênico, elaídico e docosanoico. O oleico reduziu significativamente no *washout*. Para o ácido graxo eicosadienoico (C20:2n-6) foram excluídos dados nulos, restando 65 observações em 2014. As razões entre os ácidos graxos refletem a atividade enzimática e/ou suas proporções no sangue.

Tabela 12 - Visão geral das alterações nos ácidos graxos eritrocitários de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade, submetidas à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais, que participaram do estudo nos anos de 2013 e 2014.

	Efeito da suplementação em 2013			Efeito da suplementação em 2014		
	Aumento ^e	Redução ^e	Sem alteração	Aumento	Redução	Sem alteração
AGS ^a	-	-	Mirístico	-	-	Mirístico
	-	-	Pentadecílico	-	Pentadecílico	-
	Palmítico	-	-	-	-	Palmítico
	Margárico	-	-	-	Margárico	-
	Estearíco	-	-	-	-	Estearíco
	Araquídico	-	-	-	-	Araquídico
	-	-	Docosanoico	-	-	Docosanoico
-	-	Tetracosanoico	-	-	Tetracosanoico	
AGMI ^b	-	-	Palmitoleico	-	-	Palmitoleico
	-	Palmitoleico/Palmítico	-	-	Palmitoleico/Palmítico	-
	-	Heptadecenoico	-	Heptadecenoico	-	-
	Oleico	-	-	Oleico	-	-
	-	Oleico / Estearíco	-	Oleico / Estearíco	-	-
	Eicosenoico	-	-	Eicosenoico	-	-
	Erúcido	-	-	-	-	Erúcido
-	-	Nervônico	Nervônico	-	-	
AG ^{trans} ^c	Vacênico	-	-	Vacênico	-	-
	-	-	Elaídico	-	Elaídico	-
AGPI ^d	Linoleico	-	-	Linoleico	-	-
	-	-	α -Linolênico	α -Linolênico	-	-
	AL ^f /AAL ^g	-	-	-	-	AL/AAL
	Eicosadienoico	-	-	Eicosadienoico	-	-
	Dihomo-γ-linolênico	-	-	Dihomo-γ-linolênico	-	-
	Araquidônico	-	-	Araquidônico	-	-
	-	-	Eicosapentaenoico	Eicosapentaenoico	-	-
	-	-	Docosaenoico	Docosaenoico	-	-
	ARA^h / EPAⁱ	-	-	ARA / EPA	-	-
	-	-	DHA / ARA	-	-	DHA / ARA
ARA / AL	-	-	ARA / AL	-	-	
DHA^j / AAL	-	-	DHA / AAL	-	-	

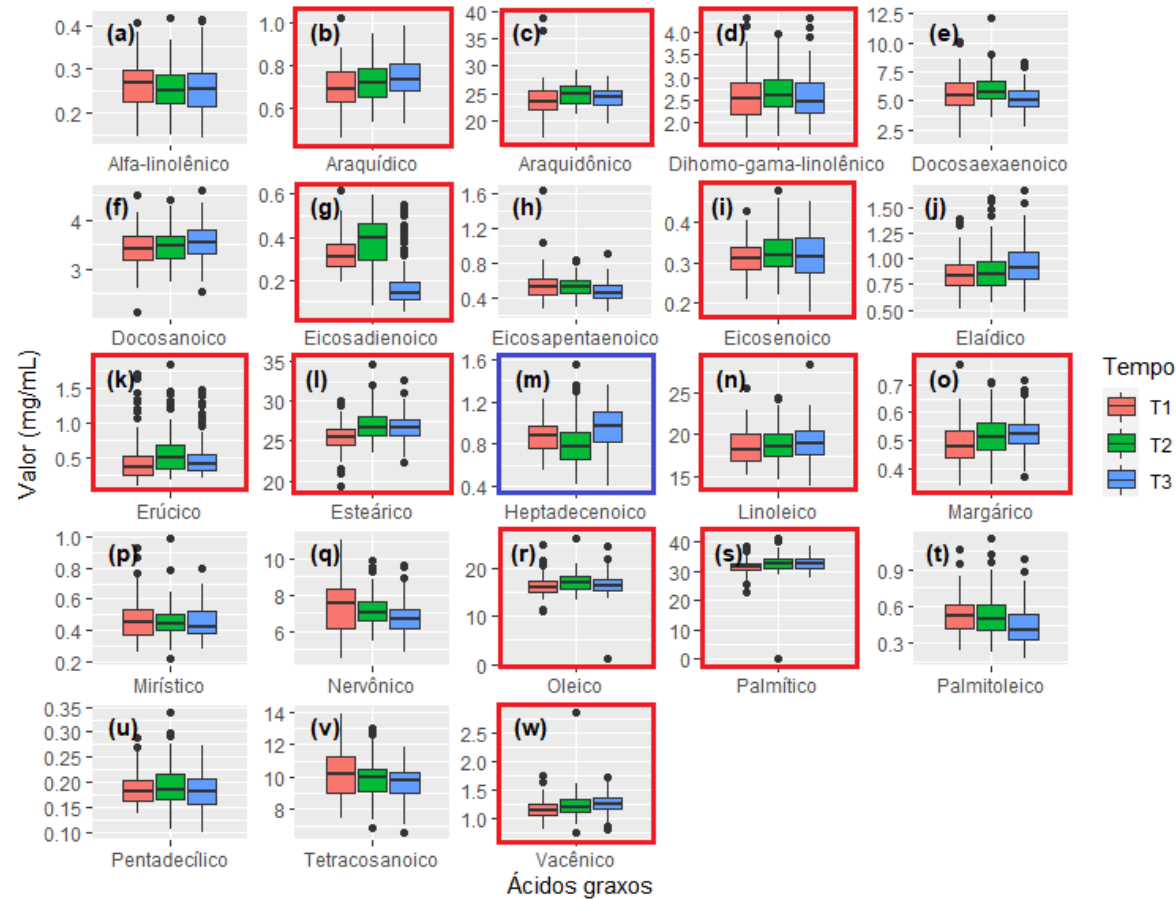
^aAGS=Ácido graxo saturado. ^bAGMI=Ácido graxo monoinsaturado. ^cAG^{trans}=Ácido graxo *trans*. ^dAGPI=Ácido graxo poli-insaturado. ^e $p < 0,05$ no teste pareado de Wilcoxon
^fAL=Ácido graxo linoleico. ^gAAL=Ácido graxo α -linolênico. ^hARA=Ácido graxo araquidônico. ⁱEPA=Ácido graxo eicosapentaenoico. ^jDHA=Ácido graxo docosaenoico.
 Ácidos graxos em negrito representam a reprodutibilidade dos resultados nos dois anos do estudo, ou seja, quando o resultado observado em 2013 e 2014 foi similar.

Tabela 13 – Análise longitudinal do perfil de ácidos graxos nos eritrócitos de 48 crianças e adolescentes que participaram do estudo em ambos os anos de 2013 e 2014.

Ácido graxo (mg/mL)		2013	2014	Wilcoxon pareado		
Representação química	Nomenclatura usual	T2-T1	T2-T1	95%IC		p-valor
C14:0	Mirístico	0,00	-0,02	-0,05	0,04	9,39x10 ⁻⁰¹
C15:0	Pentadecílico	-0,02	0,00	-0,04	0,00	1,23x10 ⁻⁰¹
C16:0*	Palmítico	-0,68	0,74	-2,54	-0,35	1,06x10 ⁻⁰²
C16:1n-7	Palmitoleico	-0,01	-0,02	-0,04	0,04	8,99x10 ⁻⁰¹
C17:0*	Margárico	-0,06	0,01	-0,11	-0,03	6,99x10 ⁻⁰⁴
C17:1*	Heptadecenoico	0,16	-0,10	0,15	0,40	1,15x10 ⁻⁰⁴
C18:0*	Estearico	-0,27	0,90	-1,94	-0,20	1,35x10 ⁻⁰²
C18:1(<i>trans</i> -11)n-7	Vacênico	0,04	0,02	-0,06	0,09	7,57x10 ⁻⁰¹
C18:1n-9*	Oleico	1,36	0,28	0,19	1,42	1,35x10 ⁻⁰²
C18:1(<i>trans</i> -9)n-9	Elaídico	-0,06	0,00	-0,11	0,02	1,66x10 ⁻⁰¹
C18:2n-6*	Linoleico	4,50	0,22	2,67	4,99	3,25x10 ⁻⁰⁸
C18:3n-3*	Alfa-Linolênico	0,04	-0,01	0,03	0,08	4,90x10 ⁻⁰⁵
C20:0	Araquídico	0,00	0,02	-0,04	0,04	8,67x10 ⁻⁰¹
C20:1n-9	Eicosenoico	0,02	0,02	-0,04	0,02	6,58x10 ⁻⁰¹
C20:2n-6	Eicosadienoico	0,04	0,07	-0,07	0,10	7,18x10 ⁻⁰¹
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	0,68	0,07	0,28	0,71	2,88x10 ⁻⁰⁵
C20:4n-6*	Araquidônico	9,63	1,65	4,21	8,51	8,26x10 ⁻⁰⁷
C20:5n-3*	Eicosapentaenoico	0,14	0,03	0,07	0,20	6,02x10 ⁻⁰⁵
C22:0	Docosanoico	-0,08	-0,08	-0,14	0,11	7,33x10 ⁻⁰¹
C22:1n-9	Erúico	0,01	0,08	-0,17	0,09	4,07x10 ⁻⁰¹
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	2,24	0,54	0,72	2,24	2,34x10 ⁻⁰⁴
C24:0	Tetracosanoico	0,28	0,10	-0,47	1,62	2,91x10 ⁻⁰¹
C24:1n-9	Nervônico	0,47	0,15	-0,20	1,18	1,51x10 ⁻⁰¹

*Marcação para diferença estatística (teste pareado de Wilcoxon). T2-T1 representa a mediana da diferença entre os momentos antes e após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. 95%IC = intervalo de confiança de 95%.

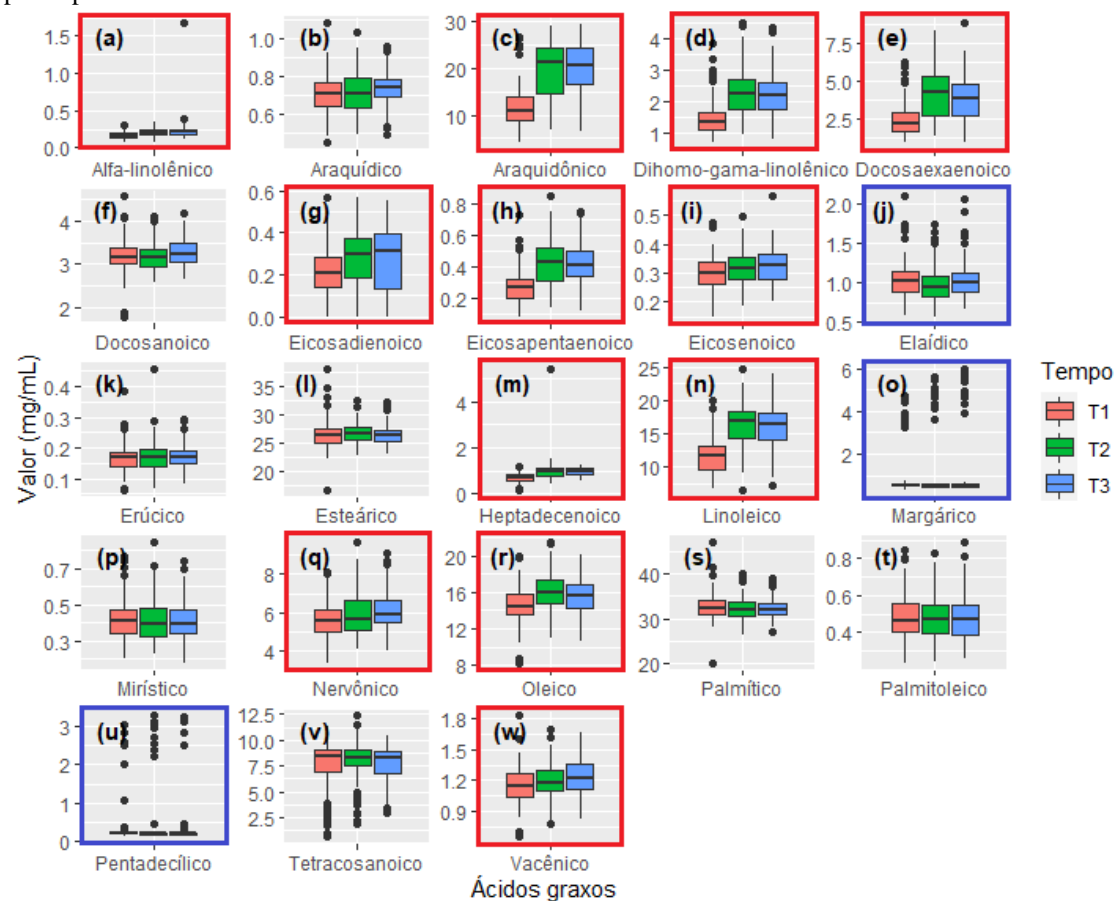
Figura 4 – Alterações dos ácidos graxos nos eritrócitos de 110 crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes que participaram do estudo no ano de 2013.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T3 representa o momento após 6 semanas de *washout*. Contorno vermelho representa aumento significativo no T2 $p < 0,05$. Contorno azul representa redução significativa no T2 $p < 0,05$. 12 ácidos graxos aumentaram no T2: (b) Araquídico, (c) Araquidônico, (d) Dihomo-gama-linolênico, (g) Eicosadienoico, (l) Eicosenoico, (k) Erúcido, (l) Esteárico, (n) Linoleico, (o) Margárico, (r) Oleico, (s) Palmítico, (w) Vacênico. Apenas o (m) Heptadecenoico teve redução significativa no T2. Reduziram significativamente no *washout*: (t) Palmitoleico, (g) Eicosadienoico, (d) Dihomo-gama-linolênico, (c) Araquidônico, (h) Eicosapentaenoico, (e) Docosaexaenoico, (v) Tetracosanoico, (q) Nervônico. Aumentaram significativamente no *washout* (m) Heptadecenoico, (w) Vacênico, (j) Elaídico, (b) Araquídico e (f) Docosanoico.

Figura 5 – Alterações dos ácidos graxos nos eritrócitos de 122 crianças de 9 a 13 anos de idade suplementadas com barra de leite enriquecida com micronutrientes que participaram do estudo no ano de 2014.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T3 representa o momento após 6 semanas de *washout*. Contorno vermelho representa aumento significativo no T2 $p < 0,05$. Contorno azul representa redução significativa no T2 $p < 0,05$. 12 ácidos graxos aumentaram no T2: (a) Alfa-linolênico, (c) Araquidônico, (d) Dihomo-gama-linolênico, (e) Docosaexaenoico, (g) Eicosadienoico, (h) Eicosapentaenoico, (i) Eicosenoico, (m) Heptadecenoico, (n) Linoleico, (q) Nervônico, (r) Oleico, (w) Vacênico. Reduziram no T2: (j) Elaídico, (o) Margárico, (u) Pentadecílico. Aumentaram no *washout* (o) Margárico, (w) Vacênico, (j) Elaídico, (f) Docosanoico. O (r) Oleico reduziu no *washout*.

5.6 REPRODUTIBILIDADE DA RESPOSTA À SUPLEMENTAÇÃO

Os AGs AO, AL, DHGL, ARA e o DHA, tiveram respostas estatisticamente significativas após a intervenção nas populações em 2013 e 2014 (Tabela 14). Levando em consideração o efeito dos AGs essenciais nos resultados, foi realizada a análise agrupada de acordo com os níveis de AGs essenciais, utilizando-se as medianas encontradas no T2. O aumento dos AGs AO, DHGL, ARA e DHA permaneceram estatisticamente significativos em todas as análises agrupadas (Tabelas 15 a 18). Este resultado demonstra que os AGs AO, DHGL, ARA e DHA aumentaram independentemente dos níveis de AGs essenciais e este aumento pode ser atribuído à intervenção.

Tabela 14 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade que participaram do estudo nos anos de 2013 e de 2014.

Ácido graxo eritrocitário (mg/mL)		Intervenção em 2013		Intervenção em 2014	
Representação química	Nomenclatura usual	p-valor	Efeito (mg/mL)	p-valor	Efeito (mg/mL)
C14:0	Mirístico	8,05x10 ⁻⁰¹	-0,008	8,39x10 ⁻⁰¹	-0,009
C15:0	Pentadecílico	1,24x10 ⁻⁰¹	0,004	1,33x10 ⁻⁰¹	0,070
C16:0	Palmitico	7,29x10 ⁻⁰⁵	0,907	8,98x10 ⁻⁰¹	-0,242
C16:1n-7	Palmitoleico	4,04x10 ⁻⁰¹	0,003	5,55x10 ⁻⁰¹	-0,001
C17:0	Margárico	2,86x10 ⁻⁰⁴	0,019	3,17x10 ⁻⁰¹	0,061
C17:1n-7	Heptadecenoico	1,00x10 ⁺⁰⁰	-0,087	8,40x10 ⁻⁰⁴	0,167
C18:0	Esteárico	3,92x10 ⁻⁰⁸	1,133	6,39x10 ⁻⁰²	0,228
C18:1(<i>trans</i> -9)n-9	Elaídico	5,62x10 ⁻⁰²	0,034	4,75x10 ⁻⁰²	0,022
C18:1n-9*	Oleico	5,98x10 ⁻⁰⁷	0,702	1,58x10 ⁻¹³	1,386
C18:1(<i>trans</i> -11)n-7	Vacênico	3,52x10 ⁻⁰¹	0,007	1,00x10 ⁺⁰⁰	-0,058
C18:2n-6*	Linoleico	3,82x10 ⁻⁰²	0,329	6,13x10 ⁻¹⁴	3,047
C18:3n-3	Alfa-Linolênico	9,45x10 ⁻⁰¹	-0,007	8,06x10 ⁻⁰⁷	0,030
C20:0	Araquídico	1,06x10 ⁻⁰¹	0,010	2,50x10 ⁻⁰¹	0,006
C20:1n-9	Eicosenoico	2,34x10 ⁻⁰³	0,014	9,17x10 ⁻⁰²	0,008
C20:2n-6	Eicosadienoico	3,72x10 ⁻⁰⁷	0,093	2,04x10 ⁻⁰¹	0,012
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	8,62x10 ⁻⁰⁵	0,092	8,38x10 ⁻¹²	0,564
C20:4n-6*	Araquidônico	2,07x10 ⁻⁰⁷	0,969	3,05x10 ⁻¹²	4,958
C22:0	Docosanoico	5,20x10 ⁻⁰¹	-0,001	9,80x10 ⁻⁰¹	-0,048
C22:1n-9	Erúcido	3,57x10 ⁻⁰³	0,086	2,35x10 ⁻⁰¹	0,003
C20:5n-3	Eicosapentaenoico	2,50x10 ⁻⁰¹	0,007	3,72x10 ⁻⁰⁹	0,097
C24:0	Tetracosanoico	6,10x10 ⁻⁰¹	-0,026	4,87x10 ⁻⁰²	0,298
C24:1n-9	Nervônico	5,10x10 ⁻⁰¹	-0,002	5,78x10 ⁻⁰²	0,163
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	5,54x10 ⁻⁰⁵	0,433	3,04x10 ⁻¹¹	1,231

*Marcação para diferença estatística da análise de regressão para a média. Marcação em negrito representa a reprodutibilidade dos resultados, ou seja, quando a resposta foi similar nos dois anos do estudo.

Tabela 15 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2013, agrupadas por níveis de ácido graxo linoleico.

Ácido graxo eritrocitário (mg/dL)		Linoleico ≥ 19 mg/dL		Linoleico < 19 mg/dL	
Representação química	Nomenclatura usual	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito
C14:0	Mirístico	$4,84 \times 10^{-01}$	0,001	$8,49 \times 10^{-01}$	-0,013
C15:0	Pentadecílico	$3,31 \times 10^{-02}$	0,010	$4,52 \times 10^{-01}$	0,001
C16:0*	Palmítico	$1,54 \times 10^{-01}$	0,890	$1,81 \times 10^{-02}$	0,497
C16:1n-7	Palmitoleico	$1,88 \times 10^{-01}$	0,017	$6,69 \times 10^{-01}$	-0,007
C17:0*	Margárico	$3,06 \times 10^{-03}$	0,028	$2,43 \times 10^{-02}$	0,012
C17:1	Heptadecenoico	$1,00 \times 10^{+00}$	-0,108	$9,88 \times 10^{-01}$	-0,072
C18:0*	Esteárico	$7,99 \times 10^{-06}$	1,718	$1,25 \times 10^{-04}$	0,757
C18:1n-9*	Oleico	$5,88 \times 10^{-07}$	1,227	$8,21 \times 10^{-03}$	0,380
C18:1(trans-11)n-7	Vacênico	$7,71 \times 10^{-03}$	0,053	$2,31 \times 10^{-01}$	0,025
C18:1(trans-9)n-9	Elaídico	$2,91 \times 10^{-02}$	0,055	$8,76 \times 10^{-01}$	-0,026
C18:2n-6	Linoleico	$5,54 \times 10^{-05}$	1,020	$9,67 \times 10^{-01}$	-0,226
C18:3n-3	Alfa-Linolênico	$3,82 \times 10^{-01}$	0,002	$9,98 \times 10^{-01}$	-0,015
C20:0	Araquídico	$3,57 \times 10^{-01}$	0,005	$7,04 \times 10^{-02}$	0,015
C20:1n-9	Eicosenoico	$9,34 \times 10^{-04}$	0,025	$2,01 \times 10^{-01}$	0,005
C20:2n-6*	Eicosadienoico	$3,68 \times 10^{-05}$	0,123	$1,31 \times 10^{-04}$	0,085
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	$8,95 \times 10^{-04}$	0,134	$1,03 \times 10^{-02}$	0,065
C20:4n-6*	Araquidônico	$3,74 \times 10^{-07}$	1,545	$2,78 \times 10^{-03}$	0,664
C22:0	Docosanoico	$1,15 \times 10^{-01}$	0,051	$8,31 \times 10^{-01}$	-0,032
C22:1n-9	Erúcido	$7,12 \times 10^{-03}$	0,129	$6,74 \times 10^{-02}$	0,060
C20:5n-3	Eicosapentaenoico	$2,42 \times 10^{-01}$	0,011	$4,81 \times 10^{-01}$	0,001
C24:0	Tetracosanoico	$2,45 \times 10^{-01}$	0,085	$7,53 \times 10^{-01}$	-0,091
C24:1n-9	Nervônico	$3,59 \times 10^{-01}$	0,047	$6,25 \times 10^{-01}$	-0,033
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	$5,89 \times 10^{-03}$	0,469	$9,54 \times 10^{-04}$	0,424

*Marcação para diferença estatística da análise de regressão para a média

Tabela 16 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2014, agrupadas por níveis de ácido graxo linoleico.

