



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

DÉBORA KONO TAKETA MOREIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL *IN VIVO* DE LIPÍDIOS  
DE BAIXO VALOR CALÓRICO POR INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO BEHÊNICO

Campinas/SP

2016

DÉBORA KONO TAKETA MOREIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL *IN VIVO* DE LIPÍDIOS  
DE BAIXO VALOR CALÓRICO POR INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO BEHÊNICO

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia  
de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos exigidos  
para obtenção do título de Doutora em  
Ciência de Alimentos.

Supervisora/Orientadora: Dra. GABRIELA ALVES MACEDO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA DEBORA KONO  
TAKETA MOREIRA E ORIENTADA PELA PROFA.  
DRA. GABRIELA ALVES MACEDO

Campinas/SP

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M813s Moreira, Débora Kono Taketa, 1986-  
Síntese, caracterização e avaliação nutricional *in vivo* de lipídios de baixo valor calórico por incorporação de ácido behênico / Débora Kono Taketa Moreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido behênico. 2. Lipídios estruturados. 3. Antiobesidade. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Synthesis, characterization and nutritional assessment *in vivo* of low-calorie lipids by incorporating behenic acid

**Palavras-chave em inglês:**

Behenic acid

Anti-obesity

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Alessandra Gambero

Juliana Neves Rodrigues Ract

Luciana Francisco Fleuri

Lício Augusto Velloso

**Data de defesa:** 01-12-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gabriela Alves Macedo**  
FEA - UNICAMP  
Orientadora

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alessandra Gambero**  
USF/Bragança Paulista  
Membro titular

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract**  
FCF - USP  
Membro titular

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciana Francisco Fleuri**  
IBB - UNESP  
Membro titular

---

**Prof. Dr. Lício Augusto Velloso**  
FCM - UNICAMP  
Membro titular

---

**Prof. Dr. Dennys Cintra**  
FCA – UNICAMP/Limeira  
Membro suplente

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves**  
FEA - UNICAMP  
Membro suplente

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera Lúcia Flor Silveira**  
UNIFESP/Diadema  
Membro suplente

\* A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

## DEDICATÓRIA

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir e chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o DECIDIR.

“Cora Coralina”

## AGRADECIMENTOS

Dedico essa tese à minha família, por me apoiarem em todas as decisões tomadas ao longo dessa caminhada.

À minha mãe, Darcy Taketa, ao meu pai, Jasson Moreira e aos meus irmãos por terem segurado com muito carinho e atenção a minha mão todo esse tempo.

Agradeço a Deus por me mostrar o caminho, mesmo quando não enxergava.

Aos meus amigos de hoje e de sempre Luiza Martins, John Rocha e Renan Chisté.

As melhores amigas que pude encontrar em Campinas, Paula Barbosa e Jessika Gonçalves.

Ao Augusto Almeida Prado por ter me acolhido e ter sido um companheiro.

À professora Gabriela Macedo pela orientação, dedicação e companheirismo.

As professoras Ana Paula Ribeiro Badan e Alessandra Gambero por abrirem as portas dos seus laboratórios e me mostrarem um mundo novo de conhecimento. Além da companhia, conselhos e paciência em ensinar.

As pessoas mais acolhedoras que já conheci, Paola e Cintia Caria, muito Obrigada!

Ao amigo Rodrigo Gouvêa por sempre me ajudar.

Aos amigos de laboratório, Joelise Angeloti, Lívia Dias, Camilo Teixeira, Ruan Janser, Gilberto Coradi, Bruna Sampaio, Isabela Martins, Fernanda Furlan, Amanda Ruviano, Amanda Ávila, Karina Leão, Marília Crivelari, Paula Speranza, Danielle Branta, Livia Reis, Naice e Tauan Gomes.

Aos amigos do laboratório de tecnologia de óleos da UNICAMP, Ingrid, Marcela e Priscila.

Aos amigos do laboratório de Bragança Paulista da USF.

À professora Hélia Sato pelo carinho, ajuda e compreensão.