Ácido graxo eritrocitário (mg/dL)		Linoleico ≥ 17 mg/dL		Linoleico < 17 mg/dL	
Representação química	Nomenclatura usual	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito
C14:0	Mirístico	$5,04 \times 10^{-01}$	0,000	$9,03 \times 10^{-01}$	-0,016
C15:0	Pentadecílico	$8,38 \times 10^{-01}$	-0,051	$5,82 \times 10^{-02}$	0,175
C16:0	Palmítico	$1,09 \times 10^{-01}$	0,322	$9,98 \times 10^{-01}$	-0,718
C16:1n-7	Palmitoleico	$2,07 \times 10^{-01}$	0,009	$7,84 \times 10^{-01}$	-0,009
C17:0	Margárico	$3,95 \times 10^{-01}$	0,050	$3,35 \times 10^{-01}$	0,075
C17:1*	Heptadecenoico	$1,05 \times 10^{-05}$	0,184	$4,45 \times 10^{-02}$	0,153
C18:0	Esteárico	$4,28 \times 10^{-04}$	0,751	$8,78 \times 10^{-01}$	-0,194
C18:1n-9*	Oleico	$3,79 \times 10^{-14}$	2,278	$7,33 \times 10^{-04}$	0,713
C18:1(trans-11)n-7	Vacênico	$1,39 \times 10^{-05}$	0,077	$8,85 \times 10^{-01}$	-0,022
C18:1(trans-9)n-9	Elaídico	$9,53 \times 10^{-01}$	-0,034	$1,00 \times 10^{+00}$	-0,079
C18:2n-6*	Linoleico	$2,50 \times 10^{-18}$	4,357	$1,01 \times 10^{-04}$	1,281

Tabela 16 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2014, agrupadas por níveis de ácido graxo linoleico.

(conclusão)					
C18:3n-3*	Alfa-Linolênico	7,19x10 ⁻⁰⁵	0,041	2,54x10 ⁻⁰³	0,017
C20:0	Araquidônico	2,58x10 ⁻⁰¹	0,008	3,35x10 ⁻⁰¹	0,005
C20:1n-9	Eicosenoico	4,60x10 ⁻⁰⁴	0,028	8,90x10 ⁻⁰¹	-0,009
C20:2n-6	Eicosadienoico	6,33x10 ⁻⁰³	0,110	9,96x10 ⁻⁰¹	-0,038
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	9,05x10 ⁻¹²	0,861	6,62x10 ⁻⁰⁴	0,300
C20:4n-6*	Araquidônico	1,80x10 ⁻¹⁷	7,471	8,07x10 ⁻⁰⁴	2,615
C22:0	Docosanoico	1,98x10 ⁻⁰¹	0,026	1,00x10 ⁺⁰⁰	-0,108
C22:1n-9	Erúcido	1,26x10 ⁻⁰²	0,017	9,44x10 ⁻⁰¹	-0,008
C20:5n-3*	Eicosapentaenoico	3,58x10 ⁻¹⁰	0,166	2,49x10 ⁻⁰²	0,037
C24:0	Tetracosanoico	3,33x10 ⁻⁰⁴	0,765	6,56x10 ⁻⁰¹	-0,109
C24:1n-9	Nervônico	5,23x10 ⁻⁰⁶	0,691	9,85x10 ⁻⁰¹	-0,264
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	2,43x10 ⁻¹⁵	2,065	6,83x10 ⁻⁰³	0,576

*Marcação para diferença estatística da análise de regressão para a média.

Tabela 17 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2013, agrupadas por níveis de ácido graxo alfa-linolênico.

Ácido graxo eritrocitário (mg/dL)		ALA ≥ 0,25 mg/dL		ALA < 0,25 mg/dL	
Representação química	Nomenclatura usual	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito
C14:0	Mirístico	4,16x10 ⁻⁰¹	0,003	9,98x10 ⁻⁰¹	-0,022
C15:0	Pentadecílico	3,89x10 ⁻⁰³	0,015	7,68x10 ⁻⁰²	0,077
C16:0	Palmítico	1,03x10 ⁻⁰¹	0,920	8,33x10 ⁻⁰¹	-0,152
C16:1n-7	Palmitoleico	4,69x10 ⁻⁰²	0,033	9,30x10 ⁻⁰¹	-0,011
C17:0	Margárico	1,76x10 ⁻⁰³	0,027	2,02x10 ⁻⁰¹	0,088
C17:1	Heptadecenoico	9,38x10 ⁻⁰¹	-0,051	2,24x10 ⁻⁰¹	0,031
C18:0*	Esteárico	5,85x10 ⁻⁰⁷	1,673	1,75x10 ⁻⁰²	0,257
C18:1n-9*	Oleico	2,15x10 ⁻⁰⁶	1,014	2,85x10 ⁻¹⁰	0,899
C18:1(<i>trans</i> -11)n-7	Vacênico	5,82x10 ⁻⁰²	0,058	2,63x10 ⁻⁰¹	0,007
C18:1(<i>trans</i> -9)n-9	Elaídico	3,66x10 ⁻⁰²	0,048	1,00x10 ⁺⁰⁰	-0,046
C18:2n-6*	Linoleico	5,89x10 ⁻⁰³	0,715	7,59x10 ⁻¹³	1,673
C18:3n-3	Alfa-Linolênico	4,10x10 ⁻⁰⁴	0,017	9,38x10 ⁻⁰¹	-0,004
C20:0	Araquídico	1,42x10 ⁻⁰¹	0,012	1,95x10 ⁻⁰¹	0,006
C20:1n-9	Eicosenoico	2,31x10 ⁻⁰²	0,013	1,41x10 ⁻⁰¹	0,005
C20:2n-6*	Eicosadienoico	1,93x10 ⁻⁰⁷	0,137	3,08x10 ⁻⁰³	0,034
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	3,66x10 ⁻⁰⁴	0,126	2,15x10 ⁻¹⁰	0,323
C20:4n-6*	Araquidônico	9,75x10 ⁻⁰⁸	1,396	1,72x10 ⁻¹³	3,186
C22:0	Docosanoico	8,64x10 ⁻⁰²	0,057	9,98x10 ⁻⁰¹	-0,062
C22:1n-9	Erúcido	1,63x10 ⁻⁰¹	0,044	1,09x10 ⁻⁰²	0,054
C20:5n-3*	Eicosapentaenoico	3,11x10 ⁻⁰²	0,026	1,07x10 ⁻⁰⁴	0,039
C24:0	Tetracosanoico	5,02x10 ⁻⁰¹	-0,001	4,80x10 ⁻⁰¹	0,008
C24:1n-9	Nervônico	5,97x10 ⁻⁰¹	-0,028	5,36x10 ⁻⁰¹	-0,008
C22:6n-3*	Docosaexaenoico	7,20x10 ⁻⁰³	0,413	7,54x10 ⁻¹²	0,896

*Marcação para diferença estatística da análise de regressão para a média. ALA = alfa-linolênico.

Tabela 18 - Efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de ácidos graxos de crianças que participaram do estudo no ano de 2014, agrupadas por níveis de ácido graxo alfa-linolênico.

Ácido graxo eritrocitário (mg/dL)		ALA ≥ 0,20 mg/dL		ALA < 0,20 mg/dL	
Representação química	Nomenclatura usual	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito
C14:0	Mirístico	9,05x10 ⁻⁰²	0,017	9,98x10 ⁻⁰¹	-0,037
C15:0	Pentadecílico	2,71x10 ⁻⁰¹	0,046	1,77x10 ⁻⁰¹	0,098
C16:0	Palmítico	2,86x10 ⁻⁰¹	0,154	9,97x10 ⁻⁰¹	-0,614
C16:1n-7	Palmitoleico	1,62x10 ⁻⁰¹	0,011	9,19x10 ⁻⁰¹	-0,015
C17:0	Margárico	1,47x10 ⁻⁰¹	0,207	7,09x10 ⁻⁰¹	-0,086
C17:1	Heptadecenoico	5,57x10 ⁻⁰²	0,169	2,83x10 ⁻⁰⁵	0,125
C18:0	Estearico	5,07x10 ⁻⁰³	0,559	6,44x10 ⁻⁰¹	-0,067
C18:1n-9*	Oleico	8,85x10 ⁻¹³	1,959	8,48x10 ⁻⁰⁴	0,791
C18:1(<i>trans</i> -11)n-7	Vacênico	4,04x10 ⁻⁰⁴	0,057	8,10x10 ⁻⁰¹	-0,018
C18:1(<i>trans</i> -9)n-9	Elaídico	9,82x10 ⁻⁰¹	-0,044	1,00x10 ⁺⁰⁰	-0,073
C18:2n-6*	Linoleico	9,24x10 ⁻¹³	4,140	6,86x10 ⁻⁰⁵	1,766
C18:3n-3	Alfa-Linolênico	4,74x10 ⁻¹¹	0,051	8,88x10 ⁻⁰¹	-0,005
C20:0	Araquídico	7,01x10 ⁻⁰²	0,018	7,60x10 ⁻⁰¹	-0,008
C20:1n-9	Eicosenoico	2,10x10 ⁻⁰³	0,024	8,98x10 ⁻⁰¹	-0,010
C20:2n-6	Eicosadienoico	4,40x10 ⁻⁰²	0,038	7,74x10 ⁻⁰¹	-0,013
C20:3n-6*	Dihomo-gama-linolênico	6,02x10 ⁻¹⁰	0,742	3,35x10 ⁻⁰⁴	0,349
C20:4n-6*	Araquidônico	3,18x10 ⁻¹¹	6,275	2,07x10 ⁻⁰⁴	3,582
C22:0	Docosanoico	4,63x10 ⁻⁰¹	0,003	9,98x10 ⁻⁰¹	-0,094
C22:1n-9	Erúcico	1,51x10 ⁻⁰²	0,014	8,96x10 ⁻⁰¹	-0,007
C20:5n-3*	Eicosapentaenoico	3,74x10 ⁻⁰⁸	0,135	3,22x10 ⁻⁰³	0,058
C24:0	Tetracosanoico	3,51x10 ⁻⁰³	0,580	5,25x10 ⁻⁰¹	-0,019
C24:1n-9	Nervônico	1,31x10 ⁻⁰³	0,410	6,83x10 ⁻⁰¹	-0,077
C22:6n-3*	Docosaenoico	2,27x10 ⁻¹⁰	1,485	5,20x10 ⁻⁰⁴	0,961

*Marcação para diferença estatística da análise de regressão para a média. ALA = alfa linolênico.

5.7 VARIÁVEIS PREDITORAS

5.7.1 Ácido graxo Oleico

O aumento do AO não foi estatisticamente diferente entre os sexos na população de 2013. Em 2014, os meninos tiveram um maior aumento de AO após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais ($p=0,049$). Foram observados 36 variáveis preditoras para o aumento do AO (Tabela 19), incluindo menores níveis de AO no momento basal, o aumento do retinol e da vitamina B2 na resposta à suplementação, menores níveis basais de piridoxina e tiamina, a redução da piridoxina na resposta à suplementação, menores níveis de vitamina D no T2, o aumento na ingestão alimentar de vitamina B6, ferro e ácido fólico na resposta à suplementação, a baixa ingestão alimentar de vitamina C no T2 e de

ingestão alimentar de magnésio no T1. A seleção de variáveis preditoras com reamostragem resultou na permanência de 22 variáveis preditoras, sendo estas consideradas, portanto, as que mais fortemente estão associadas ao aumento do AO após a suplementação na população estudada. Dentre as variáveis preditoras estão: o aumento nos níveis de retinol e de vitamina B2 na resposta à suplementação, o aumento da ingestão alimentar de vitamina B6 e ferro na resposta à suplementação e a baixa ingestão alimentar de vitamina C no T2 (Tabela 20).

Tabela 19 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO associadas ao aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	Coefficiente β LASSO	Variável preditora	Coefficiente β LASSO
Oleico_T2	0,984501	Palmítico_T2	0,000272
Oleico_T1	-0,984048	Δ Hemácias	0,000237
Δ Palmitoleico	0,025281	DHA_T1	-0,000223
Δ Elaídico	0,012831	Hematócrito_T1	-0,000202
Δ Docosanoico	0,009936	(C3-epimer)VitD_T2	-0,000144
Δ Eicosenoico	0,009131	Δ Glicemia	-0,000138
Δ Retinol	0,006674	Δ Ferro_QFA	0,000125
Retinol_T1	-0,004560	Δ Piridoxina	-0,000104
Δ Palmítico	0,004023	Piridoxal_T1	-0,000100
Elaídico_T2	0,002838	Neutrófilos_T2	-0,000045
Palmitoleico_T1	-0,002108	Δ Triglicerídeos	0,000034
Δ Linoleico	0,001928	Δ Vit.B2_Subclasse	0,000019
Δ HCM	-0,001350	Triglicerídeos_T1	-0,000007
Erúcido_T2	0,001135	VitC_QFA_T2	-0,000007
Δ DHGL	0,001067	Tiamina M_T1	-0,000005
Δ VitB6_QFA	0,000463	Vit.B2_Subclasse_T1	-0,000002
Δ VCM	-0,000290	Mg_QFA_T1	-0,000001
Esteárico_T1	-0,000278	Δ Folato_QFA	0,000001

Variáveis preditoras selecionadas por análise de regressão LASSO. Intercepto = 0,010106. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa 6 semanas após a suplementação. Δ representa a diferença entre T2 e T1. QFA representa o consumo alimentar avaliado pelo questionário de frequência alimentar (considera o nutriente proveniente dos alimentos e do suplemento). Subclasse representa todas as formas vitamínicas (predominantes e metabólitos). HCM: hemoglobina corpuscular média. VCM: volume corpuscular médio. Tiamina M: Tiamina Mononucleotídeo. (C3-epimer)VitD: metabólito da vitamina D. DHGL: dihomogama-linolênico. DHA: docosaenoico. Mg: Magnésio.

Tabela 20 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO com reamostragem associadas ao aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação de vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	Coefficiente β LASSO com 1000 <i>bootstrapping</i>	95%IC	
Oleico_T1	-0,867906	-0,884590	0,000000
Oleico_T2	0,867879	0,007881	0,881307
Δ Palmitoleico	0,180499	0,092108	2,364292
Δ Elaídico	0,103889	0,000000	0,931027
Δ Retinol	0,049958	0,000000	1,374421
Δ Palmítico	0,044292	0,026537	0,337307

Tabela 20 - Variáveis preditoras *selecionadas por LASSO* com reamostragem associadas ao aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação de vitaminas e minerais na população do estudo.

			(conclusão)
Δ Eicosenoico	0,034511	0,000000	1,433160
Elaídico_T2	0,023273	0,000000	0,315722
Δ Docosanoico	0,022173	0,000000	0,466639
Δ Linoleico	0,012402	0,000000	0,143406
Retinol_T1	-0,007594	-0,843873	0,000000
Δ HCM	-0,004211	-0,273888	0,000000
Δ VitB6_QFA	0,002745	0,000000	0,056155
DHA_T1	-0,000463	-0,039314	0,000000
Hematócrito_T1	-0,000366	-0,003025	0,000000
Δ Triglicerídeos	0,000267	0,000000	0,002499
Δ Glicemia	-0,000171	-0,013902	0,000000
Neutrófilos_T2	-0,000108	-0,004800	0,000000
Δ VitB2_Subclasse	0,000076	0,000000	0,002353
Triglicerídeos_T1	-0,000044	-0,001872	0,000000
VitC_QFA_T2	-0,000013	-0,000939	0,000000
Δ Ferro_FFQ	0,000003	0,000000	0,011548

Variáveis preditoras selecionadas por análise de regressão LASSO com reamostragem. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com a barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa 6 semanas após a suplementação. Δ representa a diferença entre T2 e T1. QFA representa o consumo alimentar avaliado pelo questionário de frequência alimentar (considera o nutriente proveniente dos alimentos e do suplemento). Subclasse representa todas as formas vitamínicas (predominantes e metabólitos). HCM: hemoglobina corpuscular média. VCM: volume corpuscular médio. Tiamina M: Tiamina Mononucleotídeo. DHA: docosaenoico.

A análise de regressão linear simples pode nos oferecer uma perspectiva da contribuição individual das variáveis para prever o aumento do AO na resposta à suplementação (Tabela 21, Figuras 6 e 7). No total, 14 variáveis apresentaram boa acurácia para prever individualmente o aumento do AO (Tabela 22). Entende-se por acurácia neste trabalho, a concordância entre os valores preditos por análise de regressão linear (dados de 2013) com os valores observados de Δ Oleico da população de 2014. O coeficiente de correlação de Pearson evidenciou uma boa acurácia ($r=0,92$; $p<0,01$) no modelo de regressão linear múltipla (Tabela 22).

Valores do AO no momento basal tiveram associação negativa com o aumento do AO na resposta à suplementação. Valores de AO no momento basal de $-0,32$ mg/dL na população de 2013 e de $-0,47$ mg/dL na população de 2014, explicam o aumento de 1 mg/dL na resposta do AO à suplementação ($p<0,01$) (Tabela 21). O aumento dos níveis de retinol de $4,6$ μ g/mL na resposta à suplementação em 2013 e de $2,6$ μ g/mL em 2014 ($p<0,05$) explicam o aumento de 1 mg/dL na resposta do AO à suplementação. Além de alguns AGs e do retinol, a glicemia e os triglicerídeos apresentaram boa acurácia na predição para a resposta do AO (Tabela 22). O aumento de $0,01$ mg/dL em 2013 e de $0,02$ mg/dL em 2014 ($p<0,01$) na resposta dos

triglicerídeos plasmáticos à suplementação, explicam o aumento de 1 mg/dL na reposta do AO (Tabela 21). A redução de -0,05 mg/dL ($p < 0,05$) na reposta da glicemia à suplementação na população de 2014, explica o aumento de 1 mg/dL na reposta do AO (Tabela 21). Embora tenha sido observada uma relação positiva entre glicemia e AO na população de 2013, não houve diferença estatística para esta relação (Tabela 21). O coeficiente negativo na concordância entre os valores observados e preditos de AO, considerando a reposta da glicemia como variável preditora para a reposta do AO à suplementação (Tabela 22), pode ser explicado pela associação negativa encontrada na população de 2014 e pela associação positiva encontrada na população de 2013 (Tabela 21).

Tabela 21 - Resultados das análises de regressão linear para as variáveis predictoras do aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais.

Variável preditora	População de 2013			População de 2014		
	Coefficiente β	R ²	p -valor	Coefficiente β	R ²	p -valor
Oleico_T2*	0,308	0,151	2,93x10 ⁻⁰⁵	0,516	0,290	1,62x10 ⁻¹⁰
Oleico_T1*	-0,318	0,155	2,27x10 ⁻⁰⁵	-0,464	0,203	1,91x10 ⁻⁰⁷
ΔPalmitoleico*	7,647	0,423	1,89x10 ⁻¹⁴	11,908	0,359	2,99x10 ⁻¹³
ΔElaidico*	3,687	0,204	7,98x10 ⁻⁰⁷	4,947	0,168	2,80x10 ⁻⁰⁶
ΔDocosanoico*	3,690	0,566	4,13x10 ⁻²¹	4,325	0,486	4,68x10 ⁻¹⁹
ΔEicosenoico*	10,568	0,144	4,80x10 ⁻⁰⁵	12,569	0,261	1,78x10 ⁻⁰⁹
ΔRetinol*	4,572	0,048	2,20x10 ⁻⁰²	2,592	0,040	2,82x10 ⁻⁰²
Retinol_T1	-0,211	0,000	8,93x10 ⁻⁰¹	-1,181	0,009	2,92x10 ⁻⁰¹
ΔPalmítico*	0,516	0,814	7,90x10 ⁻⁴¹	0,489	0,588	7,50x10 ⁻²⁵
Elaidico_T2*	2,170	0,077	3,49x10 ⁻⁰³	2,043	0,046	1,81x10 ⁻⁰²
ΔLinoleico*	0,570	0,626	1,36x10 ⁻²⁴	0,412	0,580	2,43x10 ⁻²⁴
Δ HCM	-1,001	0,068	6,20x10 ⁻⁰³	-0,664	0,025	8,40x10 ⁻⁰²
Δ Vit.B6_QFA	0,620	0,079	2,98x10 ⁻⁰³	0,486	0,024	8,64x10 ⁻⁰²
DHA_T1	-0,063	0,004	4,89x10 ⁻⁰¹	-0,679	0,149	1,14x10 ⁻⁰⁵
Hematócrito_T1	-0,073	0,015	2,09x10 ⁻⁰¹	0,010	0,000	9,20x10 ⁻⁰¹
Δ Glicemia	0,004	0,000	8,85x10 ⁻⁰¹	-0,054	0,036	3,64x10 ⁻⁰²
Δ Ferro_QFA	0,085	0,065	7,58x10 ⁻⁰³	0,043	0,020	1,20x10 ⁻⁰¹
Neutrófilos_T2	-0,003	0,000	8,44x10 ⁻⁰¹	0,003	0,000	8,79x10 ⁻⁰¹
ΔTriglicerídeos*	0,009	0,095	1,08x10 ⁻⁰³	0,016	0,067	4,04x10 ⁻⁰³
Δ Vit.B2_Subclasse	0,016	0,092	1,32x10 ⁻⁰³	0,003	0,005	4,31x10 ⁻⁰¹
Triglicerídeos_T1*	-0,010	0,053	1,57x10 ⁻⁰²	-0,012	0,038	3,09x10 ⁻⁰²
Vit.C_QFA_T2	-0,001	0,002	6,52x10 ⁻⁰¹	-0,002	0,012	2,34x10 ⁻⁰¹

*(Negrito): marcação para resultados estatisticamente significativos nas duas populações (reprodutibilidade dos resultados). Δ Oleico é a variável resposta para todos os modelos. Coeficiente β representa a mediana dos coeficientes das análises de regressão linear com reamostragem com 1000 *bootstrapping*. Coeficientes negativos representam associação inversa e coeficientes positivos representam associação positiva com o aumento do oleico na resposta à suplementação. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre T2 e T1. QFA representa o consumo alimentar avaliado pelo questionário de frequência alimentar (considera o nutriente proveniente da dieta livre e do suplemento). Subclasse representa o total de vitaminas

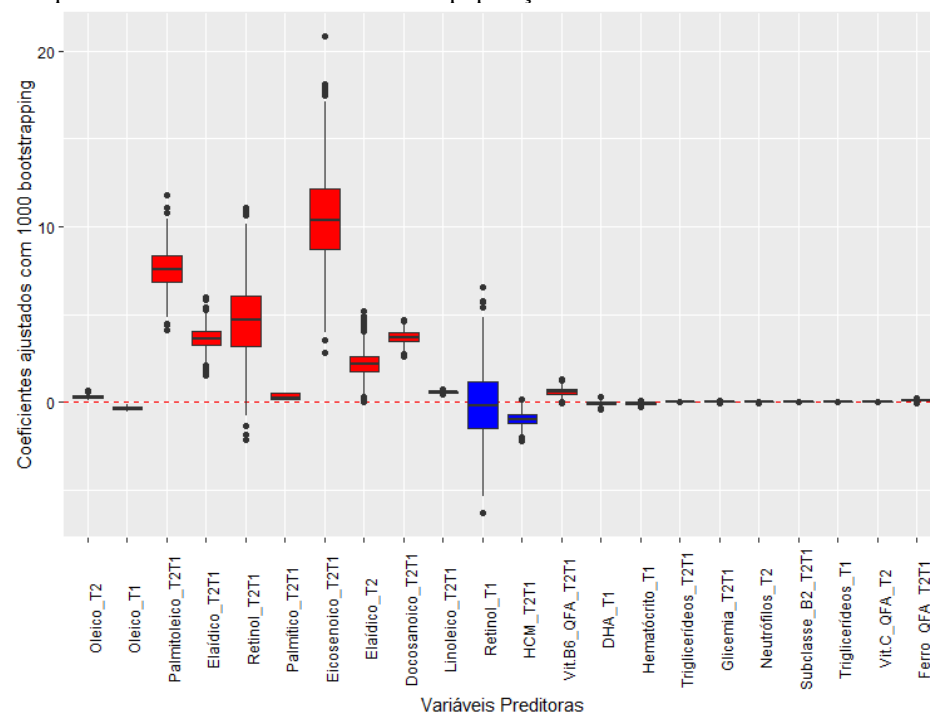
dosadas no sangue (forma predominante e metabólitos). HCM: Hemoglobina corpuscular média. DHA: docosaenoico.

Tabela 22 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	Coefficiente de correlação de Pearson	p-valor
Oleico_T1*	0,451	1,91x10 ⁻⁰⁷
Oleico_T2*	0,538	1,62x10 ⁻¹⁰
ΔPalmitoleico*	0,599	2,99x10 ⁻¹³
ΔElaídico*	0,410	2,80x10 ⁻⁰⁶
ΔRetinol*	0,199	2,82x10 ⁻⁰²
ΔPalmitico*	0,767	7,50x10 ⁻²⁵
ΔEicosenoico*	0,511	1,78x10 ⁻⁰⁹
Elaídico_T2*	0,214	1,81x10 ⁻⁰²
ΔDocosanoico*	0,697	4,68x10 ⁻¹⁹
ΔLinoleico*	0,761	2,43x10 ⁻²⁴
Retinol_T1	0,096	2,92x10 ⁻⁰¹
ΔHCM	0,157	8,40x10 ⁻⁰²
ΔVit.B6_QFA	0,156	8,64x10 ⁻⁰²
DHA_T1*	0,386	1,14x10 ⁻⁰⁵
Hematócrito_V1	-0,009	9,20x10 ⁻⁰¹
ΔTriglicerídeos*	0,259	4,04x10 ⁻⁰³
ΔGlicemia*	-0,190	3,64x10 ⁻⁰²
Neutrófilos_T2	-0,014	8,79x10 ⁻⁰¹
ΔVit.B2_Subclasse	0,072	4,31x10 ⁻⁰¹
Triglicerídeos_T1*	0,195	3,09x10 ⁻⁰²
Vit.C_QFA_T2	0,109	2,34x10 ⁻⁰¹
ΔFerro_QFA	0,141	1,20x10 ⁻⁰¹
Conjunto das variáveis*	0,922	1,44x10 ⁻⁵¹

*Marcação para significância estatística. Os modelos de regressão linear tiveram a acurácia testada por meio da análise de correlação de Pearson entre o ΔOleico predito com dados de 2013 e o ΔOleico observado em 2014. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. QFA representa o consumo alimentar avaliado pelo questionário de frequência alimentar (considera o nutriente proveniente da dieta livre e do suplemento). Subclasse representa o total de vitaminas dosadas no sangue (forma predominante e metabólitos). O conjunto das variáveis representa a análise de regressão múltipla considerando todas as variáveis preditoras com exceção do oleico. HCM: hemoglobina corpuscular média. DHA: ácido graxo docosaenoico.

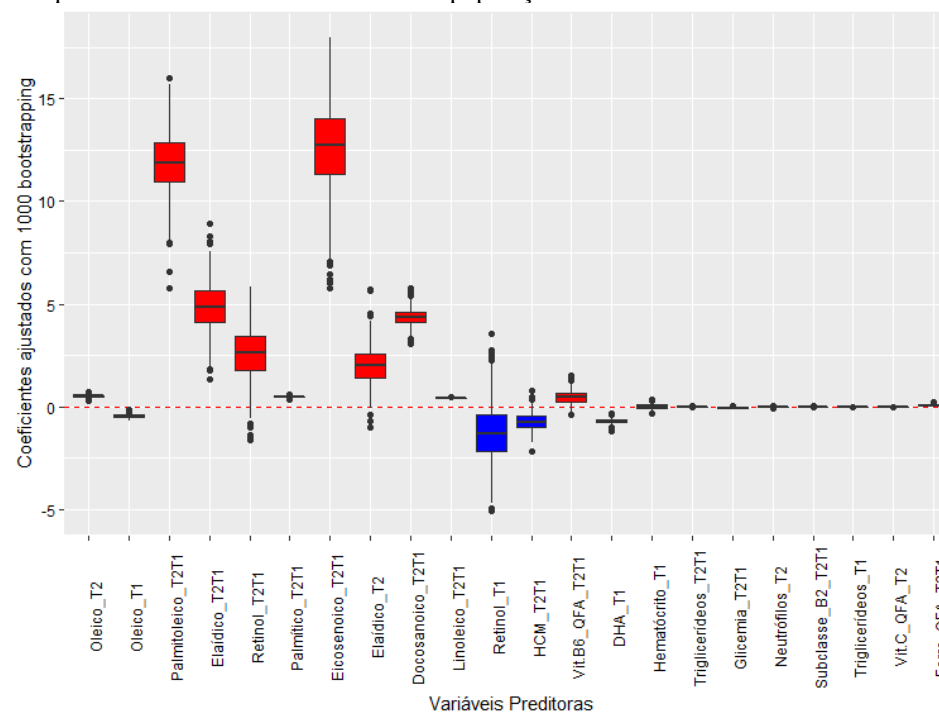
Figura 6 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. QFA representa o consumo alimentar de uma dieta livre com a suplementação de barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais avaliado pelo questionário de frequência alimentar. Subclasse representa todas as formas da vitamina (predominante e metabólitos). Boxplots azuis representam associação negativa (coeficientes negativos). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). HCM: hemoglobina corpuscular média. VCM: volume corpuscular médio. DHA: docosaenoico.

Figura 7 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo oleico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. QFA representa o consumo alimentar de uma dieta livre com a suplementação de barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais avaliado pelo questionário de frequência alimentar. Subclasse representa todas as formas da vitamina (predominante e metabólitos). Boxplots azuis representam associação negativa (coeficientes negativos). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). HCM: hemoglobina corpuscular média. VCM: volume corpuscular médio. DHA: docosaenoico.

5.7.2 Ácido graxo Dihomo-gama-linolênico

Não foi observada diferença estatística entre os sexos para o aumento nas concentrações de DHGL em 2013. Na população de 2014, os meninos tiveram um maior aumento de DHGL após a suplementação quando comparados às meninas ($p=0,049$). Foram encontrados 18 preditores para o aumento de DHGL (Tabela 23) e todas as variáveis permaneceram como preditoras após reamostragem, com exceção do ácido graxo docosanoico (Tabela 24).

Tabela 23 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO associadas ao aumento do ácido graxo dihomogama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	Coefficiente β LASSO	Variável preditora	Coefficiente β LASSO
DHGL_T1	-0,976617	Δ Oleico	0,000384
DHGL_T2	0,974897	Δ Linoleico	0,000148
Δ Mirístico	0,011651	Δ Docosanoico	0,000100
Δ Margárico	0,011510	Δ Palmítico	0,000085
Pentadecílico_T1	-0,008889	Δ Peso	0,000070
Δ Tetracosanoico	0,000466	Δ Vitamina_D3	-0,000013
Δ Cálcio	0,000464	Δ VLDL-c	-0,000006
Δ ARA	0,000419	NMN_T2	-0,000004
Δ IMC	0,000400	Δ LDL-c	0,000003

Variáveis preditoras selecionadas por análise de regressão LASSO. Intercepto = 0,009003. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. IMC: Índice de Massa Corporal. NMN: Nicotinamida Mononucleotídeo. VLDL-c: *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. LDL-c: *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. DHGL: Ácido graxo dihomogama-linolênico. ARA: Ácido graxo araquidônico.

Tabela 24 - Variáveis preditoras selecionadas por LASSO com reamostragem associadas ao aumento do ácido graxo dihomogama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	Coefficiente β LASSO com 1000 <i>bootstrapping</i>	95%IC	
DHGL_T1	-0,950525	-0,951038	-0,505989
DHGL_T2	0,946860	0,484446	0,947593
Δ Margárico	0,024956	0,000000	0,162245
Δ Mirístico	0,024333	0,009131	0,221866
Pentadecílico_T1	-0,018269	-0,177107	0,000000
Δ Tetracosanoico	0,000994	0,000000	0,006426
Δ Cálcio	0,000978	0,000000	0,008318
Δ ARA	0,000884	0,000000	0,007988
Δ IMC	0,000808	0,000000	0,011380
Δ Oleico	0,000755	0,000000	0,007914
Δ Linoleico	0,000297	0,000000	0,003798
Δ Palmítico	0,000269	0,000000	0,003282
Δ Peso	0,000245	0,000000	0,005975

Vitamin_D3	-0,000027	-0,000494	0,000000
Δ VLDL-c	-0,000011	-0,000363	0,000000
Δ LDL-c	0,000008	0,000000	0,000325
NM_T2	-0,000008	-0,000054	0,000000

Variáveis foram selecionadas pela análise de regressão LASSO com reamostragem em 1000 *bootstrapping*. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 meses de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. 95%IC = 95% intervalo de confiança. NM: Nicotinamida Mononucleotídeo. IMC: Índice de Massa Corporal. DHGL: Ácido graxo dihomo-gama-linolênico. ARA: Ácido graxo araquidônico. VLDL-c: *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. LDL-c: *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*.

A análise de regressão linear simples das variáveis preditoras para a alteração do DHGL demonstrou não haver uma reprodutibilidade dos resultados nas populações (Figuras 8 e 9). Portanto, é possível que um conjunto de variáveis diferentes possa prever a resposta do DHGL em 2014. Alguns AGs apresentam associação significativa com o aumento do DHGL: mirístico, ARA, AL e AO (Tabela 25). Estes AGs apresentaram individualmente uma boa acurácia na predição do DHGL (Tabela 26). O aumento do AG místico na resposta à suplementação, de 1,1mg/dL em 2013 ($p<0,01$) e de 1,4 mg/dL em 2014 ($p<0,05$), explicam o aumento de 1 mg/dL no DHGL na resposta à suplementação. O aumento de ARA na resposta à suplementação, de 0,05mg/dL em 2013 e de 0,1 mg/dL em 2014 ($p<0,01$), explicam o aumento de 1 mg/dL no DHGL na resposta à suplementação. O aumento de AO na resposta à suplementação, de 0,1 mg/dL em 2013 e de 0,2 mg/dL em 2014 ($p<0,01$), explicam o aumento de 1 mg/dL no DHGL na resposta à suplementação. O aumento de AL na resposta à suplementação, de 0,08 mg/dL em 2013 e de 0,2 em 2014 ($p<0,01$), explicam o aumento de 1mg/dL do DHGL na resposta à suplementação (Tabela 25).

Tabela 25 - Resultados da análise de regressão linear simples para as variáveis preditoras do aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais.

Variável preditora	População de 2013			População de 2014		
	Coefficiente β	R ²	<i>p</i> -valor	Coefficiente β	R ²	<i>p</i> -valor
DHGL_T1*	-0,263	0,241	6,11x10 ⁻⁰⁸	-0,561	0,165	3,48x10 ⁻⁰⁶
DHGL_T2*	0,029	0,002	6,38x10 ⁻⁰¹	0,769	0,548	2,11x10 ⁻²²
Δ Margárico	2,361	0,272	6,28x10 ⁻⁰⁹	-0,043	0,010	2,70x10 ⁻⁰¹
ΔMirístico*	1,104	0,232	1,13x10 ⁻⁰⁷	1,376	0,048	1,55x10 ⁻⁰²
Pentadecílico_T1	-2,752	0,106	5,38x10 ⁻⁰⁴	0,060	0,001	7,37x10 ⁻⁰¹
Δ Tetracosanoico	0,102	0,212	4,74x10 ⁻⁰⁷	0,030	0,015	1,73x10 ⁻⁰¹
Δ Cálcio	0,087	0,087	1,82x10 ⁻⁰³	0,356	0,024	8,59x10 ⁻⁰²
ΔARA*	0,049	0,271	6,76x10 ⁻⁰⁹	0,103	0,781	1,93x10 ⁻⁴¹

Tabela 25 - Resultados da análise de regressão linear simples para as variáveis preditoras do aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais.

(conclusão)

Δ IMC	0,102	0,026	$9,43 \times 10^{-02}$	0,204	0,011	$2,56 \times 10^{-01}$
ΔOleico*	0,105	0,329	$6,84 \times 10^{-11}$	0,234	0,379	$4,70 \times 10^{-14}$
ΔLinoleico*	0,078	0,349	$1,33 \times 10^{-11}$	0,183	0,774	$1,39 \times 10^{-40}$
Δ Palmitico	0,061	0,340	$2,92 \times 10^{-11}$	0,037	0,020	$1,19 \times 10^{-01}$
Δ Peso	0,042	0,014	$2,13 \times 10^{-01}$	0,150	0,031	$5,27 \times 10^{-02}$
Δ Vitamina_D3	-0,003	0,032	$6,15 \times 10^{-02}$	-0,003	0,008	$3,41 \times 10^{-01}$
Δ VLDL-c	-0,002	0,009	$3,28 \times 10^{-01}$	0,018	0,024	$8,98 \times 10^{-02}$
Δ LDL-c	0,003	0,031	$6,68 \times 10^{-02}$	0,001	0,000	$8,17 \times 10^{-01}$
NM_T2	-0,001	0,035	$5,08 \times 10^{-02}$	-0,001	0,018	$1,44 \times 10^{-01}$

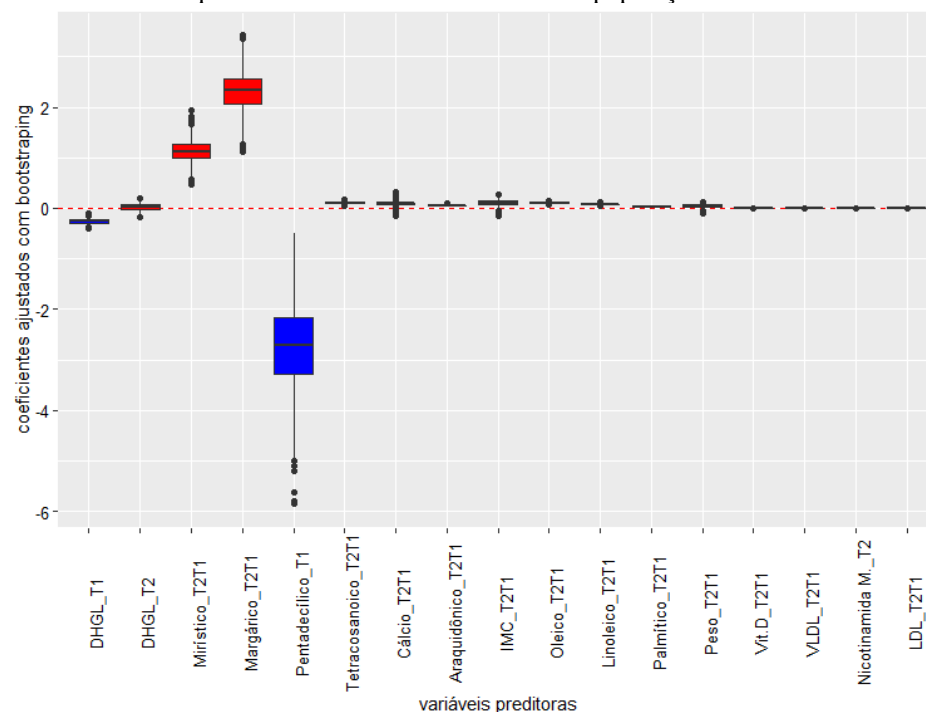
*(Negrito): marcação para resultados estatisticamente significativos nas duas populações (reprodutibilidade dos resultados). Δ DHGL é a variável resposta para todos os modelos. Coeficiente β representa a mediana dos coeficientes de regressão linear com reamostragem em *1000 bootstrapping*. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre T2 e T1. Coeficientes negativos representam associação inversa e coeficientes positivos representam associação direta com o aumento do DHGL na resposta à suplementação. NM: Nicotinamida Mononucleotídeo. IMC: Índice de Massa Corporal. DHGL: Ácido graxo dihomo-gama-linolênico. ARA: Ácido graxo araquidônico. VLDL-c: *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. LDL-c: *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*.

Tabela 26 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo dihomo-gama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	r	p-valor	Variável preditora	r	p-valor
DHGL_T1*	0,406	$3,48 \times 10^{-06}$	Δ Oleico*	0,615	$4,70 \times 10^{-14}$
DHGL_T2*	0,740	$2,11 \times 10^{-22}$	Δ Linoleico*	0,880	$1,39 \times 10^{-40}$
Δ Margárico	-0,101	$2,70 \times 10^{-01}$	Δ Palmitico	0,142	$1,19 \times 10^{-01}$
Δ Mirístico*	0,219	$1,55 \times 10^{-02}$	Δ Peso	0,176	$5,27 \times 10^{-02}$
Pentadecílico_T1	-0,031	$7,37 \times 10^{-01}$	Δ VitD3	0,087	$3,41 \times 10^{-01}$
Δ Tetracosanoico	0,124	$1,73 \times 10^{-01}$	Δ VLDL-c	-0,154	$8,98 \times 10^{-02}$
Δ Cálcio	0,156	$8,59 \times 10^{-02}$	NM_T2	0,133	$1,44 \times 10^{-01}$
Δ ARA*	0,884	$1,93 \times 10^{-41}$	Δ LDL-c	0,021	$8,17 \times 10^{-01}$
Δ IMC	0,104	$2,56 \times 10^{-01}$	Conjunto das variáveis	0,070	$4,46 \times 10^{-01}$

*Marcação para significância estatística. r = coeficiente de correlação de Pearson. Os modelos de regressão linear tiveram a acurácia testada por meio da análise de correlação de Pearson entre o Δ DHGL predito com dados de 2013 e o Δ DHGL observado em 2014. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. O Conjunto das variáveis representa a análise de regressão múltipla considerando todas as variáveis preditoras com exceção do DHGL no T1 e no T2. IMC=índice de massa corporal. VLDL-c=*very low-density lipoprotein cholesterol*. NM=nicotinamida mononucleotídeo. LDL-c=*low density lipoprotein cholesterol*.