As técnicas do laboratório, Alessandra, Bia e Val.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma nessa jornada, meu **MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Os Lipídios Estruturados (LE) são triacilgliceróis reestruturados por métodos químicos ou enzimáticos com o objetivo de alterar a composição e/ou distribuição posicional dos ácidos graxos na molécula de glicerol a fim de apresentar características nutracêuticas e/ou terapêuticas que justifiquem sua aplicação em áreas como a produção de gorduras de baixo valor calórico ou como agentes hipocolesterolêmicos. Assim, este trabalho teve como objetivo sintetizar por via enzimática, utilizando as lipases Lipozyme TL IM e *Rhizopus* sp., lipídios estruturados funcionais de baixa caloria contendo ácido behênico e ácidos graxos mono e poli-insaturados, tendo como fonte óleo de crambe totalmente hidrogenado, azeite de oliva e óleo de soja. Os LEs foram caracterizados físico-quimicamente, quanto ao teor de acilgliceróis, composição em triacilgliceróis, distribuição regioespecífica, isotermas de cristalização, comportamento térmico na cristalização e a sua microestrutura. Após esta etapa, foram avaliados quanto suas propriedades antiobesidade por meio de ensaios *in vivo* utilizando camundongos C57Bl/6, onde consumiram as dietas padrão controle, padrão com LE, hiperlipídica controle e hiperlipídica com LE. Dentre as misturas avaliadas, a mistura OSC (oliva, soja e crambe) apresentou a melhor combinação, em relação às classes de ácidos graxos saturados, insaturados e poli-insaturados. A interesterificação causou modificações no comportamento químico e físico das misturas lipídicas, devido ao aumento nos teores de TAGs mono- e dissaturados com ácido behênico e diminuição dos tri-insaturados, o qual provocou alterações associadas à formação de cristais com morfologia típica de esferulitos, sendo essas alterações mais expressivas quando utilizou-se a Lipozyme TL IM. Em relação à regioespecificidade, a lipase Lipozyme TL IM atuou de forma aleatória, enquanto a lipase de *Rhizopus* sp. foi específica para posição *sn*-1,3. Na cinética de produção do LE, a estabilização se deu com 8h de reação, usando a lipase Lipozyme TL IM. O LE composto por OSC e catalisado pela TL IM foi aplicado em um estudo *in vivo* e durante o experimento os animais não apresentaram diarreia, inferindo que o LE foi parcialmente absorvido e não houve toxicidade na quantidade consumida e nem alterações no metabolismo. Os animais que consumiram LE, tanto na dieta controle como na dieta hiperlipídica, não apresentaram aumento de peso pela diminuição da absorção dos lipídios ingeridos, comprovado pela excreção destes nas fezes quando comparados aos seus controles. Os animais que consumiram a dieta hiperlipídica contendo o LE apresentaram uma diminuição do colesterol total, aumento da fração do colesterol HDL, diminuição do colesterol LDL, não desenvolveram esteatose hepática e apresentaram aumento nos níveis dos ácidos graxos araquidônico e docosahexaenóico no fígado. Dessa forma, foi possível desenvolver LE antiobesidade com potencial para melhorar os níveis de ácidos graxos necessários para um melhor funcionamento do organismo.