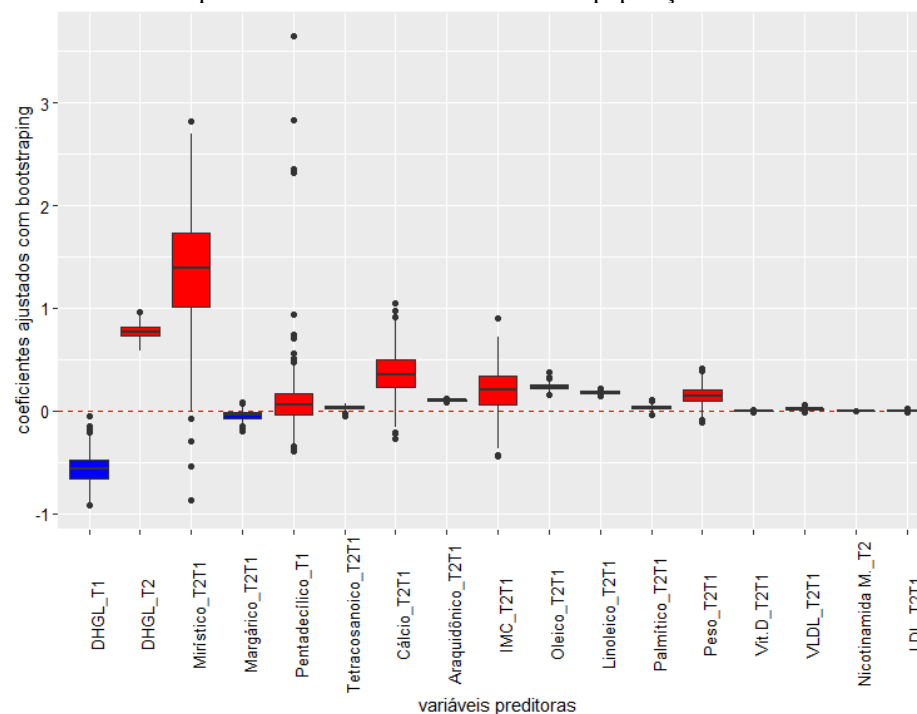
Figura 8 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo dihomogama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. Boxplots azuis representam associação negativa (coeficientes negativos). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). IMC: Índice de Massa Corporal. Nicotinamida M: Nicotinamida Mononucleotídeo. VLDL: *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. LDL: *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. DHGL: Ácido graxo dihomogama-linolênico.

Figura 9 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo dihomogama-linolênico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. Boxplots azuis representam associação negativa (coeficientes negativos). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). IMC: Índice de Massa Corporal. Nicotinamida M: Nicotinamida Mononucleotídeo. VLDL: *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. LDL: *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*. DHGL: Ácido graxo dihomogama-linolênico.

5.7.3 Ácido graxo Araquidônico

Não houve diferença estatística na resposta do ARA entre os sexos. O AG tetracosanoico foi um preditor para a resposta do ARA na resposta à suplementação (Tabela 27). O ARA basal tem uma relação inversa com a sua resposta à suplementação (Tabela 28). O AG tetracosanoico não alcançou boa acurácia na predição do aumento do ARA (Tabela 29). As Figuras 10 e 11 ilustram as análises de regressão linear simples.

Tabela 27 - Variáveis predictoras associadas ao aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

	Coeficiente β	Coeficiente β com 1000 <i>bootstrapping</i> LASSO		
		Coeficientes		95%IC
Intercepto	0,006915			
ARA_T1	-0,999389	-0,962356	-0,970789	-0,788765
ARA_T2	0,999141	0,949821	0,799436	0,953908
Δ Tetracosanoico	0,000375	0,034161	0,012096	0,104207

Variáveis predictoras selecionadas por análise de regressão LASSO com e sem reamostragem em 1000 *bootstrapping*. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. 95%IC: 95% intervalo de confiança. ARA: ácido graxo araquidônico.

Tabela 28 - Resultados da regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável predictora	População de 2013			População de 2014		
	Coeficiente β	R ²	p-valor	Coeficiente β	R ²	p-valor
ARA_T1*	-0,786	0,613	8,49x10 ⁻²⁴	-0,792	0,298	7,68x10 ⁻¹¹
ARA_T2*	0,512	0,117	2,70x10 ⁻⁰⁴	0,862	0,538	7,48x10 ⁻²²
Δ Tetracosanoico	1,836	0,632	5,82x10 ⁻²⁵	0,325	0,025	8,34x10 ⁻⁰²

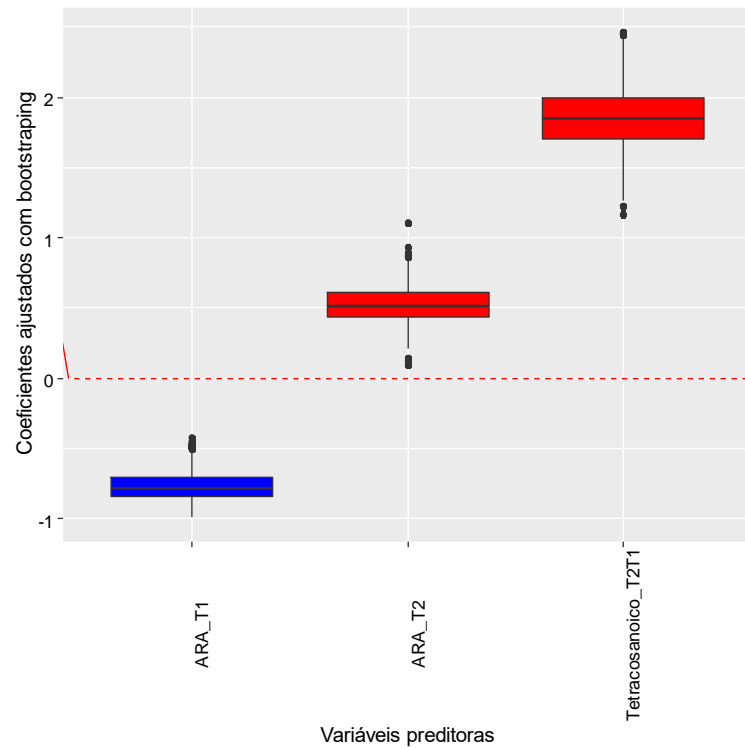
*(Negrito): marcação para resultados estatisticamente significativos nas duas populações (reprodutibilidade dos resultados). Δ ARA é a variável resposta para todos os modelos. Coeficiente β representa a mediana dos coeficientes de regressão linear com reamostragem com 1000 *bootstrapping*. Coeficientes negativos representam associação inversa e coeficientes positivos representam associação direta com o aumento do ARA na resposta à suplementação. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre os momentos antes e depois da suplementação. ARA: ácido graxo araquidônico.

Tabela 29 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo araquidônico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável predictora	Coeficiente de correlação de Pearson	p-valor
ARA_T1*	0,546	7,68x10 ⁻¹¹
ARA_T2*	0,734	7,48x10 ⁻²²
Δ Tetracosanoico	0,157	8,34x10 ⁻⁰²

*Marcação para significância estatística. Os modelos de regressão linear tiveram a acurácia testada por meio da análise de correlação de Pearson entre o Δ ARA predito com dados de 2013 e o Δ ARA observado em 2014. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. ARA: ácido graxo araquidônico.

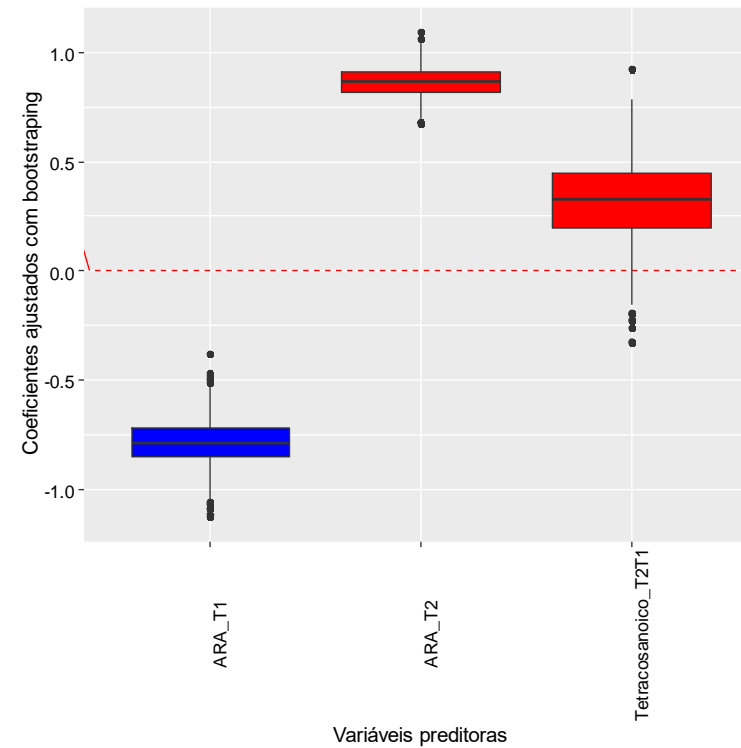
Figura 10 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo araquidônico na reposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. Boxplot azul representa associação negativa (coeficiente negativo). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). ARA: ácido graxo araquidônico.

Figura 11 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo araquidônico na reposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. Boxplot azul representa associação negativa (coeficiente negativo). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). ARA: ácido graxo araquidônico.

5.7.4 Ácido graxo Docosaexaenoico

O sexo masculino teve um maior aumento de DHA na resposta à suplementação ($p < 0,01$) e não houve diferença estatística entre os sexos em 2014. Foram encontrados 3 preditores para a resposta do DHA (Tabela 30). Menores níveis de DHA no momento basal e aumento do AG nervônico estão relacionados à resposta do DHA ($p < 0,01$) (Tabela 31, Figuras 12 e 13). Estes AGs apresentaram boa acurácia de predição (Tabela 32) para a resposta do DHA.

Tabela 30 - Variáveis preditoras associadas ao aumento do ácido graxo docosaexaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

	Coeficiente β	Coeficientes β com 1000 <i>bootstrapping</i> LASSO		
		Coeficiente	95%IC	
Intercepto	0,001122			
DHA_T2	0,995789	0,943251	0,868594	0,954560
DHA_T1	-0,995637	-0,943496	-0,958295	-0,868653
Δ Nervônico	0,003244	0,036714	0,019589	0,095815

Variáveis preditoras selecionadas por análise de regressão LASSO com e sem reamostragem em 1000 *bootstrapping*. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. 95%IC: 95% intervalo de confiança. DHA: ácido graxo docosaexaenoico.

Tabela 31 - Resultados da regressão linear simples das variáveis preditoras para o aumento do ácido graxo docosaexaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	População de 2013		População de 2014	
	Coeficiente β	p -valor	Coeficiente β	p -valor
DHA_T1*	-0,580	$1,20 \times 10^{-12}$	-0,717	$9,33 \times 10^{-08}$
DHA_T2*	0,414	$5,42 \times 10^{-05}$	0,865	$2,23 \times 10^{-26}$
ΔNervônico*	0,864	$7,58 \times 10^{-34}$	0,951	$7,92 \times 10^{-20}$

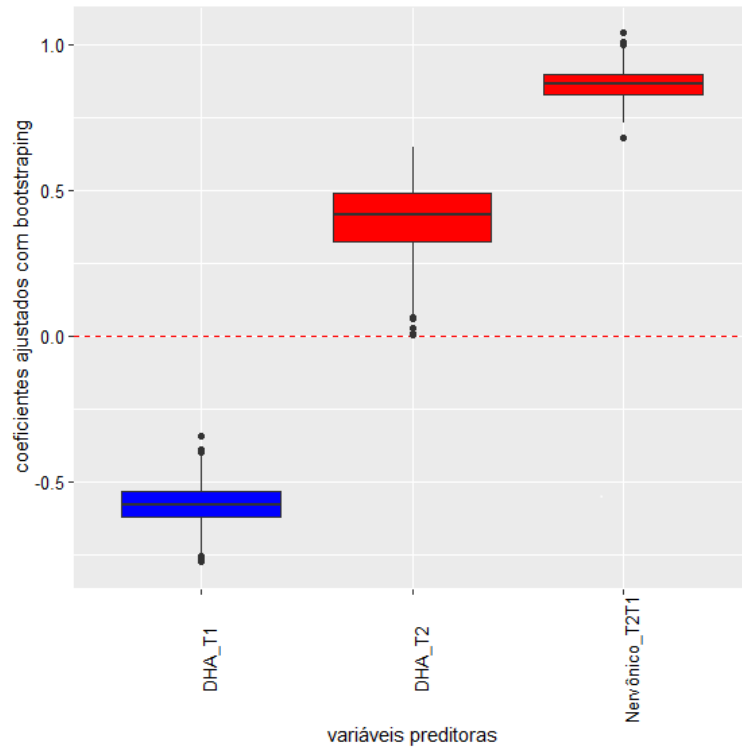
*(Negrito): marcação para resultados estatisticamente significativos nas duas populações (reprodutibilidade dos resultados). Δ DHA é a variável resposta para todos os modelos. Coeficiente β representa a mediana dos coeficientes de regressão linear com reamostragem com 1000 *bootstrapping*. Coeficientes negativos representam associação inversa e coeficientes positivos representam associação positiva com o aumento do DHA na resposta à suplementação. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre os momentos antes e depois da suplementação. DHA: ácido graxo docosaexaenoico.

Tabela 32 - Acurácia dos modelos de regressão linear na predição para o aumento do ácido graxo docosaexaenoico na resposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população do estudo.

Variável preditora	Coeficiente de correlação de Pearson	p -valor
DHA_T1*	0,461	$9,33 \times 10^{-08}$
DHA_T2*	0,782	$2,23 \times 10^{-26}$
Δ Nervônico*	0,708	$7,92 \times 10^{-20}$

*Marcação para significância estatística. Os modelos de regressão linear tiveram a acurácia testada por meio da análise de correlação de Pearson dos valores preditos de Δ DHA com dados de 2013 com os valores observados de Δ DHA de 2014. T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. Δ representa a diferença entre antes e depois da suplementação. ARA: ácido graxo docosaexaenoico.

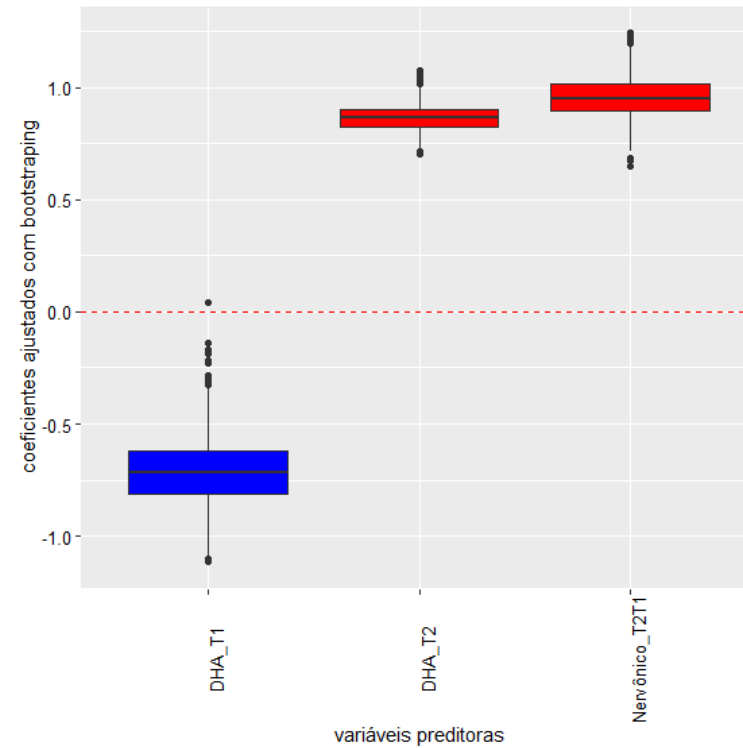
Figura 12 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo docosaexaenoico na reposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2013.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. Boxplot azul representa associação negativa (coeficiente negativo). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). DHA: ácido docosaexaenoico.

Figura 13 - Coeficientes de regressão linear simples das variáveis predictoras para o aumento do ácido graxo docosaexaenoico na reposta à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais na população de 2014.



Fonte: Elaboração própria.

T1 representa o momento basal, antes da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. T2 representa o momento após 6 semanas de suplementação. T2T1 representa a diferença entre antes e depois da suplementação. Boxplot azul representa associação negativa (coeficiente negativo). Boxplots vermelhos representam associação positiva (coeficientes positivos). DHA: ácido docosaexaenoico.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a reprodutibilidade da resposta dos AGs eritrocitários à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais em crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade.

A suplementação com barra de leite enriquecida com micronutrientes contribuiu para o aumento dos níveis de 4 ácidos graxos (AO, ARA, DHGL e DHA) com base nos resultados da análise de regressão para a média em duas populações do *Harmonized Micronutrient Project*, cujo modelo de intervenção foi replicado em anos consecutivos.

Alguns estudos associam alterações no perfil de ARA, DHGL e DHA com a suplementação de micronutrientes. Torquato *et al.* (2019) observou redução na razão ARA/DHA em população pediátrica após suplementação de ômega-3 com vitamina D ou de ômega-3 com vitamina E e colina. Wong e Lodge (2012) observaram associação entre a suplementação de vitamina E e o aumento de lisofosfatidilcolinas derivados de DHGL e DHA.

Quarenta e oito indivíduos participaram nos dois anos do estudo e na análise longitudinal estes indivíduos apresentaram respostas metabólicas diferentes. As mudanças fisiológicas no processo de maturação sexual podem ter contribuído para estes resultados. Os marcos iniciais da puberdade na população brasileira são em média aos 9,7 anos nas meninas e aos 10,9 anos nos meninos (COLLI, 1986).

6.1 ÁCIDO GRAXO OLEICO

Os níveis de AO aumentaram significativamente nos dois anos do estudo após a suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais. O AO é produto da atividade da SCD1, enzima determinante na síntese de AGMIs (PETER *et al.*, 2009). No presente estudo foi observado um aumento proporcionalmente maior de AO em comparação ao palmitoleico nos dois anos do estudo.

A atividade da SCD1 (oleico/esteárico e palmitoleico/palmítico), enzima determinante na síntese de AGMIs, reduziu em 2013. Este resultado está em concordância com o estudo de lipidômica do *Harmonized Micronutrient Project* conduzido por Chakrabarti *et al.* (2020) onde foi observada uma redução do oleico na forma de triglicerídeos em amostragem da coorte de 2013. Os AGMIs produtos da atividade da SCD1 são os principais substratos na síntese de

triglicerídeos e o AO é um dos principais AGs encontrados nos triglicerídeos (NTAMBI e MIYAZAKI, 2004a).

Houve um aumento significativo de AO no eritrócito nas duas populações, o que nos leva a inferir um aumento da síntese endógena e/ou da ingestão alimentar. Embora tenha sido observado um aumento da síntese de AO em 2014 (avaliado através da razão oleico/esteárico), no ano de 2013 foi observado o oposto, ou seja, uma redução na síntese de AO e que não condiz com o aumento dos níveis eritrocitários de AO, uma vez que não foi observado um aumento na ingestão alimentar de AGMI ou de oleico nas populações. Estes resultados demonstram que o aumento eritrocitário do AO nas populações pode ter sido determinado por mecanismos diferentes, ou seja, o aumento do AO em 2014 pode ser devido ao aumento na síntese endógena, enquanto em 2013 a ingestão alimentar pode ter tido maior contribuição para o aumento do AO. Um fato importante a ser levado em consideração é que a quantidade de AO na barra de leite não foi determinada e não há descrição da quantidade de AGMIs no rótulo do produto.

A barra de leite Nestrovit®, utilizada como veículo para a suplementação das vitaminas e minerais, foi escolhida por ter boa palatabilidade e aceitação pela população do estudo. O produto não era comercializado no Brasil no período do estudo e permanece fora do mercado de alimentos e suplementos alimentares no país. De acordo com informações disponíveis no rótulo do Nestrovit® sabor chocolate branco, que foi o produto utilizado no estudo, os ingredientes em ordem decrescente são: açúcar, manteiga de cacau, leite em pó integral, minerais (fosfato de cálcio, fosfato de magnésio, óxido de magnésio, pirofosfato de ferro, óxido de zinco), açúcar de confeitaria, vitaminas (C, niacina, E, ácido pantotênico, B6, A, B2, B1, ácido fólico, biotina, D, B12), aroma natural de limão com outros aromas naturais, emulsificante (lecitina de girassol) e extrato de baunilha. Estas informações foram extraídas do site do fabricante (Nestlé Health Science).

Os AGs presentes na manteiga de cacau descrita são: esteárico (24-37%), AO (29-38%), palmítico (24-30%) e AL (0-4%) (MELO *et al.*, 2020; EL-SAIED, MORSI e AMER, 1981). Os principais AGs presentes no leite de vaca integral em pó são: palmítico (26%), AO (20%), esteárico (10%) e mirístico (11%). O AL, em menor quantidade, também pode estar presente no leite de vaca integral em pó (SEMENIUC *et al.*, 2008; MÅNSSON, 2008). Levando em consideração que a barra de leite contém 1,7g de lipídios (ANEXO A), estima-se uma quantidade de 0,9g de AO/porção. Portanto, a população do estudo pode ter consumido cerca de 1,8 a 2,7g de AO na barra de leite. Não é possível atribuir o aumento dos níveis de AO (0,7mg/mL em 2013 e 1,7 mg/mL em 2014) ao seu consumo na barra de leite sem levar em consideração os demais AGs e outros nutrientes presentes no produto e seus efeitos na

lipogênese. Pode-se concluir que os achados deste estudo indicam que a suplementação foi responsável pelo aumento do AO na população do estudo, mas não se conhece até que ponto as quantidades de AGs presentes no produto podem ter influenciado nos resultados.