## ABSTRACT

The Structured Lipids (SL) are triglycerides restructured by chemical or enzymatic methods in order to alter the composition and/or positional distribution of the fatty acids on the glycerol molecule in order to provide nutraceutical and / or therapies characteristics which justify its application in areas such as production of low calorie fat or as hypocholesterolemic agents. So this study aimed to enzymatically synthesize using Lipozyme TL IM and *Rhizopus* sp. lipases, structured functional low-calorie lipids containing behenic acid and mono and polyunsaturated fatty acids, having as source the fully hydrogenated crambe, olive and soybean oils. The SLs were physico-chemically characterized, as the glycerides content, composition of triacylglycerols, regiospecific distribution, isotherms of crystallization, thermal crystallization behavior and their microstructures. After this stage, were evaluated for their anti-obesity properties by *in vivo* assays using C57BL/6 mice, which consumed the Control Diet, Structured Lipids Diet, Hyperlipid Control Diet, Hyperlipid Structured Lipids Diet. Among the tested mixtures the OSC (olive, soybean and crambe) had the best combination, in respect of classes of saturated fatty acids, unsaturated and polyunsaturated. The interesterification changed the chemical and physical behavior of lipid mixtures, due to the increase in mono and desaturated TAG with behenic acid content and decrease in the tri-unsaturated, which caused changes associated with spherulite like crystal formation, the more significant changes occurred when we used the Lipozyme TL IM. In regard to regiospecificity, the TL IM acted randomly while the *Rhizopus* sp. was specific for position sn-1,3. In the SL production kinetics, stabilization occurred with 8h reaction, using Lipase Lipozyme TL IM. LE composed of OSC and catalysed by Lipozyme TL IM was used in an *in vivo* study and during the experiment the animals showed no diarrhea, inferring that the SL was partially absorbed and no toxicity in the amount consumed and no changes in metabolism. Animals that consumed LE, both in the control diet as the High-fat diet, did not gain weight by decreasing the absorption of ingested lipids, which was demonstrated by its excretion in the feces when compared to controls. The animals consumed the high fat diet containing SL showed a decrease in total cholesterol, increasing HDL cholesterol fraction, lowering LDL cholesterol, did not develop hepatic steatosis and showed increased levels of arachidonic and docosahexaenoic fatty acids in the liver. Thus, it was possible to develop antiobesity SL with the potential to improve the levels of fatty acids necessary for a better functioning of the body.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRAFICA - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ANTI-OBESIDADE, CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO

### CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS COM POTENCIAL ANTI-OBESIDADE E FONTE DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

**Figura 1.** Composição em classes de ácidos graxos (% m/m) do óleo de crambe totalmente hidrogenado (OCTH), do óleo de soja, do azeite de oliva e das misturas simples (MS) de OC, SC e OSC..... 44

**Figura 2.** Classe de compostos acilgliceróis (%) em misturas simples e interesterificadas de OSC (Oliva, Soja e Crambe), OC (Oliva e Crambe) e SC (Soja e Crambe).....45

**Figura 3.** Isoterma de cristalização a 15,0 °C de misturas simples e interesterificadas de OSC (Oliva, Soja e Crambe), OC (Oliva e Crambe) e SC (Soja e Crambe)..... 48

**Figura 4.** Distribuição regioespecífica das diferentes classes de ácidos graxos (%) das misturas simples e interesterificadas, pelas enzimas Lipozyme TL IM (TL) e *Rhizopus* sp., de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC). As letras minúsculas diferentes no gráfico indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância..... 49

**Figura 5.** Distribuição de classes de TAGs das misturas simples (MS) e interesterificada com Lipozyme TL IM, de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC)..... 54

**Figura 6.** Imagens de cristalização digitalizadas das misturas simples (A) e interesterificada (B) de oliva, soja e crambe por resfriamento lento a 15°C/24h, com aumento de 40X..... 56

**Figura 7.** Termograma da mistura OSC interesterifica com diferentes quantidades de enzima e 8h de reação..... 57

### CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS LIPÍDIOS ESTRUTURADOS DE BAIXO VALOR CALÓRICO NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA.

**Figura 1.** Ilustração do modelo experimental, onde os animais receberam as dietas padrão controle (DPC), padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE)..... 70

**Figura 2.** Ganho de peso (GP) e Consumo de Ração (CR) durante 8 semanas dos camundongos que consumiram a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE)..... 75

**Figura 3.** kITT (A) e o Decaimento dos níveis glicêmicos (B) durante o teste de tolerância a insulina dos animais que consumiram a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE) (Médias com a mesma letra não se diferem das demais pelo teste de Tukey com 95% de significância)..... 76

**Figura 4.** Média e desvio padrão dos resultados da calorimetria indireta para: (A) volume de O<sub>2</sub> consumido (VO<sub>2</sub>), (B) volume de CO<sub>2</sub> expirado (VCO<sub>2</sub>), (C) gasto energético (EE) e (D) quociente respiratório (RQ) em camundongos que receberam as dietas padrão controle (DPC),

padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE). (Médias com a mesma letra não se diferem das demais pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância)..... 77

**Figura 5.** Lipídios totais (%) no fígado e nas fezes dos animais que consumiram as dietas padrão controle (DPC), padrão com LE (DPLE), hiperlipídica controle (DHC) e hiperlipídica com LE (DHLE)..... 80

**Figura 6.** Avaliação histológica do fígado dos animais que consumiram as dietas as dietas padrão controle (DPC), padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE). Coloração com hematoxilina-eosina de cortes de fígado de 2,0 µm e ampliação da imagem de 200 X..... 81

**Figura 7.** Níveis de triacilgliceróis, Colesterol Total (CT), HDL-c, LDL-c, VLDL-c, porcentagem de HDL (% HDL) e porcentagem de LDL (%LDL) no sangue dos animais alimentados com a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE)..... 86

**Anexo 1.** Aprovação do comitê de ética..... 96

**Anexo 2.** Cromatograma do perfil lipídico do fígado dos animais que consumiram as dietas hiperlipídica controle (DHC) e hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE)..... 97

**Anexo 3.** Cromatograma do perfil lipídico das fezes dos animais que consumiram as dietas padrão controle (DPC), padrão adicionada de lipídio estruturado (DPLE), Dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta Hiperlipídica de lipídio estruturado (DHLE).....98

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRAFICA - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ANTI-OBESIDADE, CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO

### CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS COM POTENCIAL ANTI-OBESIDADE E FONTE DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

<b>Tabela 1.</b> Proporção dos óleos para obtenção dos lipídios estruturados.....	38
<b>Tabela 2.</b> Composição em ácidos graxos (% m/m) das amostras de óleos puros e das misturas simples de óleo de soja, azeite de oliva e óleo de crambe totalmente hidrogenado.....	43
<b>Tabela 3.</b> Eventos de cristalização (DSC) da mistura simples (MS) e mistura interesterificada (MI) durante 24h, das misturas de OC (Oliva e Crambe), SC (Soja e Crambe) e OSC (Oliva, Soja e Crambe).....	46
<b>Tabela 4.</b> Composição em triacilgliceróis (TG% m/m) individuais e quanto ao número de carbono (NC) das matérias-primas e das misturas antes e após a interesterificação de oliva, soja e crambe (OSC) catalisada pela lipase Lipozyme TL IM (TL).....	53
<b>Tabela 5.</b> Diâmetro e área dos cristais das misturas antes e depois da interesterificação, por cristalização rápida a 15 °C.....	55
<b>Anexo 1.</b> Eventos de cristalização (DSC) de amostra de mistura simples (MS) e interesterificada (MI) de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC).....	64

### CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS LIPÍDIOS ESTRUTURADOS DE BAIXO VALOR CALÓRICO NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

<b>Tabela 1.</b> Composição das dietas experimentais.....	71
<b>Tabela 2.</b> Dados antropométricos, parâmetros bioquímicos e avaliação da calorimetria indireta dos animais que consumiram as dietas padrão e hiperlipídica.....	74
<b>Tabela 3.</b> Peso dos tecidos adiposo (TA), fígado e músculo Gastrocnêmico dos animais alimentados com a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).....	79
<b>Tabela 4.</b> Perfil qualitativo de ácidos graxos do tecido hepático dos animais alimentados com as dietas padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta Hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).....	83
<b>Tabela 5.</b> Conteúdo de colesterol total e triglicérides no fígado, tecido adiposo epididimal (TAE) e sangue; e frações do colesterol (HDL-c, LDL-c, VLDL-c) no sangue dos camundongos alimentados com dieta padrão (DPC), dieta padrão com LE (DPLE), dieta hiperlipídica (DHC) e dieta hiperlipídica com LE (DHLE).....	85
<b>Tabela 6.</b> Perfil qualitativo de ácidos graxos das fezes dos animais alimentados com a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta Hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).....	88