Em estudo de Okada *et al.* (2005), foi observada uma maior atividade da SCD1 na síntese de palmitoleico em crianças obesas. Diferentemente, não foi observado aumento da atividade da SCD1 na síntese do palmitoleico nas populações do estudo e, embora não tenha sido avaliada a associação da atividade da SCD1 com a obesidade, mais da metade dos indivíduos (52%) da população de 2013, e 39% da população de 2014, tinham sobrepeso ou obesidade.

As repercussões clínicas associadas à atividade da SCD1 são controversas. Estudos demonstram associação da SCD1 com obesidade e DHGNA (PURI *et al.*, 2009), bem como efeitos da SCD1 na sensibilidade à insulina, tanto no seu aumento (RISÉRUS *et al.*, 2005) quanto na redução (NTAMBI e MIYAZAKI, 2004b). Interessantemente, houve uma associação negativa do AO com a glicemia na população de 2014. O AO exerce efeito na redução da glicemia e prevenção de DM2 por diversos mecanismos (REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020). Um destes mecanismos parece estar associado à prevenção do acúmulo de DAG e estímulo da atividade da diacilglicerol aciltransferase-2 (DGAT2), enzima determinante na síntese de triglicerídeos (COLL *et al.*, 2008). Dessa forma, o AO auxilia na redução da glicemia, mas possui efeito no aumento dos triglicerídeos, o que de fato foi observado na população de 2014 (aumento do AO, redução da glicemia e aumento dos triglicerídeos).

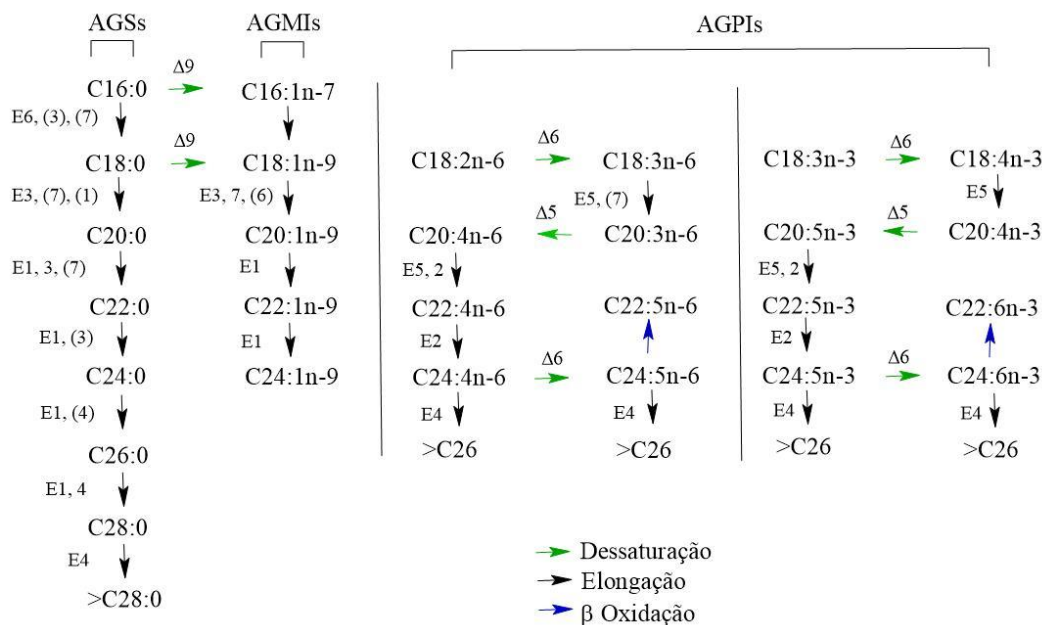
Embora não tenha sido observado um aumento no consumo alimentar de AGs essenciais, houve um aumento de AL nos eritrócitos nas duas populações e de forma mais expressiva na população de 2014, aumento de 42% (Tabela 11). Além das limitações dos inquéritos para avaliação da ingestão alimentar (SERRA-MAJEM *et al.*, 2012), as variações das quantidades de AGs essenciais nos alimentos naturais (SULLIVAN, WILLIAMS e MEYER, 2006) e processados (GANESAN, BROTHERSEN e MCMAHON, 2014) dificultam a mensuração dos AGs presentes nos alimentos. Marcadores biológicos são considerados melhores indicadores do *status* nutricional (SERRA-MAJEM *et al.*, 2012).

As variáveis preditoras com significância estatística e reprodutibilidade para o aumento do AO foram: AO, palmítico, palmitoleico, elaídico, eicosenoico, docosanoico, AL, retinol, e triglicerídeos. Menores níveis de AO no momento basal predizem um maior aumento na sua resposta à suplementação. Alguns dos AGs identificados como preditores são encontrados na manteiga de cacau e no leite em pó (MELO *et al.*, 2020; SEMENIUC *et al.*, 2008), que são ingredientes do Nestrovit®.

A síntese endógena de AO pode ter sido estimulada pela suplementação com a barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais, e os possíveis mecanismos são descritos nos parágrafos a seguir.

A síntese endógena dos AGMIs AO e palmitoleico é regulada pela atividade da SCD1 ($\Delta 9$ dessaturase) na dessaturação do esteárico e do palmítico, respectivamente (Figura 14) (PETER *et al.*, 2009; NTAMBI e MIYAZAKI, 2004a). Palmítico e palmitoleico, compartilham a mesma via metabólica do AO e por esta razão podem ter sido preditores do aumento do AO na resposta à suplementação. O palmítico, precursor de palmitoleico, pode ser dessaturado e posteriormente alongado para formar AO (Figura 14).

Figura 14 - Via metabólica dos ácidos graxos.



Fonte: Adaptado de Ohno *et al.* (2010).

O AG elaídico é um AG *trans* artificial produzido pela indústria alimentícia para promover textura, lubrificação e estrutura aos alimentos, conferindo maior estabilidade e tempo de prateleira (LONGHI, 2019). A indústria alimentícia utiliza a hidrogenação parcial de óleos vegetais no processamento dos alimentos e o óleo de soja é o mais utilizado neste processo. Durante a hidrogenação do óleo de soja, o AO sofre alteração de sua estrutura molecular e transforma-se em elaídico (LONGHI, 2019). Estudo experimental demonstrou que o elaídico regula o aumento da lipogênese *de novo* por meio do fator de transcrição SREBP-1, levando ao aumento da expressão de genes lipogênicos, incluindo *SCD1* (SHAO e FORD, 2014). Portanto,

o elaidico como preditor do aumento do AO na resposta à suplementação, pode estar relacionado à ativação da lipogênese.

O AO é encontrado abundantemente nos triglicerídeos de mamíferos (NAKAMURA e NARA, 2004) e é o substrato preferencial da DGAT, na síntese de triglicerídeos (NTAMBI e MIYAZAKI, 2004a; XU *et al.*, 2020). Esta relação pode explicar a predição do aumento do AO com o aumento dos triglicerídeos na resposta à suplementação.

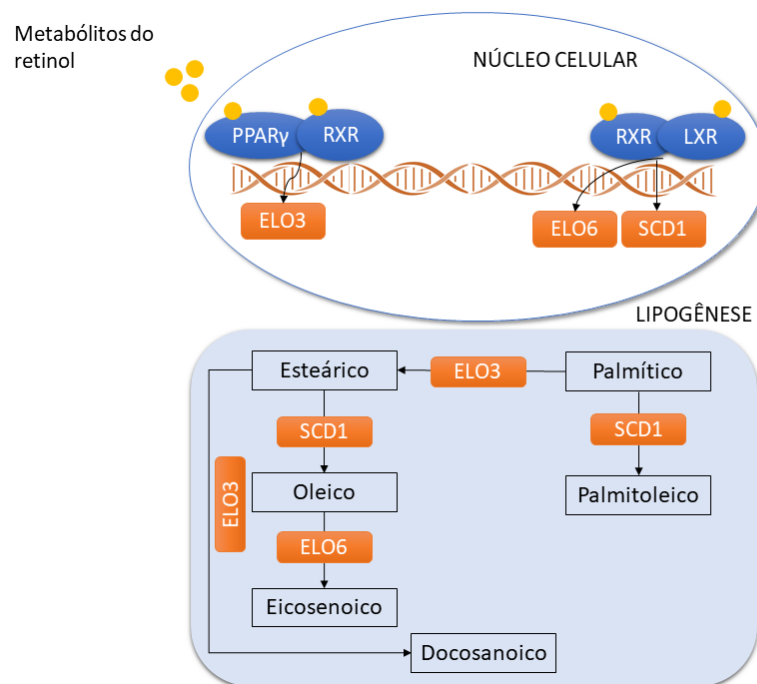
A ingestão de AL reduz a atividade da SCD1 (NTAMBI e MIYAZAKI, 2004a) e conseqüentemente diminui a síntese de AO. DHA e ARA possuem a capacidade de se ligarem ao RXR e, por heterodimerização com o RAR, ativa a transcrição de genes que regulam a redução da lipogênese (LI, CAI e BOYER, 2021). Em concordância com a literatura, no presente estudo foi encontrado uma associação inversa entre DHA e AO, onde menores níveis basais de DHA em 2014 se associaram com maiores aumentos no AO na resposta à suplementação (Tabela 21). Em contrapartida, o aumento de AL teve uma associação positiva com o aumento de AO na resposta à suplementação nos dois anos do estudo (Tabela 21). Cabe ressaltar que AO e AL são os principais AGs encontrados na alimentação, considerando um padrão de consumo alimentar ocidental (LONGHI, 2019; PICCININ *et al.*, 2019; WHELAN e FRITSCHÉ, 2013). Portanto, é possível que a associação encontrada para o AL e o AO seja reflexo do consumo alimentar destes AGs, embora não tenha sido observado pelo QSFA um aumento no consumo de AO ou de ômega-6 nas populações (Tabelas 4 e 5).

O docosanoico pode ser formado a partir da elongação do palmítico ou do esteárico, e o eicosenoico pode ser formado a partir da elongação do AO (Figura 14). A ELO3 catalisa a elongação de AGSs e AGMIs com 16, 18, 20 e 24 carbonos (SZANTO *et al.*, 2004; JAKOBSSON, JÖRGENSEN e JACOBSSON, 2005), e a ELO6 catalisa a elongação do AO na formação de eicosenoico (WEISS *et al.*, 2011). Heterodímeros LXR-RXR aumentam a transcrição de *Elo6* (WEISS *et al.*, 2011) e a ativação de PPAR γ aumenta a transcrição de *Elo3* (KOBAYASHI e FUJIMORI, 2012). A suplementação com vitaminas e minerais pode ter estimulado o processo de elongação na formação de docosanoico e eicosenoico a partir do AO (Figura 15). Os micronutrientes retinol e riboflavina participam deste mecanismo e também foram variáveis preditoras para o aumento do AO na resposta à suplementação. Os fatores de transcrição são ativados por metabólitos do retinol (MICHALIK e WAHLI, 2007; SZANTO e NAGY, 2005; WEISS *et al.*, 2011) e o processo de elongação exige a ação de flavinas como coenzimas nas reações de oxirredução (KIHARA, 2012; BENDER, 2003; JAKOBSSON, JÖRGENSEN e JACOBSSON, 2005).

Alguns nutrientes podem regular o aumento da atividade da SCD1, tais como carboidrato (LIU, STRABLE e NTAMBI, 2011), glicose (JONES *et al.*, 1998), frutose, vitamina D (LIU, STRABLE e NTAMBI, 2011), vitamina A (MILLER, WATERS e NTAMBI, 1997), colesterol (KIM *et al.*, 2002) e ferro (WU, BAYLIN e COLACINO, 2017). A vitamina A regula a transcrição de uma quantidade expressiva de genes (BLANER, 2019). Miller *et al.* (1997) testaram a suplementação de vitamina A em ratos com e sem deficiência de retinol e foi observado um aumento significativo na expressão da *Scd1* nos dois grupos.

Fatores de transcrição nuclear, como PPAR, SREBP, LXR e RXR, atuam na regulação da lipogênese (DESVERGNE, MICHALIK e WAHLI, 2006; WEISS *et al.*, 2011) e são ativados por metabólitos da vitamina A (WEISS *et al.*, 2011; SZANTO *et al.*, 2004) (MICHALIK e WAHLI, 2007; BLANER, 2019). Em estudo experimental, Weiss *et al.* (2011) demonstram que a SCD1, enzima determinante na dessaturação do esteárico à AO e do palmítico à palmitoleico, e a ELO6, enzima que atua na elongação do palmitoleico à vacênico e do AO à eicosenoico, aumentaram significativamente após ativação de RXR e LXR com ligantes sintéticos. Kobayashi e Fujimori (2012) observaram que o PPAR γ , ativado por ligantes sintéticos, está envolvido na expressão gênica de *Elo3*, que codifica a enzima que atua na elongação de AGSs (OHNO *et al.*, 2010).

Figura 15 - Mecanismos que explicam a relação da vitamina A com os ácidos graxos preditores do aumento do oleico.



Fonte: Elaboração própria.

A heterodimerização de fatores nucleares PPAR γ , LXR e RXR ativados por metabólitos do retinol, ativam a transcrição de genes que codificam SCD1, ELO3 e ELO6. O aumento do oleico está associado ao aumento da

SCD1 na conversão do esteárico à oleico. Além disso a SCD1 também atua na conversão do palmítico à palmitoleico. A atividade da ELO6 atua na elongação do palmitoleico à vacênico e do oleico à eicosenoico. A atividade da ELO3 atua na elongação do palmítico à esteárico e do esteárico à docosanoico. RXR: receptor retinoide X. LXR: *liver X receptor*, ou receptor hepático X. PPAR: *peroxisome proliferator activated receptor*. ELO: elongase.

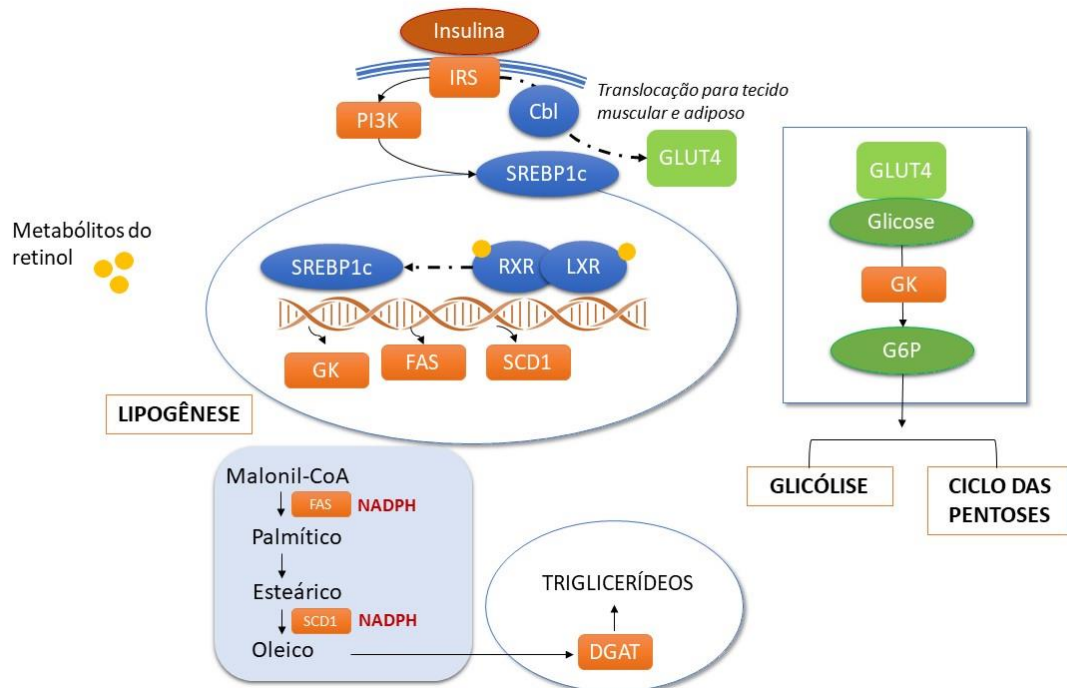
Outras variáveis preditoras para o aumento do AO que isoladamente não apresentaram significância estatística e replicabilidade nas populações, obtiveram significância estatística no modelo de regressão linear múltipla: glicemia, neutrófilos, hemoglobina corpuscular média (HCM), hematócrito, vitamina B2, além do consumo de vitamina B6, ferro e de vitamina C (Tabela 22).

A glicemia apresentou um coeficiente negativo nos modelos de seleção de variáveis (Tabelas 19 e 20) indicando que a redução da glicemia está associada ao aumento do AO nas populações. A redução significativa da glicemia após a suplementação com a barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais foi um resultado descrito no estudo de Mathias *et al.* (2018) com população do *Harmonized Micronutrient Project*.

O AO pode diminuir os níveis de glicemia por meio de um complexo mecanismo que envolve a ativação de um conjunto de fatores nucleares, incluindo LXR, SREBP e RXR (PALOMER *et al.*, 2018; DESVERGNE e WAHLI, 1999). RXR, ativado por 9cis-ácido retinoico, e o LXR, ativado por insulina (DESVERGNE, MICHALIK e WAHLI, 2006), são capazes de induzir a regulação de genes lipogênicos e glicolíticos por meio do fator de transcrição SREBP1c (DESVERGNE, MICHALIK e WAHLI, 2006; LI *et al.*, 2011). É possível que o retinol tenha exercido um mecanismo regulatório via transcrição gênica, contribuindo para o resultado observado na redução da glicemia. O mecanismo proposto para a relação da glicemia com o AO está descrito na Figura 16.

O próprio AO é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina, de maneira que pode contribuir para o efeito na redução da glicemia. Este mecanismo está associado à prevenção do acúmulo de DAG e controle da sinalização da resposta inflamatória (PALOMER *et al.*, 2018; REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020) (Figura 17).

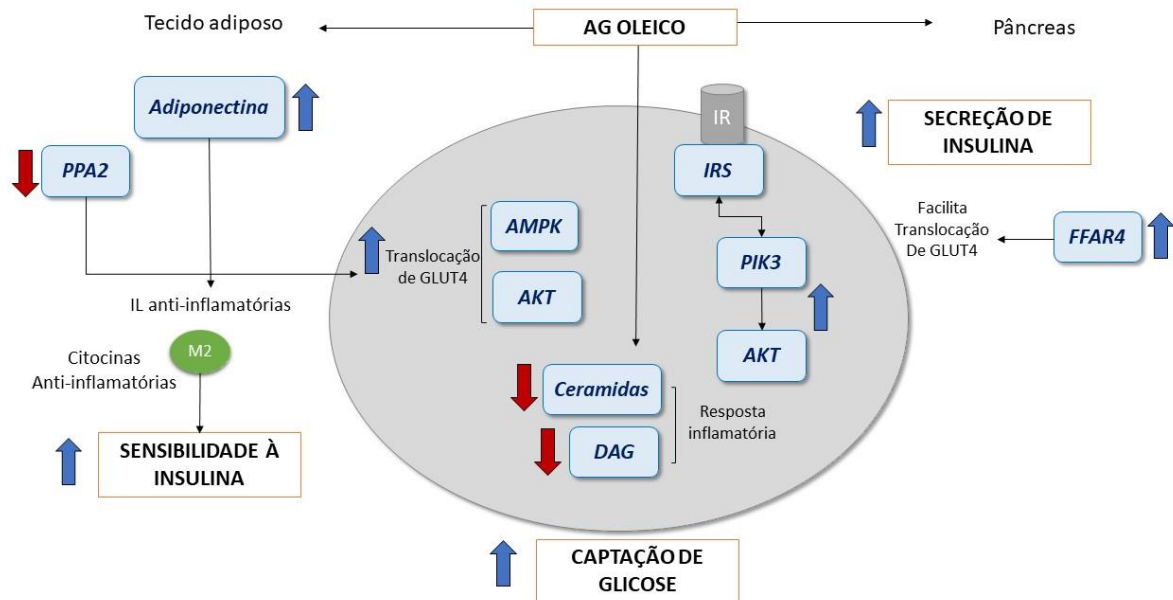
Figura 16 - Mecanismos que explicam a relação da vitamina A com a glicemia, os triglicerídeos e o ácido graxo oleico.



Fonte: Elaboração própria.

PI3K (regulado por insulina) induz a ativação de transcrição gênica regulado por SREBP1-c. LXR e RXR também são capazes de ativar SREBP1c, ativados por metabólitos do retinol, de maneira que há um aumento da expressão de genes lipogênicos como *FAS* e *SCD1*, bem como de genes glicolíticos como *GK*. A insulina também atua no aumento da atividade de GLUT4, por mecanismos ainda não elucidados. O GLUT4 é translocado pelo transportador Cbl (mecanismo regulado pela insulina) até o tecido muscular e adiposo (DESVERGNE, MICHALIK e WAHLI, 2006). A glicose é então metabolizada nas vias da glicólise e ciclo das pentoses. As enzimas *FAS* e *SCD1* são utilizadas na síntese de ácidos graxos, incluindo o ácido graxo oleico. O ácido graxo oleico é o principal substrato para a síntese de triglicerídeos. IRS: *insulin receptor substrate*; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; SREBP-1c: *sterol regulatory element binding protein-1c*; GK: glicoquinase; G6P: glicose-6 fosfato; SCD1: *stearoyl CoA desaturase 1*; LXR: *liver X receptor*; RXR: *retinoid X receptor*. DGAT: diacilglicerol aciltransferase.

Figura 17 – Regulação da glicemia exercida pelo ácido graxo oleico.



Fonte: Elaboração própria.

O ácido graxo oleico diminui a sinalização da via inflamatória por meio da inibição da síntese de ceramidas e DAG. O ácido graxo oleico aumenta a expressão de adiponectina e M2, que secretam interleucinas e citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para o aumento da sensibilidade à insulina. O ácido graxo oleico regula a diminuição de PPA2, evitando a desfosforilação de AKT e AMPK e induz a translocação de GLUT4. Por fim, o oleico atua na secreção de insulina por meio do aumento da expressão de FFAR4 (PALOMER et al., 2018; REHMAN, HAIDER e AKASH, 2020).

PPA2: proteína fosfatase 2A; IR: receptor de insulina; FFAR4: *free-fatty acid receptor-4*; M2: macrófago-2; AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato. DAG: diacilglicerol; PIK3: fosfatidilinositol 3-quinase; Akt: proteína quinase B; GLUT4: transportador de glicose 4; IRS: substratos do receptor de insulina.

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e possuem um papel importante na imunidade inata (ROSALES, 2018). O aumento exacerbado de neutrófilos pode levar a danos celulares. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram efeitos benéficos do AO na resposta inflamatória por meio da inibição da expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (CARRILLO, CAVIA e ALONSO-TORRE, 2012; PACHECO *et al.*, 2008). Menores níveis de neutrófilos após a suplementação foram associados ao aumento do AO na resposta à suplementação. É possível que esta associação esteja relacionada ao efeito do AO na modulação da resposta inflamatória. Contudo, os mecanismos que explicam essa relação necessitam de maiores investigações.

Sabe-se que a homeostase das hemácias é influenciada pelos níveis de glicose. (TAMARIZ *et al.*, 2008; ALAMRI *et al.*, 2019). A hiperglicemia está associada ao aumento de HCM (ALAMRI *et al.*, 2019). No presente estudo a redução da HCM esteve associada ao

aumento do AO na resposta à suplementação. Esta relação possa estar associada à resposta da glicemia. Mais estudos são necessários para compreender a associação do AO com as células hematológicas.

O nível plasmático de vitamina B2 como preditor da resposta do AO à suplementação, traz à tona o papel das vitaminas do complexo B no metabolismo dos AGMIs. As flavinas atuam como coenzimas doadoras de elétrons nas reações que envolvem citocromos (BENDER, 2003). A síntese de AO é regulada pela atividade da SCD1 que necessita de NADH, oxigênio e uma sequência de transporte de elétrons que compreende NADH-citocromo b5 redutase, citocromo b5 e SCD1 (NAKAMURA e NARA, 2004). Em modelos animais a deficiência de vitamina B2 reduziu os níveis de SCD1, embora não tenha sido encontrada associação com a enzima NADH-citocromo b5 redutase (OLPIN e BATES, 1982). Os mecanismos pelos quais a vitamina B2 exerce regulação no AO necessitam de mais estudos.

Alguns componentes dietéticos foram preditores da resposta do AO. A vitamina B6 e o ferro, provenientes da dieta livre somada à suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais, foram associados positivamente ao aumento do AO na resposta à intervenção. A vitamina B6 e o ferro regulam o aumento da atividade de dessaturases, incluindo a SCD1 que sintetiza o AO (ZHAO *et al.*, 2012; KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ, KLVANOVÁ e DUSINSKÁ, 2004). As dessaturases são enzimas que contêm ferro não-heme na sua estrutura molecular (NAKAMURA e NARA, 2004). Diante do exposto, é possível que o consumo de vitamina B6 e ferro estejam associados à síntese de AO por meio da atividade da SCD1. Essas associações devem ser demonstradas em mais estudos.

A ingestão alimentar de vitamina C apresentou associação negativa com o aumento do AO após a suplementação. Uma menor ingestão de vitamina C está associada a um maior incremento de AO na resposta à suplementação. Interessantemente a ingestão de vitamina C aumentou nas duas populações do estudo, contudo apenas na população de 2014 atingiu significância estatística (Tabelas 4 e 5). É importante ressaltar que normalmente há uma grande quantidade de variáveis de confusão na avaliação da ingestão alimentar e que, por isso, a vitamina C consumida pode não representar a vitamina C encontrada no plasma (FORD e NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY, 2003; WONG, CHIN e IMA-NIRWANA, 2020). Infelizmente não foram dosados metabólitos da vitamina C plasmática nas populações do estudo. A vitamina C é um dos cofatores envolvidos na biossíntese da carnitina, molécula determinante para a β -oxidação de AGs (JOHNSTON, CORTE e SWAN, 2006; HOPPEL, 2003; LONGO, FRIGENI e PASQUALI, 2016). O AO aumenta os níveis de CPT-1 que possui o papel de transportar os AGs para a β -oxidação

mitocondrial (PALOMER *et al.*, 2018). Outros estudos são necessários para avaliar a associação do consumo de vitamina C no perfil de AGMIs e os mecanismos de ação pelos quais ocorre esta relação.

6.2 ÁCIDO GRAXO DIHOMO-GAMA-LINOLÊNICO.

As variáveis preditoras para o aumento do DHGL na resposta à suplementação que atingiram significância estatística e replicabilidade nas populações foram: DHGL, mirístico, ARA, AO e AL. No modelo de regressão linear múltipla, o conjunto de variáveis preditoras não demonstrou replicabilidade nas populações para a predição do aumento do DHGL na resposta à suplementação.

O DHGL é majoritariamente sintetizado endogenamente pela ação da D6D sob o AL para formar gama-linolênico, seguido de alongação pela ELO5 para formar DHGL que, por sua vez, é incorporado nos fosfolipídios de membranas celulares. DHGL pode ser então convertido à ARA pela ação da D5D (WANG, LIN e GU, 2012) (Figura 14). Dessa forma, AL e ARA são, precursor e produto do DHGL, respectivamente, sendo essa a principal explicação para estes AGs como preditores do aumento do DHGL na resposta à suplementação.

Os AGs mirístico, pentadecílico e margárico são biomarcadores do consumo de leite e produtos lácteos (RIOUX, LEMARCHAL e LEGRAND, 2000; WOLK *et al.*, 1998; JENKINS, WEST e KOULMAN, 2015; POPPITT, 2020). A contribuição destes AGs para a predição do DHGL pode estar associada à presença do leite de vaca em pó na barra de leite utilizada para a suplementação de micronutrientes. Interessantemente, dentre os AGs biomarcadores do consumo de leite, o mirístico foi o único que atingiu significância estatística.

O AGS mirístico exerce um papel importante na regulação de uma variedade de funções biológicas, dentre as quais a transdução de sinais, tráfico vesicular e funções estruturais (RIOUX, LEMARCHAL e LEGRAND, 2000). Endogenamente, o mirístico pode ser rapidamente alongado para formar outros AGs, especialmente o palmítico (RIOUX, LEMARCHAL e LEGRAND, 2000), o que pode explicar a contribuição do palmítico como preditor no modelo. Além disso, o mirístico pode aumentar a atividade de todas as dessaturases por meio da miristoilação da enzima NADH-citocromo b5 redutase (RIOUX, PÉDRONO e LEGRAND, 2011), de maneira que ARA e AO podem ter sido preditores do DHGL sob a influência do mirístico.

6.3 ÁCIDOS GRAXOS ARAQUIDÔNICO E DOCOSAEXAENOICO.

As variáveis preditoras para a resposta do ARA foram o próprio ARA e o tetracosanoico. Níveis baixos de ARA no momento basal estão associados à um maior aumento de seus níveis na resposta à suplementação. O aumento do tetracosanoico está relacionado ao aumento do ARA na resposta à suplementação. ARA é o principal AGPI presente nos fosfolipídios de membranas celulares (LEVIN *et al.*, 2002).

A relação do tetracosanoico com o ARA pode ser explicada pela ação do ARA na elongação de AGs. A ELO-3 atua na formação do AG tetracosanoico (KIHARA, 2012) e o ARA exerce ação na ativação de PPAR γ (KOBAYASHI e FUJIMORI, 2012) que regula a transcrição de *Elo3* por meio da heterodimerização com RXR (Figura 15).

O AG nervônico foi preditor para o aumento do DHA na resposta à suplementação e esta relação também pode ser explicada pela ação do DHA na ativação de elongases. O DHA pode ligar-se ao PPAR γ (KORBECKI, BOBIŃSKI e DUTKA, 2019) e ativar ELO3 que participa da elongação do oleico para formar AG nervônico (KIHARA, 2012).

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Foi observado um aumento importante de AL e AAL após a suplementação em 2014, aumento de 42 e 33%, respectivamente (Tabela 11). Estes AGs são provenientes da dieta livre praticada pelos indivíduos, embora não tenha sido observado um aumento no consumo de ômega-3 e ômega-6 no questionário de frequência alimentar. Estes resultados evidenciam as limitações do uso de inquéritos alimentares para avaliar o *status* de AGs no organismo. Algumas dessas limitações estão relacionadas ao viés do autorrelato do consumo alimentar (SERRA-MAJEM *et al.*, 2012) e às variações da quantidade de AGs essenciais em alimentos *in natura* (SULLIVAN, WILLIAMS e MEYER, 2006) e processados (GANESAN, BROTHERSEN e MCMAHON, 2014). Marcadores biológicos tem sido cada vez mais aceitos como a melhor ferramenta para avaliação do consumo alimentar (SERRA-MAJEM *et al.*, 2012). Os AGs eritrocitários refletem o consumo alimentar de aproximadamente 120 dias (POTISCHMAN, 2003) e o questionário de frequência alimentar foi representativo do último mês, de maneira que é possível que o padrão alimentar pregresso possa ter influenciado nos resultados.

A quantidade de AGs presentes na barra de leite oferecida para a suplementação de micronutrientes é desconhecida, embora tenha-se evidências do perfil de AGs dos ingredientes descritos no produto. Os AGs presentes na barra de leite foram ofertados durante 42 dias e o perfil de AGs eritrocitários reflete o consumo alimentar de um período prévio maior (POTISCHMAN, 2003) de maneira que não se sabe qual a magnitude da influência do conteúdo de AGs do suplemento nos resultados.

Outras limitações do estudo dizem respeito à ausência de dosagem de hormônios o ao pequeno número de participantes do estudo. O metabolismo de AGs sofre influência de hormônios como glucagon, insulina, catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento (GH) (BHATHENA, 2006) e o número pequeno de participantes reduz o poder estatístico na seleção de variáveis preditoras.

Como pontos fortes deste estudo destacam-se a metodologia *N-of 1* aplicada em duas populações pediátricas distintas, que demonstrou resultados replicados e consistentes, e o fato de a intervenção ter sido realizada com alimento suplementado para atingir as recomendações dietéticas, de maneira que, do ponto de vista nutricional, representa condições reais nas populações. É importante que este estudo seja replicado em outras populações para confirmar os resultados aqui encontrados.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a reprodutibilidade do efeito da suplementação com barra de leite enriquecida com vitaminas e minerais no perfil de AGs em população pediátrica. A suplementação foi capaz de levar a um aumento nos AGs AO, DHGL, ARA e DHA e estes resultados foram replicados em duas populações distintas. Os preditores para o aumento destes AGs incluíram algumas vitaminas no plasma, componentes dietéticos e marcadores bioquímicos.

Na análise de regressão linear simples, os preditores que isoladamente explicam o aumento do AO na resposta à suplementação nas populações do estudo foram o aumento dos AGs palmítico, palmitoleico, elaídico, eicosenoico, docosanoico, AL, além do aumento do retinol e dos triglicerídeos. Foi observada uma associação negativa da resposta do AO com níveis basais de AO e triglicerídeos.

Outros preditores encontrados para a resposta do AO tais como glicemia, neutrófilos, riboflavina, marcadores hematológicos como hematócrito e HCM, bem como a ingestão alimentar de vitamina B6, vitamina C e ferro, são preditores que, de forma conjunta, explicam o aumento do AO nas populações.

Destaca-se a relação inversa entre a resposta da glicemia nos modelos de seleção de preditores para o aumento do AO, resultado que corrobora com achados na literatura quanto aos efeitos do AO na redução da glicemia e aumento da sensibilidade da insulina. Além disso, é possível que este mecanismo seja regulado e/ou potencializado por micronutrientes, com destaque para o retinol.

Os preditores para o aumento do ARA foram os AGs tetracosanoico e o próprio ARA. Níveis basais menores de ARA predizem um maior aumento do AG na resposta à suplementação. Os preditores para o aumento do DHA foram os AGs nervônico e o próprio DHA onde foi observada uma associação negativa com os níveis basais de DHA e uma associação positiva com o aumento do nervônico. É possível que o aumento do nervônico possa estar relacionado ao aumento do DHA por meio da ativação de elongases. O AG DHGL aumentou após a suplementação, contudo alguns preditores encontrados para o seu aumento responderam de forma diferente nas análises de regressão linear simples nas populações.

A suplementação com barra de leite enriquecida com micronutrientes em crianças e adolescentes de 9 a 13 anos de idade promoveu uma melhora no perfil de AGs desta população, e este resultado evidencia o potencial de uma dieta otimizada em micronutrientes na redução

de doenças crônicas não-transmissíveis, como as doenças cardiovasculares e o DM2, em uma perspectiva futura.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que a resposta metabólica dos AGs em uma intervenção nutricional é influenciada por múltiplas variáveis que devem ser consideradas para traçar melhores estratégias de aconselhamento nutricional em nível individual e populacional.

REFERÊNCIAS

- AIELLO, A. M. et al. Prevalence of Obesity in Children and Adolescents in Brazil: A Meta-analysis of Cross-sectional Studies. **Current Pediatric Reviews**, v. 11, n. 1, p. 36-42, 2015.
- AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **J Lipid Res.**, v. 54, n. 7, p. 1761-75, 2013.
- ALAMRI, B. N. et al. Hyperglycemia effect on red blood cells indices. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 23, n. 5, p. 2139-50, 2019.
- ALBERSEN, M. et al. Vitamin B6 in plasma and cerebrospinal fluid of children. **PLoS One.**, v. 10, n. 3, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356616/>>. Acesso em 17 jun 2022.
- ALBERTI, G.; GANA, J. C.; SANTOS, J. L. Fructose, Omega 3 Fatty Acids, and Vitamin E: Involvement in Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients.**, v. 12, n. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698421/>>. Acesso em 17 jun 2022.
- AMANULLAH, I. et al. Effect of vitamin E in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Postgrad Med J.**, v. 95, n. 1129, p. 601-611, 2019.
- AMENGUAL, J. et al. Retinoic acid treatment increases lipid oxidation capacity in skeletal muscle of mice. **Obesity (Silver Spring).**, v.16, n. 3, p. 585-91, 2008.
- AMES, B. N. Low micronutrient intake may accelerate the degenerative. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 47, p. 17589-94, 2006.
- ANWAR, A. et al. Quantitation of plasma thiamine, related metabolites and plasma protein oxidative damage markers in children with autism spectrum disorder and healthy controls. **Free Radic Res.**, v. 50, p.85-90, 2016, Supplement 1.
- ARORA, S. et al. Thiamine (vitamin B1) improves endothelium-dependent vasodilatation in the presence of hyperglycemia. **Ann Vasc Surg.**, v. 20, n. 5, p. 653-8, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA. **Critério de Classificação Econômica Brasil**. São Paulo: ABEP, 2014. Disponível em: <<https://www.abep.org/criterio-brasil>>.
- ASTRUP, A. et al. Saturated Fats and Health: A Reassessment and Proposal for Food-Based Recommendations: JACC State-of-the-Art Review. **J Am Coll Cardiol**, v. 76, n. 7, p. 844-857, 2020.
- ATAMNA, H. Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. **Ageing Res Rev.**, v.3, n. 3, p. 303-18, 2004.

AZZI , A. et al. Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1031, n. 0, p. 86-95, 2004.

BÁEZ-SALDAÑA, A. et al. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. **Am J Clin Nutr.**, v. 79, n. 2, p. 238-43, 2004.

BALK , E. M. et al. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 1, p. 19-30, 2006.

BELTRAMO, E.; MAZZEO , A.; PORTA, M. Thiamine and diabetes: back to the future? **Acta Diabetol.**, v. 58, n. 11, p.1433-39, 2021.

BENDER, D. Vitamin B2 – Riboflavin. In: BENDER, D. **Nutritional Biochemistry of the Vitamins**. Cambridge: Cambridge: Cambridge University Press, 2003, p. 172-199.

BHATHENA, S. J. Relationship between fatty acids and the endocrine and neuroendocrine system. **Nutr Neurosci.**, v. 9, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

BLANER, W. S. Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. **Pharmacol Ther.**, v. 197, n. 0, p. 153-178, 2019.

BLOK , W. L. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy volunteers fed various doses of fish oil for 1 year. **Eur J Clin Invest.**, v. 27, n. 12, p. 1003-8, 1997.

BLUMBERG, J. B. Vitamins: Preparing for the next 100 years. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 82, n. 5, p. 360-364, 2012.

BOUILLON, R. et al. The health effects of vitamin D supplementation: evidence from human studies. **Nat Rev Endocrinol**, v. 18, n. 2, p. 96-110, 2022.

BOWEN, K. J. et al. Diets Enriched with Conventional or High-Oleic Acid Canola Oils Lower Atherogenic Lipids and Lipoproteins Compared to a Diet with a Western Fatty Acid Profile in Adults with Central Adiposity. **J Nutr.**, v. 149, n. 3, p. 471-478, 2019.

BROUWER, I. A.; WANDERS, A. J.; KATAN, M. B. Effect of animal and industrial trans fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans--a quantitative review. **PLoS One**, v. 5, n. 3, 2010. Correção em: BROUWER, I. A.; WANDERS, A. J.; KATAN, M. B. Correction: Effect of animal and industrial trans fatty acids on hdl and ldl cholesterol levels in humans--a quantitative review. **PLoS One**, v.5, n.10, 2010. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/annotation/c4cf3127-89b2-4d58-abf3-ab0746342a90>>. Acesso em: 17 jun 2022.

BROUWER, I. A.; WANDERS, A. J.; KATAN, M. B. Trans fatty acids and cardiovascular health: research completed? **Eur J Clin Nutr**, v.67, n. 5, p. 541-547, 2013.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to fatty acids and lipids. In: CALDER, D. C.; WAITZBERG, D. L.; KOLETZKO, B. **Intravenous lipid emulsions**. v. 112. Basel: Karger, 2015, cap. 1, p. 1-16.

CAPO-CHICHI, C. D. et al. Concentrations of riboflavin and related organic acids in children with protein-energy malnutrition. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, n. 4, p. 978-86, 2000.

CARLSON, S. E.; COLOMBO, J. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid nutrition in early development. **Adv Pediatr.**, v. 63, n. 1, p. 453-471, 2016.

CARRILLO, C.; CAVIA, M. M.; ALONSO-TORRE, S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. **Nutr Hosp.**, v. 27, n. 4, p. 978-90, 2012.

CHAKRABARTI, A. et al. Impact of multi-micronutrient supplementation on lipidemia of children and adolescents. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 7, p. 2211-2219, 2020.

CHANG, E.; KIM, Y. Vitamin D decreases adipocyte lipid storage and increases NAD-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 702-708, 2016.

CHAUHAN, J.; DAKSHINAMURTI, K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. **J Biol Chem.**, v. 266, n. 16, p. 10035-8, 1991.

CHENG, L. et al. Arachidonic acid impairs hypothalamic leptin signaling and hepatic energy homeostasis in mice. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 412, n. 0, p. 12-18, 2015.

CHONG, M. F. et al. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. **Am J Clin Nutr.**, v. 87, n. 4, p. 817-23, 2008.

CHOWDHURY, R. et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v.160, n. 6, p. 398–406, 2014.

CLINICALTRIALS.GOV. ClinicalTrials.gov identifier number: NCT01823744. ClinicalTrials.gov, 2014. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01823744>>. Acesso em: 22 abril 2022.

COGGESHAL, J. C. et al. Biotin status and plasma glucose in diabetics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 447, n. 1, p. 389-392, 1985.

COLL, T. et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. **J Biol Chem.**, v. 283, n. 17, p.11107-16, 2008.

COLLI, A. S. Maturação sexual na população brasileira: limites de idade. **J. pediatr. (Rio J.)**, v.60, n. 4, p. 173-5, 1986.

DAKSHINAMURTI, K.; LI, W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. **Mol Cell Biochem.**, v. 132, n. 2, p. 127-32, 1994.

DAKSHINAMURTI, K.; CHEAH-TAN, C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. **Arch Biochem Biophys.**, v. 127, n. 1, p. 17-21, 1968.

DAKSHINAMURTI, K.; TARRAGO-LITVAK, L.; HONG, H. C. Biotin and glucose metabolism. **Can J Biochem.**, v. 48, n. 4, p. 493-500, 1970.

DANFORD, L. C.; SCHOELLER, D. A.; KUSHNER, R. F. Comparison of two bioelectrical impedance analysis models for total body water measurement in children. **Ann Hum Biol.**, v. 19, n. 6, p. 603-7, 1992.

DE LA VEGA, L. A.; STOCKERT, R. J. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 279, n. 6, p. C2037-42, 2000.

DEPEINT, F. et al. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1-2, p. 94-112, 2006.

DERAKHSHANDE-RISHEHRI, S. M. et al. Association of foods enriched in conjugated linoleic acid (CLA) and CLA supplements with lipid profile in human studies: a systematic review and meta-analysis. **Public Health Nutr.**, v. 18, n. 11, p. 2041-54, 2015.

DESTAILLATS, F.; CRUZ-HERNANDEZ, C. Fast analysis by gas-liquid chromatography. Perspective on the resolution of complex fatty acid compositions. **Chromatogr A.**, v. 1169, n. 1-2, p.175-8, 2007.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiol Rev.**, v. 86, n. 2, p. 465-514, 2006.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr Rev.**, v. 20, n. 5, p. 649-88, 1999.

DIRAISON, F. et al. Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). **Biochem J.**, v. 378, n. Pt 3, p.769-78, 2004.

EL-SAIED, H. M.; MORSI, M. K.; AMER, M. M. Composition of cocoa shell fat as related to cocoa butter. **Z Ernährungswiss.**, v. 20, n. 2, p. 145-51, 1981.