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	IX
LISTA DE TABELA.....	XI
INTRODUÇÃO GERAL.....	XIV

### **CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRAFICA - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ANTI OBESIDADE, CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO**

RESUMO	16
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. Desenvolvimento do conteúdo.....	18
2.1 Obesidade.....	18
2.2 Ácidos graxos na regulação e/ou controle da obesidade.....	19
2.3 Propriedades funcionais do ácido behênico.....	21
2.4 Lipídios Estruturados (LE).....	24
2.5 Drogas comerciais que diminuem a absorção lipídica.....	26
3. CONCLUSÃO.....	28
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	28

### **CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS COM POTENCIAL ANTI OBESIDADE E FONTE DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS**

RESUMO	34
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Matérias-primas (MP).....	37
2.2 Obtenção da lipase de <i>Rhizopus</i> sp. ....	37
2.3 Caracterização das matérias-primas.....	38
2.4 Reação de Interesterificação.....	38
2.5 Estudo da cinética da produção de lipídios estruturados.....	39
2.6 Caracterização físico-química das misturas simples e dos lipídios estruturados.....	39
2.6.1. Purificação dos lipídios estruturados.....	39
2.6.2. Composição em ácidos graxos.....	39
2.6.3. Teor de acilgliceróis parciais (HPSEC).....	40

2.6.4. Composição triacilglicerólica .....	40
2.6.5. Distribuição Regioespecífica .....	41
2.6.6. Isotermas de cristalização .....	41
2.6.7. Comportamento térmico de cristalização .....	41
2.6.8. Microestrutura cristalina .....	42
2.7. Análise Estatística .....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4. CONCLUSÃO.....	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
6. ANEXO.....	64

### CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS LIPÍDIOS ESTRUTURADOS DE BAIXO VALOR CALÓRICO NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

RESUMO .....	67
ABSTRACT .....	67
1. INTRODUÇÃO.....	68
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1. Matéria-prima.....	69
2.2. Ensaio Biológico .....	69
2.3. Avaliação da calorimetria indireta .....	71
2.4. Glicemia basal e teste de intolerância a insulina (ITT).....	71
2.5. Sacrifício dos animais e coleta de materiais .....	72
2.6. Avaliação histopatológica do fígado .....	72
2.7. Triglicerídeos e Colesterol total .....	72
2.8. Extração e avaliação dos lipídios totais do tecido hepático e das fezes.....	73
2.9. Avaliação do perfil lipídico do fígado e das fezes .....	73
2.10. Análise dos Dados.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
4. CONCLUSÃO.....	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
6. ANEXO.....	96
DISCUSSÃO GERAL.....	99
CONCLUSÃO GERAL.....	103
SUGESTÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

## INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos funcionais, além de possuírem funções nutricionais, contém em sua composição alguma substância biologicamente ativa que ao ser adicionada a uma dieta usual, desencadeia processos metabólicos ou fisiológicos, resultando em redução do risco de doenças e manutenção da saúde melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade (GOLDBERG, 1994; MAZZA, 1998).

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana, fornecem energia, agem como veículos para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, e são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoléico, linolênico e araquidônico, e contribuem para a palatabilidade e aceitação dos alimentos. Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triacilgliceróis e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes na cadeia do glicerol (CLAUSS, 1996; DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Os lipídios estruturados (LE) são triacilgliceróis reestruturados ou modificados que apresentam alteração na composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição na molécula de glicerol para obtenção de bases lipídicas específicas, tanto no aspecto nutricional como no tecnológico, pois afeta a natureza física e o comportamento dos lipídios. Podem ser obtidos por interesterificação enzimática, quando o objetivo é obter um lipídio estruturado com propriedades funcionais, devido à especificidade da enzima de realocar os ácidos graxos nas posições de interesse; e a baixa temperatura de catálise, o que apresenta como vantagem a preservação de compostos bioativos termossensíveis presente na matéria-prima de origem (IWASAKI e YAMANE, 2000).