ENGLE-STONE, R. et al. Intraindividual double burden of overweight and micronutrient. **Am J Clin Nutr**, v. 112, p. 478-487, 2020. Supplement 1.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 1-76, 2017.

FENECH, M. F. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 5, p.1438-54, 2010, Supplement.

FERNANDEZ-MEJIA, C. Pharmacological effects of biotin. **J Nutr Biochem.**, v. 16, n. 7, p. 424-7, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation.** Rome: FAO Food Nutr Pap., v. 91, 2010. 166 p.

FORD, E. S.; NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY. C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. **Circulation.**, v. 108, n. 9, p. 1053-8, 2003.

FOROUHI, N. G. et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 10, p. 810-18, 2014.

FREY, S. K.; VOGEL, S. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. **Nutrients.**, v. 3, n. 1, p. 27-39, 2011.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FUKUCHI, S. et al. Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. **Exp Biol Med (Maywood).**, v. 229, n. 6, p. 486-93, 2004.

FUMAGALLI, F. et al. Validation of a food frequency questionnaire for assessing dietary nutrients in Brazilian children 5 to 10 years of age. **Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 427-32, 2008.

GANESAN, B.; BROTHERSEN, C.; MCMAHON, D. J. Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 54, n. 1, p. 98-114, 2014.

GARAULET, M. et al. Endocrine, metabolic and nutritional factors in obesity and their relative significance as studied by factor analysis. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 25, n. 3, p. 243-51, 2001.

GEORGIADI, A.; KERSTEN, S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. **Adv Nutr.**, v. 3, n. 2, p. 127-34, 2012.

GHOSH, A. et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n.50, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5530532/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

GIUSTINA, A. et al. Consensus statement from 2nd International Conference on Controversies in Vitamin D. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 21, n. 1, p. 89-116, 2020.

GONZÁLEZ-ORTIZ et al. Effect of thiamine administration on metabolic profile, cytokines and inflammatory markers in drug-naïve patients with type 2 diabetes. **Eur J Nutr.**, v. 50, n. 2, p. 145-149, 2011.

GRANTHAM-MCGREGOR, S. et al. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. **Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 60-70, 2007.

HAGEMAN, G. J.; STIERUM, R. H. Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. **Mutat Res.**, v. 475, n. 1-2, p. 45-56, 2001.

HEMMATI, M.; BABAEI, H.; ABDOLSALEHEI, M. Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in kermanshah in iran (2008-2009). **Oman Med J.**, v. 28, n. 3, p. 195-8, 2003.

HERTZ, R. et al. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. **Nature.**, v. 392, n. 6675, p. 512-6, 1998.

HESS, J.; SLAVIN, J. Snacking for a Cause: Nutritional Insufficiencies and Excesses of U.S. Children, a Critical Review of Food Consumption Patterns and Macronutrient and Micronutrient Intake of U.S. Children. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 4750-4759, 2014.

HEYWARD, V. H.; STOLARCZYK, L. M. **Applied body composition assessment.** Champaign, Illinois: Human Kinetics, 1996, 221p.

HOPPEL, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. **Am J Kidney Dis.**, v. 41, n. 4, p. 4-12, 2003. Supplement 4.

HOUTKOOPEL, L. B. et al. Bioelectrical impedance estimation of fat-free body mass in children and youth: a cross-validation study. **J Appl Physiol (1985).**, v. 72, n. 1, p. 366-73, 1992.

IMAMURA, F. et al. Fatty acid biomarkers of dairy fat consumption and incidence of type 2 diabetes: A pooled analysis of prospective cohort studies. **PLoS Med.**, v. 15, n. 10, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002670>. Acesso em 17 jun 2022.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride.** Washington, DC: The National Academies Press., 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.** Washington, DC: The National Academies Press., 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.** Washington, DC: The National Academies Press., 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.** Washington, DC: The National Academies Press., 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018. Análise do consumo alimentar.** Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 120 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018. Avaliação Nutricional da Disponibilidade.** Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 61 p.

JACOBSON, E. L. et al. Optimizing the energy status of skin cells during solar radiation. **J Photochem Photobiol B.**, v. 63, n. 1-3, p. 141-7, 2001.

JAKOBSSON, A.; JÖRGENSEN, J. A.; JACOBSSON, A. Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 289, n. 4, p.E517-26, 2005

JELLIFE, D. B. **Evaluacion del estado de nutricion de la comunidad:** sere de monografias. Ginebra: OMS, v. 53, 1968, 291p.

JENKINS, B.; WEST, J. A.; KOULMAN, A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease. **Molecules.** **Molecules.**, v. 20, n. 2, p. 2425-44, 2015.

JEYAKUMAR, S. M. et al. Vitamin A improves insulin sensitivity by increasing insulin receptor phosphorylation through protein tyrosine phosphatase 1B regulation at early age in obese rats of WNIN/Ob strain. **Diabetes Obes Metab.**, v.13, n. 10, p. 955-8, 2011.

JOHNSTON, C. S.; CORTE, C.; SWAN, P. D. Marginal vitamin C status is associated with reduced fat oxidation during submaximal exercise in young adults. **Nutr Metab (Lond).**, v. 3, n. 35, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1564400/#:~:text=Conclusion,in%20their%20weight%20loss%20attempts>>. Acesso em: 17 jun 2022.

JONES, B. H. et al. Glucose induces expression of stearyl-CoA desaturase in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem J**, v. 335, n. 2, p. 405-408, 1998.

JUMP, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene. **Curr Opin Lipidol.**, v. 13, n. 2, p. 155-164, 2002.

KAM, R. K. T. et al. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. **Cell & Bioscience**, v. 2, n. 11, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3325842/>>. Acesso em 17 jun 2022.

KELISHADI, R. et al. Effects of vitamin D supplementation on insulin resistance and cardiometabolic risk factors in children with metabolic syndrome: a triple-masked controlled trial. **J Pediatr (Rio J)**, v. 90, n. 1, p. 28-34, 2014.

KHAW, K. T.; LUBEN, R.; WAREHAM, N. Serum 25-hydroxyvitamin D, mortality, and incident cardiovascular disease, respiratory disease, cancers, and fractures: a 13-y prospective population study. **Am J Clin Nutr.**, v. 100, n. 5, p.1361-1370, 2014.

KIHARA, A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. **Biochem.**, v. 152, n. 5, p. 387-95, 2012.

KIM, H. J. et al. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 967, n. 0, p. 34-42, 2002.

KIM, W. et al. Polyunsaturated Fatty Acid Desaturation Is a Mechanism for Glycolytic NAD⁺ Recycling. **Cell Metab.**, v. 29, n. 4, p. 856-870, 2019.

KIRKLAND, J. B. Niacin and carcinogenesis. **Nutr Cancer.**, v. 46, n. 2, p. 110-8, 2003.

KOBAYASHI, T.; FUJIMORI, K. Very long-chain-fatty acids enhance adipogenesis through coregulation of Elovl3 and PPAR γ in 3T3-L1 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 302, n. 12, p. E1461-71, 2012.

KORBECKI, J.; BOBIŃSKI, R.; DUTKA, M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. **Inflamm Res.**, v. 68, n. 6, p. 443-458, 2019.

KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ, M.; KLVANOVÁ, J.; DUSINSKÁ, M. Polyunsaturated Fatty Acid Plasma Content in Groups of General Population with lowvitamin B6 or low iron serum levels. **Ann Nutr Metab.**, v. 48, n. 2, p. 118-21, 2004.

KUNESOVÁ, M. et al. Assessment of dietary and genetic factors influencing serum and adipose fatty acid composition in obese female identical twins. **Lipids.**, v. 37, n. 1, p. 27-32, 2002.

LEBOLD, K. M. et al. Novel liquid chromatography-mass spectrometry method shows that vitamin E deficiency depletes arachidonic and docosahexaenoic acids in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Redox Biol.**, v. 17, n. 2, p. 105-13, 2013.

LEBOLD, K. M.; TRABER, M. G. Interactions between α -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. **Free Radic Biol Med.**, v. 66, n. 0, p. 13-19, 2014.

LEE, B. L.; NEW, A. L.; ONG, C. N. Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinol, and major carotenoids in human plasma. **Clin Chem.**, v. 49, n. 12, p. 2056-66, 2003.

LEONARD, A. E. et al. Elongation of long-chain fatty acids. **Prog Lipid Res.**, v. 43, n. 1, p. 36-54, 2004.

LEVATTE, M. et al. Applications of Metabolomics to precision nutrition. **Lifestyle Genomics**, v. 15, n. 1, p.1-9, 2022.

LEVIN, G. et al. Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. **Biochem J.**, v. 365, n. Pt 2, p. 489-496, 2002.

LEWKOWICZ, N. et al. Naturally Occurring Nervonic Acid Ester Improves Myelin Synthesis by Human Oligodendrocytes. **Cells.**, v. 8, n. 786, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721595/>>. Acesso em 17 jun 2022.

LI, B.; CAI, S. Y.; BOYER, J. L. The role of the retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.**, v. 1867(5), n. 166085, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443921000181?via%3Dihub>>. Acesso em 17 jun. 2022.

LI, K. et al. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : a meta-analysis. **PLoS One.**, v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24505395/>>. Acesso em 17 jun 2022.

LI, Q. et al. A mini review of nervonic acid: Source, production, and biological functions. **Food Chemistry**, v. 301, n. 125286, 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125286>>. Acesso em 17 jun 2022.

LI, R. et al. Retinoids synergized with insulin to induce Srebp-1c expression and activated its promoter via the two liver X receptor binding sites that mediate insulin action. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 406, n. 2, p. 268-72, 2011.

LIM, J. H. et al. Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 10, p. 7117-26, 2013.

LIU, H.; XU, X.; LI, J. J. A Bootstrap Lasso + Partial Ridge Method to Construct Confidence Intervals for Parameters in High-dimensional Sparse Linear Models., 2017. Disponível em: <<https://arxiv.org/abs/1706.02150>>.

LIU, M. et al. Circulating Very-Long-Chain Saturated Fatty Acids Were Inversely Associated with Cardiovascular Health: A Prospective Cohort Study and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 9, 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551797/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

LIU, X.; STRABLE, M. S.; NTAMBI, J. M. Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress. **Adv Nutr.**, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2011.

LIU, Y. Y. et al. The effects of biotin deficiency on organic acid metabolism: increase in propionyl coenzyme A-related organic acids in biotin-deficient rats. **Metabolism.**, v. 42, n. 11, p. 1392-7, 1993.

LONGHI, R. Trans fatty acid in the liver and central nervous system. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Dietary Interventions in Liver Disease: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements**. London: Elsevier Academic Press, 2019. cap. 23, p. 275-286.

LONGO, N.; FRIGENI, M.; PASQUALI, M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1863, n. 10, p. 2422-35, 2016.

LUKASKI, H. C. et al. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. **J Appl Physiol (1985)**, v. 60, n. 4, p. 1327-32, 1986.

MA, D. W. L. et al. Conjugated linoleic acid in canadian dairy and beef products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 5, p. 1956-1960, 1999.

MAEBASH, M. et al. Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition.**, v. 14, n. 3, p. 211-218, 1993.

MALIK, V. S. et al. Circulating Very-Long Chain Saturated Fatty Acids and Incident Coronary Heart Disease in U.S. Men and Women, **Circulation**, v. 132, n. 4, p. 260-268, 2015.

MÅNSSON, H. L. Fatty acids in bovine milk fat. **Food Nutr Res.**, 52, n. 10.3402/fnr.v52i0.1821, 2008. Disponível em: <<https://foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1134>>. Acesso em: 17 jun. 2022.

MARTIN, S. A.; BRASH, A. R.; MURPHY, R. C. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. **J Lipid Res.**, v. 57, n. 7, p. 1126-32, 2016.

MASOOD, A.; STARK, K. D.; SALEM, N. J. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. **J Lipid Res.**, v. 46, n. 10, p. 2299-305, 2005.

MASSARO, M. et al. Effects of olive oil on blood pressure: epidemiological, clinical, and mechanistic evidence. **Nutrients.**, v.12, n. 6, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7352724/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

MATHIAS, M. G. et al. Clinical and Vitamin Response to a Short-Term Multi-Micronutrient Intervention in Brazilian Children and Teens: From Population Data to Interindividual Responses. **Mol Nutr Food Res.**, v. 62, n. 6, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29368422/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

MATTHEWS, K. A. et al. Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats. **J Nutr.**, v. 134, n. 8, p. 1958-63, 2004.

MAYNE, S. T.; FERRUCCI, L. M.; CARTMEL, B. Lessons learned from randomized clinical trials of micronutrient supplementation for cancer prevention. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 32, n. 0, p. 369-390, 2012.

MCCARTHY, H. D. et al. Body fat reference curves for children. **Int J Obes (Lond).**, v. 30, n. 4, p. 598-602, 2006.

MEE, R. W.; CHUA, T. C. Regression Toward the Mean and the Paired Sample t Test. **The American Statistician**, v. 45, n. 1, p. 39-42, 1991.

MEHMOOD, Z. H.; PAPANDREOU, D. An Updated Mini Review of Vitamin D and Obesity: Adipogenesis and Inflammation State. **Open Access Maced J Med Sci.**, v. 4, n. 3, p. 526-532, 2016.

MEISSER REDEUIL, K. et al. Simultaneous quantification of 21 water soluble vitamin circulating forms in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A.**, v. 1422, n. 0, p. 89-98, 2015.

MELO, C. W. B. et al. Chemical composition and fatty acids profile of chocolates produced with different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars. **Food Sci. Technol.**, v. 40, n. 2, 326-333, 2020.

MICHALIK, L.; WAHLI, W. Guiding ligands to nuclear receptors. **Cell.**, v. 129, n. 4, 649-51, 2007.

MILLER, C. W.; WATERS, K. M.; NTAMBI, J. M. Regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 231, n. 1, p. 206-10, 1997.

MOCK, D. et al. Lymphocyte propionyl-CoA carboxylase and accumulation of odd-chain fatty acid in plasma and erythrocytes are useful indicators of marginal biotin deficiency small star, filled. **J Nutr Biochem.**, v.13, n. 8, p. 462-470, 2002.

MONTEIRO, J. et al. **Consumo alimentar - Visualizando Porções**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 92 p.

MONTEIRO, J. P.; KUSSMANN, M.; KAPUT, J. The genomics of micronutrient requirements. **Genes Nutr.**, v. 10, n. 19, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434349/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire**, v. 24, n. 0, p. 105-123, 2002.

MOREIRA-LUCAS, T. S. et al. Effect of vitamin D supplementation on oral glucose tolerance in individuals with low vitamin D status and increased risk for developing type 2 diabetes (EVIDENCE): A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Diabetes Obes Metab**, v. 19, n. 1, p. 133-141, 2017.

MOZAFFARIAN, D. et al. Trans fatty acids and cardiovascular disease. **N Engl J Med.**, v. 354, n. 15, p. 1601-1613, 2006.

MOZAFFARIAN, D.; CLARK, R. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 22-33, 2009, Supplement 2.

NAGAO, M.; TANAKA, K. FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. **J Biol Chem.**, v. 267, n. 25, p. 17925-32, 1992.

NAGASHIMADA, M.; OTA, T. Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease. **IUBMB Life**, v.71, n. 4, p. 516-522, 2019.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. **Annu Rev Nutr.**, v. 24, n.0, p. 345-76, 2004.

NANDI, A.; WADHWANI, N.; JOSHI, S. R. Vitamin D deficiency influences fatty acid metabolism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, v. 140, n. 0, p. 57-63, 2019.

NESTLÉ Health Science. **Nestlé Health Science**. Disponível em: <<https://www.nestlehealthscience.ch/fr/produits/nestrovit/fr>>. Acesso em: 27 abr. 2022.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Prog Lipid Res.**, v. 43, n. 2, p. 91-104, 2004.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Recent insights into stearyl-CoA desaturase-1. **Curr Opin Lipidol.**, v. 14, n. 3, p. 255-61, 2004.

NUERNBERG, K. et al. Metabolic responses to high-fat diets rich in n-3 or n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in mice selected for either high body weight or leanness explain different health outcomes. **Nutr Metab (Lond)**., v. 8, n. 1, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169453/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

OHNO, Y. et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, n. 43, p. 18439-44, 2010.

OKADA, T. et al. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. **Am J Clin Nutr.**, v. 82, n. 4, p. 747-50, 2005.

OLPIN, S. E.; BATES, C. J. Lipid metabolism in riboflavin-deficient rats. 2. Mitochondrial fatty acid oxidation and the microsomal desaturation pathway. **Br J Nutr.**, v. 47, n. 3, p. 589-96, 1982.

ONIS, M. et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, n. 9, p. 660-67, 2007.

OU, J. et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 11, p. 6027-32, 2001.

PACHECO, Y. M. et al. A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 and sVCAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects. **J Nutr Biochem.**, v. 19, n. 3, p. 200-5, 2008.

PALMIERI, V. O. et al. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. **J Nutr.**, v. 136, n. 12, p. 3022-6, 2006.

PALOMER, X. et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 29, n. 3, p. 178-190, 2018.

PATEL, P. S. et al. Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Am J Clin Nutr**, v. 92, n. 5, p. 1214-1222. 2010.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 297, n. 1, p. E28-37, 2009.

PETER, A. et al. Hepatic lipid composition and stearyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. **Clin Chem.**, v. 55, n. 12, p. 2113-20, 2009.

PHILLIPS, C. M. et al. Leptin receptor polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to augment risk of insulin resistance and metabolic syndrome in adults. **J Nutr.**, v. 140, n. 2, p. 238-44, 2010.

PICCININ, E. et al. Role of Oleic Acid in the Gut-Liver Axis: From Diet to the Regulation of Its Synthesis via Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1). **Nutrients.**, v. 11(10), n. 2283, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31554181/>>. Acesso em: 17 jun. 2022

PINTI, M. V. et al. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 316, n. 2, p. 268-285, 2019.

POPPITT, S. D. Cow's Milk and Dairy Consumption: Is There Now Consensus for Cardiometabolic Health? **Frontiers in Nutrition**, v. 7, n. 574725, p.1-22, 2020.

POTISCHMAN, N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. **J Nutr.**, v. 133, p. 875-880, 2003, Supplement 3.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **Am J Clin Nutr.**, v. 77, n. 6, p. 1352-60, 2003.

PURI, P. et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology.**, v. 50, n. 6, 1827-38, 2009.

QIAN, F. et al. Metabolic Effects of Monounsaturated Fatty Acid-Enriched Diets Compared With Carbohydrate or Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Diets in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **Diabetes Care.**, v. 39, n. 8, p. 1448-57, 2016.

RAUTIAINEN, S. et al. Dietary supplements and disease prevention - a global overview. **Nat Rev Endocrinol.**, v.12, n. 7, p. 407-20, 2016.

REDDI, A. et al. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. **Life Sci.**, v. 42, n. 13, p. 1323-30, 1988.

REHMAN, K.; HAIDER, K.; AKASH, M. S. H. Current perspectives of oleic acid: Regulation of molecular pathways in mitochondrial and endothelial functioning against insulin resistance and diabetes. **Rev Endocr Metab Disord.**,v. 21, n. 4, p. 631-43, 2020.

REVILLA-MONSALVE, C. et al. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. **Biomed Pharmacother.**, v. 60, n. 4, p. 182-85, 2006.

RIMBACH, G. et al. Regulation of cell signalling by vitamin E. **Proc Nutr Soc.**, v. 61, n. 4, p. 415-25, 2002.

RIOS-AVILA, L. et al. Metabolite Profile Analysis Reveals Association of Vitamin B-6 with Metabolites Related to One-Carbon Metabolism and Tryptophan Catabolism but Not with Biomarkers of Inflammation in Oral Contraceptive Users and Reveals the Effects of Oral. **The Journal of Nutrition.**, v. 145, n. 1, p. 87-95, 2015.

RIOUX, V.; LEMARCHAL, P.; LEGRAND, P. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. **J Nutr Biochem.**, v. 11, n. 4, p. 198-207, 2000.

RIOUX, V.; PÉDRONO, F.; LEGRAND, P. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1811, n. 1, p. 1-8, 2011.

RISÉRUS, U. et al. Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Diabetes.**, v.54, n. 5, 1379-84, 2005.

ROMERO-NAVARRO, G. et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. **Endocrinology.**, v.140, n. 10, p. 4595-600, 1999.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Front Physiol.**, v. 9, n. 113, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5826082/#:~:text=Neutrophils%2C%20also%20known%20as%20polymorphonuclear,1011%20cell%20per%20day>>. Acesso em: 17 jun 2022.

RYAN, J. W.; ANDERSON, P. H.; MORRIS, H. A. Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptors - Adequate Activation for Multiple Health Outcomes. **Clin Biochem Rev.**, v. 36, n. 2, p. 53-61, 2015.

SCHUTZ, Y. Concept of fat balance in human obesity revisited with particular reference to de novo lipogenesis. **Int J Obes**, v. 28, p. S3–S11, 2004, Supplement.

SCOTT-BOYER, M. P. et al. A network analysis of cofactorprotein. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19633, 2016. Disponível em:< <https://www.nature.com/articles/srep19633>>. Acesso em: 17 jun 2022.

SEMENIUC, C. et al. Fatty acids profile of two types of dry dairy products: whole milk powder and infant formula to obtaining. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies.**, v. 14, n. 1, 133-136, 2008.

SERGI, D. et al. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. **Front Physiol.**, v. 10, n. 532, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6510277/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

SERRA-MAJEM, L. et al. Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. **Br J Nutr.**, v. 107, p.64-76, 2012, Supplement 2.

SHAO, F.; FORD, D. A. Elaidic acid increases hepatic lipogenesis by mediating sterol regulatory element binding protein-1c activity in HuH-7 cells. **Lipids.**, v. 49, n. 5, p. 403-13, 2014.

SHENKIN, A. Micronutrients in health and disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 0, p. 559-567, 2006.

SOKORO, A. A. et al. Simple method for the quantitative analysis of endogenous folate catabolites p-aminobenzoylglutamate (pABG) and its acetamido (apABG) derivative in human serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 832, n. 1, p. 9-16, 2006.

STRACKE, H.; LINDEMANN, A.; FEDERLIN, K. A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, v. 104, n. 4, p. 311-6, 1996.

STRACKE, H. et al. Benfotiamine in diabetic polyneuropathy (BENDIP): results of a randomised, double blind, placebo-controlled clinical study. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, v. 116, n. 10, p. 600-5, 2008.

SULLIVAN, B. L.; WILLIAMS, P. G.; MEYER, B. J. Biomarker validation of a long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid food frequency questionnaire. **Lipids.**, v. 41, n. 9, p. 845-50, 2006.

SZANTO, A. et al. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. **Cell Death Differ.**, v. 11, p. 126-43, 2004. Supplement 2.

SZANTO, A.; NAGY, L. Retinoids potentiate peroxisome proliferator-activated receptor gamma action in differentiation, gene expression, and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. **Mol Pharmacol.**, v. 67, n. 6, p. 1935-43, 2005.

TABESH, M. et al. Effects of calcium-vitamin D co-supplementation on metabolic. **Diabetologia**, v. 57, n. 0, p. 2038-47, 2014.

TAMARIZ, L. J. et al. Blood viscosity and hematocrit as risk factors for type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Am J Epidemiol.**, v. 168, n. 10, p. 1153-60, 2008.

TANNER, J. M. **Growth at adolescence**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1962.

TANOURY, Z. A.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1761-75, 2013.

THEOBALD, H. E. et al. Low-dose docosahexaenoic acid lowers diastolic blood pressure in middle-aged men and women. **J Nutr.**, v. 137, n. 4, p. 973-8, 2007.

THEODOSIOU, M.; LAUDET, V.; SCHUBERT, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, n.9, p. 1423-45, 2010.

TIBSHIRANI, R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 58, n. 1, p. 267-88, 1996.

TORQUATO, P. et al. Nutritional and lipidomics biomarkers of docosahexaenoic acid-based multivitamin therapy in pediatric NASH. **Sci Rep.**, v. 9, n. 2045, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-37209-y>>. Acesso em: 17 jun 2022.

U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Second National Report on Biochemical Indicators of Diet and Nutrition in the U.S. Population 2012**. Atlanta (GA): National Center for Environmental Health, 2012.

VALÉRIO et al. Lipophilic thiamine treatment in long-standing insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetol**, v. 36, n. 1-2, p. 73-76, 1999.

VALK, E. E. J.; HORNSTRA, G. Relationship Between Vitamin E Requirement and Polyunsaturated Fatty Acid Intake in Man: a Review. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 70, n. 2, p. 31-42, 2000.

VAN DER WURFF, I. S. M.; MEYER, B. J.; DE GROOT, R. H. M. Effect of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (n-3 LCPUFA) Supplementation on Cognition in Children and Adolescents: A Systematic Literature Review with a Focus on n-3 LCPUFA Blood Values and Dose of DHA and EPA. **Nutrients**, v. 12, n. 10, 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7599612/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

WANG, L. et al. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 1, p. 91-98, 2003.

WANG, X.; LIN, H.; GU, Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. **Lipids Health Dis.**, v. 11, n. 25, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3295719/>>. Acesso em: 17 jun 2022.

WARENSJÖ, E.; RISÉRUS, U.; VESSBY, B. Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. **Diabetologia**, v. 48, n. 10, p. 1999-2005, 2005.

WEBER, P.; BENDICH, A.; MACHLIN, L. J. Vitamin E and human health: rationale for determining recommended intake levels. **Nutrition**, v. 13, n. 5, p. 450-60, 1997.

WEISS, K. et al. Effect of synthetic ligands of PPAR α , β/δ , γ , RAR, RXR and LXR on the fatty acid composition of phospholipids in mice. **Lipids**, v. 46, n. 11, p. 1013-20, 2011.

WHELAN, J.; FRITSCHKE, K. Linoleic acid. **Adv Nutr**, v. 4, n. 3, 311-2, 2013.

WHITTAKER, J.; THOMPSON, R.; DENHAM, M. Marker-assisted selection using ridge regression. **Genet. Res., Camb.**, v. 75, n. 2, p. 249-252, 2000.

WINKLER, G. et al. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. **Arzneimittelforschung**, v. 49, n. 3, p. 220-24, 1999.

WOLK, A. et al. Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 2, p. 291-95, 1998.

WONG, M.; LODGE, J. K. A metabolomic investigation of the effects of vitamin E supplementation in humans. **Nutrition & Metabolism** volume, v. 9, n. 110, 2012. Disponível em: < <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-9-110>>. Acesso em: 17 jun 2022.

WONG, S. K.; CHIN, K. Y.; IMA-NIRWANA, S. Vitamin C: A Review on its Role in the Management of Metabolic Syndrome. **Int J Med Sci.**, v. 17, n. 11, p.1625-38, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Assessing the iron status of populations.** Geneva: WHO, 2004. 108 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on food fortification with micronutrients.** Geneva: WHO, 2006. 341 p.

WU, Y.; BAYLIN, A.; COLACINO, J. A. Iron, Oxidative Stress, and $\Delta 9$ Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Index (C16:1/C16:0): An Analysis Applying the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-04. **Curr Dev Nutr.**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2017.

XU, C. et al. Identifying Lipid Metabolites Influenced by Oleic Acid Administration Using High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Lipidomics. **ACS Omega.**, v. 5, n. 20, p.11314-23, 2020.

XU, H. E. et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell.**, v. 3, n. 3, p. 397-403, 1999.

YAKOUB, M. Y.; LO, W. C. Nutrition (Micronutrients) in Child Growth and Development: A Systematic Review on Current Evidence, Recommendations and Opportunities for Further Research. **J Dev Behav Pediatr.**, v. 38, n. 8, p. 665-79, 2017.

YANG, T.-S.; LIU, T.-T. J. Optimization of Production of Conjugated Linoleic Acid from Soybean Oil. **Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 16, p. 5079-84, 2004.

ZHANG, H. et al. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).**, v. 42, n. 6, p. 517-26, 1996.

ZHAO, S. et al. Roles of vitamin A status and retinoids in glucose and fatty acid metabolism. **Biochem Cell Biol.**, v. 90, n. 2, p. 142-52, 2012.

ZIMITAT, C.; NIXON, P. F. Glucose loading precipitates acute encephalopathy in thiamin-deficient rats. **Metab Brain Dis.**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 1999.

ZINGG, J. M.; MEYDANI, M. Interaction Between Vitamin E and Polyunsaturated Fatty Acids. In: WEBER, P., et al. **Vitamin E in Human Health. Nutrition and Health.** Switzerland: Humana Press, Cham, 2019. cap. 11, p. 141-159.

ZIOUZENKOVA, O.; PLUTZKY, J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. **FEBS Lett.**, v. 582, n. 1, p. 32-38, 2008.

ZOU, H.; HASTIE, T. Regularization and Variable Selection via the Elastic Net. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Statistical Methodology).**, v. 67, n. 2, p. 301–20, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - COMPOSIÇÃO DA BARRA DE LEITE (NESTROVIT - NESTLÉ®)

Tabela 1 - Composição da barra de leite (Nestrovit - NESTLÉ®).

Micronutrientes	Barras de leite (10g) ^a	Barras de leite (15g) ^b	DRIS ^c		UL ^d	
			9 a 13 anos		9 a 13 anos	
			Meninos	Meninas	Meninos	Meninas
Vitamina A	534µg	801µg	600µg	600µg	1700µg	1700µg
Vitamina E	6,6mg	9,9mg	11mg	11mg	600mg	600mg
Folato	133,3µg	200µg	300µg	300µg	600µg	600µg
Vitamina B1	0,93mg	1,4mg	0,9mg	0,9mg	-	-
Vitamina B2	1,17mg	1,76mg	0,9mg	0,9mg	-	-
Niacina	12mg	18mg	12mg	12mg	20mg	20mg
Vitamina B6	1,33mg	2mg	1,0mg	1,0mg	60mg	60mg
Vitamina B12	0,73µg	1,1µg	1,8µg	1,8µg	-	-
Vitamina D3	3,4µg	5,1µg	5,0µg	5,0µg	50µg	50µg
Vitamina C	40mg	60mg	45mg	45mg	1200mg	1200mg
Biotina	13,3µg	150µg	20µg	20µg	-	-
Pantotenato	4mg	6mg	4mg	4mg	-	-
Cálcio	191,3mg	287mg	1300mg	1300mg	2500mg	2500mg
Fósforo	144,6mg	217mg	1250mg	1250mg	4000mg	4000mg
Ferro	4,3mg	6,5mg	8mg	8mg	40mg	40mg
Magnésio	83,3mg	125mg	240mg	240mg	350mg	350mg
Zinco	5,3mg	6mg	8mg	8mg	23mg	23mg

^aReferente a 2 Barras de leite (10g): 51,3kcal, 4,4g de carboidratos, 0,5g de proteína e 3,4g de lipídeos. ^bReferente a 3 Barras de leite (15g): 77kcal, 6,7g de carboidratos, 0,8g de proteína e 5,2g de lipídeos. ^cDRIS: *Dietary Reference Intakes* (ingestão dietética de referência); ^dUL: *Upper Intake Levels* (níveis máximos de ingestão diária recomendada).

ANEXO B – QUESTIONÁRIO SEMI-QUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Nome / Número de Identificação:						
Idade:		Sexo: (1) masculino		(2) feminino		
Grupo do leite e derivados	Quantas vezes você come	Unidade	P25	P50	P75	CODIF.
		1 2 3	P(1)	M(2)	G(3)	
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200 ml -----	240ml -----	250ml	
Leite desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200 ml -----	240ml -----	250ml	
logurte natural Integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	80ml -----	120ml -----	140ml	
logurte com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	80ml -----	120ml -----	140ml	
Queijo fresco ou ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g -----	20g -----	25g	
Queijos amarelos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g -----	15g -----	25g	
Requeijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g -----	15g -----	30g	
Grupo dos pães e cereais matinais	Quantas vezes você come	Unidade	P25	P50	P75	CODIF.
		1 2 3	P(1)	M(2)	G(3)	
Pão francês, forma, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25 g -----	50g -----	75g	
Pão doce, queijo, croissant	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25 g -----	50g -----	60g	
Biscoitos doces/ salgados ou torradas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30 g -----	52g -----	65g	
Aveia, granola, barra de cereais e sucrilhos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g -----	38g -----	40g	
Gorduras	Quantas vezes você come	Unidade	P25	P50	P75	CODIF.
		1 2 3	P(1)	M(2)	G(3)	
Margarina comum	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4 g -----	6g -----	10g	
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4 g -----	6g -----	8,5g	

Maionese	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12g ----- 27g ----- 35g	
Cereais, tubérculos e massas	Quantas vezes você come		P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g ----- 75g ----- 100g	
Batata, Mandioca Polenta fritas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 65g ----- 112g	
Batata, mandioca, polenta (não fritos)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30 g ----- 50g ----- 100 g	
Milho verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	48g ----- 66g ----- 103g	
Massas: macarrão, lasanha, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g.----- 125g ----- 200g	
Salgados e tortas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	48g ----- 80g ----- 96g	
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g ----- 125g ----- 180g	
Farofa, farinha de milho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g ----- 20g ----- 30g	
Grupo das frutas	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Laranja, tangerina, pokan	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	90g ----- 107g ----- 180g	
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	40g ----- 65g ----- 120g	
Maçã, pera	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g ----- 80g ----- 110g	
Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g ----- 117g ----- 135g	
Melancia, Melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	81g ----- 132g ----- 150g	
Uva, abacaxi e goiaba na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	95g ----- 116g ----- 170g	
Manga e caqui na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 40g ----- 60g	
Outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g ----- 25g ----- 60g	
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 250ml	
Suco de outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165 ml ----- 200ml ----- 250ml	

Grupo das leguminosas	Quantas vezes você come		P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Feijão roxo, carioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	34g -----	65g -----	70g	
Feijoada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g -----	140g -----	225g	
Grupo de verduras e legumes	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Alface, escarola, agrião, rúcula, almeirão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g -----	35g -----	40g	
Repolho, acelga, couve e espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	23,5g -----	33g -----	50g	
Couve-flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g -----	32g -----	56g	
Cenoura, abóbora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	11g -----	20g -----	30g	
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g -----	37g -----	44g	
Berinjela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g -----	30g -----	62,5g	
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	18g -----	30g -----	48g	
Vagem, chuchu, abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12,5g -----	25g -----	40g	
Sopas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	182g -----	290g -----	325g	
Grupo das carnes e ovos	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Carne bovina sem gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g -----	80g -----	100g	
Carne bovina com gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g -----	80g -----	100g	
Carne de Porco s/ Gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g -----	80g -----	100g	
Carne de Porco c/ Gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g -----	80g -----	100g	
Carne de frango ou de outras aves sem pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	46g -----	90g -----	125g	
Carne de frango ou de outras aves com pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	46g -----	90g -----	125g	

Peixes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 100g ----- 165g	
Linguiça, salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 60g ----- 120g	
Ovo cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 50g ----- 75g	
Ovo frito	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 62g ----- 90g	
Presunto, mortadela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g ----- 15g ----- 25g	
Grupo das bebidas	Quantas vezes você come	Unidade	P25 P50 P75	CODIF.
		1 2 3	P(1) M(2) G(3)	
Café com açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50ml ----- 100ml	
Chá preto ou mate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	85ml ----- 165ml ----- 200ml	
Chá de ervas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	85ml ----- 165ml ----- 200ml	
Água	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 240ml	
Sucos artificiais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 240ml	
Refrigerante diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100ml ----- 165ml ----- 250ml	
Refrigerante normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 240ml	
Refrigerante fosfatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 240ml	
Grupo de doces e miscelâneas	Quantas vezes você come	Unidade	P25 P50 P75	CODIF.
		1 2 3	P(1) M(2) G(3)	
Bolo, tortas, pavês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 50g ----- 60g	
Chocolate ou brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 30g ----- 42g	
Mel ou geleia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	9g ----- 13,5g ----- 18g	
Sorvetes, milkshake	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	70g ----- 115g ----- 160g	
Pudins, doces com leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 65g ----- 80g	
Doces de frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 40g ----- 55g	
Pipoca, Chips, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 50g ----- 75g	
Açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12g ----- 24g ----- 48g	

Achocolatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4g ----- 8g ----- 16g	
1)	Quantas vezes você come		Unidade	CODIF
Com que frequência você usa gordura ou óleo no preparo de suas refeições?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10		D S M	
Quantas porções de vegetais (verduras e legumes) você costuma comer, sem incluir batatas ou saladas de maionese?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10		D S M	
Quantas porções de frutas você costuma comer, sem incluir sucos de frutas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10		D S M	
2) Por favor, informe qualquer outro alimento ou preparação que você costuma comer ou beber e que não tenha sido citado aqui				
Alimento	Frequência	Quantidade Consumida	Código do alimento	Codificação
			--- ---	-----
			--- ---	-----
			--- ---	-----
3) Quantas refeições você faz por dia? ___ ___				
4) Que tipo de óleo/gordura você costuma usar no cozimento/preparo de refeições? (00) Não usa (04) Óleo de soja/milho/outros (01) Margarina (05) Bacon (02) Manteiga (06) Banha (03) Azeite de oliva (99) Não sabe/não cozinha				
5) a) Quando você come carne de boi/vaca ou de porco, você costuma comer a gordura visível? (1) Nunca/raramente (2) Algumas vezes (3) Sempre b) Quando você come carne de frango, costuma comer a pele? (1) Nunca/raramente (2) Algumas vezes (3) Sempre				
6) Você costuma acrescentar sal na comida depois de pronta? (1) Nunca/raramente (2) Algumas vezes (3) Sempre				
7) Quando você come queijo/requeijão, iogurte/sorvete, maionese/molhos para salada, com que frequência esses alimentos são do tipo light? - Iogurte/sorvete (1) Sempre (2) Algumas vezes (3)raramente ou não come (9) não sabe - Maionese/molhos (1) Sempre (2) Algumas vezes (3)raramente ou não come (9) não sabe - Queijo/requeijão (1) Sempre (2) Algumas vezes (3)raramente ou não come (9) não sabe				

ANEXO C – MÉTODOS PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA

Análise da vitamina A (todo-trans-retinol), vitamina E (α -tocoferol e γ -tocoferol) e carotenoides selecionados (caroteno, licopeno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina).

Extração: 200 μ L de plasma foram pipetados para um tubo Pyrex de 8 mL contendo 250 μ L de etanol com padrões internos (rac-tocol e trans- β -apo-8'-Carotenal) e agitados em vórtice. Após adição de 250 μ l de butanol: acetato de etila (1:1) e sonicação (LEE, NEW e ONG, 2003), as amostras foram extraídas duas vezes com 2,5 mL de n-hexano contendo um antioxidante, sucessivamente vortexadas e centrifugadas (2500 x g, 4 min). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob nitrogênio e reconstituídas em 100 μ l de isooctano antes das análises.

Condições analíticas: Vitamina A (todo-trans-retinol), vitamina E (α -tocoferol e γ -tocoferol) e carotenoides selecionados (caroteno, licopeno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina) foram separados por injeção de 5 μ l de extrato em um frasco Thermo Hypersil GOLD Sílica, 1,9 μ m, coluna de 200 x 2,1 mm a 35°C usando um gradiente lento de n-hexano:dioxano. O tempo analítico durou 22 minutos, registrando sinal de fluorescência em λ_{Ex} = 325 nm e λ_{Ex} = 458 nm para retinol e em λ_{Ex} = 296 nm e λ_{Ex} = 330 nm para tocoferóis e absorbância visível em λ_{abs} = 477 nm para licopeno e em λ_{abs} = 452 nm para caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina.

Desempenho do método: O método pode ser usado na faixa de 0,104 - 0,573 μ g/mL para retinol, 2,66 - 16,02 μ g/mL para α -tocoferol, 0,14-1,88 μ g/mL para γ -tocoferol, 0,064 - 0,580 μ g/mL para caroteno total (α - + β -), 0,12 - 0,67 μ g/mL para licopeno, 0,0125 - 0,079 μ g/mL para β -criptoxantina, 0,02 - 0,133 μ g/mL para luteína e 0,005 - 0,0375 μ g/mL para zeaxantina.

A precisão intra e inter-diária foi inferior a 3% e 7%, respectivamente, para todo o intervalo de concentração de retinol e α -tocoferol, 8% e 20%, respectivamente, para γ -tocoferol, 5% e 8%, respectivamente, para caroteno total e β -criptoxantina e 7% e 10%, respectivamente, para luteína e zeaxantina. A precisão intra-diária foi inferior a 10% para o licopeno, enquanto sua precisão inter-diária pode chegar a 25%.

Análise bioquímica do ácido fólico e seus metabólitos (5-ME THF, 5-CHO THF E THF)

Preparação de amostra: Uma alíquota de 200 μ L de plasma foi transferida para uma placa Waters OSTROTM. Após a adição de padrões marcados com isótopos, as proteínas foram

precipitadas com metanol acidificado e as amostras filtradas através da placa para remoção de proteínas e fosfolipídios. O filtrado foi coletado em uma placa de 96 poços e evaporado até a secura sob uma corrente de nitrogênio. As amostras foram então reconstituídas em solução apropriada para posterior análise cromatográfica.

Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa em Tandem: O ácido fólico e seus metabólitos (5-Me THF, 5-CHO THF e THF) foram analisados por Cromatografia Líquida de Ultra Alto Desempenho de Fase Reversa (RP-UHPLC) com detecção por Espectrometria de Massa (MS) operando em Ionização por Eletropulverização Positiva (ESI+) na unidade resolução.

Desempenho do método: A faixa analítica foi de 0,5 - 150 nmol/L, com erros de calibração inferiores a 5%. A precisão não foi diferente de $100\% \pm 10\%$ em 3 níveis cobrindo a faixa analítica para todos os compostos. O THF apresentou variações muito altas para serem quantificadas com precisão; o método fornece apenas a identificação de THF no modo semiquantitativo. A precisão intra-diária e inter-diária foi inferior a 10 % para níveis de 5 nmol/L e inferior a 5 % para 40 nmol/L e 100 nmol/L para todos os compostos.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FUNÇÃO DE REGRESSÃO PARA A MÉDIA

Descrição: `reg2mean` é uma função para realizar a regressão para a média conforme metodologia descrita por Mee e Chua (1991).

Função: `Reg2mean` (before, after, mediareal)

Argumentos:

Before: vetor numérico que contém os valores antes da intervenção ou teste.

After: vetor numérico que contém valores após da intervenção ou teste.

Mediareal: valor numérico considerado como média populacional para uma dada variável.

Descrição da função:

```
reg2mean <- function(before, after, mediareal) {
  before_submedia = before - mediareal #media das diferenças entre antes do teste e a média
  real.
  modelo <- lm (after ~before_submedia) #regressão linear simples.
  betazero = as.double(modelo$coefficients[1]) #mean square residuals.
  s2 = anova(modelo)$"Mean Sq"[2] #efeito da intervenção.
  efeito = betazero - mediareal
  n = length(before_submedia)
  d = sum((before_submedia-mean(before_submedia))^2)
  teste = efeito/(s2*((1/n)+(mean(before_submedia)^2/d)))^(1/2)
  p.value= pt(teste,n-2, lower=FALSE) #cálculo do valor p para teste t pareado.
  return(paste(c(p.value,efeito), collapse=";")) #retorna valor p; valor do efeito da intervenção.
}
```