Os LEs apresentam diversas aplicações como: o uso de LE antioxidantes em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, assim como o aumento no consumo de lipídios contendo ácidos graxos essenciais na indústria (FEDDERN, 2010); substitutos de gordura em formulações infantis (DA SILVA *et al.*, 2011); produção de gorduras hipocolesterolêmicas com aplicação em produtos alimentícios (MOUNIKA e YELLA REDDY, 2012; ZHU *et al.*, 2012; KANJILAL *et al.*, 2016); lipídios que fornecem rápida energia e diminuem os riscos de doenças cardiovasculares (NUNES, PIRES-CABRAL e FERREIRA-DIAS, 2011); aumentam a absorção de DHA (ácido docosahexaenóico) e diminuem o risco de aterosclerose e trombose no cérebro (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; BANDARRA *et al.*, 2016); atuam

no controle da obesidade (BEBARTA *et al.*, 2013; CAO *et al.*, 2013; KANJILAL *et al.*, 2013); entre outras aplicações.

Os ácidos graxos saturados esterificados às posições *sn*-1 e *sn*-3 de triacilgliceróis podem exibir diferentes padrões metabólicos devido à sua baixa absorvidade. Isto significa que as gorduras contendo ácidos graxos saturados principalmente nas posições *sn*-1 e *sn* -3 podem desencadear processos biológicos muito diferentes do que aquelas em que os ácidos graxos saturados estão posicionados majoritariamente na posição *sn*-2. As diferenças na localização estereoespecífica dos ácidos graxos deve, portanto, ser uma consideração importante na concepção e interpretação de estudos de nutrição envolvendo lipídios e na produção de produtos alimentícios especiais (DECKER, 1996).

Desse modo, este trabalho teve como objetivo sintetizar lipídios estruturados contendo ácido behênico e ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados em posições do TAG que promovam melhora na absorção dos ácidos graxos essenciais e ao mesmo tempo diminua a absorção do excesso de lipídios ingeridos, promovendo um efeito antiobesidade sem ser prejudicial à saúde.

## CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ANTI-OBESIDADE, CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO

Débora Kono T. Moreira <sup>a</sup>; Gabriela A. Macedo <sup>a,b</sup>

a - Departamento de Ciências de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – CEP: 13083-862 – Campinas/SP - Brasil, Telefone: 55 (19) 3521-4085 - e-mail: ([deborakono@hotmail.com](mailto:deborakono@hotmail.com)).

b- Departamento de Alimentos e Nutrição – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – CEP: 13083-862 – Campinas/SP - Brasil, Telefone: 55 (19) 3521-4077 - e-mail: ([macedoga@gmail.com](mailto:macedoga@gmail.com)).

Artigo a ser submetido na revista de Alimentos e Nutrição

### RESUMO

A obesidade é considerada uma epidemia global, constituindo-se como um fator de risco para muitas outras doenças debilitantes e de alto custo social. A utilização de lipídios estruturados contendo ácido behênico no tratamento da obesidade funciona como um agente relacionado ao desvio do metabolismo normal de nutrientes, por inibir a ação da lipase pancreática frente aos triacilgliceróis no intestino, diminuindo a absorção destes e aumentando a excreção de lipídios e do colesterol nas fezes, sem causar danos colaterais, como diarreia, o não fornecimento de energia suficiente para o organismo e diminuição da absorção de minerais e vitaminas lipossolúveis. A nova estrutura da molécula lipídica formada pela interesterificação apresenta a vantagem de agregar ácidos graxos específicos, como os de alto valor nutricional. Entretanto, estes ácidos graxos dependem da posição que ocupam no triacilglicerol para serem mais biodisponíveis. Dessa forma, o uso do ácido behênico se torna mais interessante, uma vez que lipídios estruturados contendo pelo menos uma molécula de ácido behênico em qualquer posição do triacilglicerol podem ser utilizados como um agente com grande potencial no tratamento da obesidade.

Palavras chave: Lipídios de baixa caloria, Inibidores da lipase pancreática, potencial antiobesogênico

### ABSTRACT

Obesity is a global epidemic, constituting as a risk factor for many other debilitating diseases with high social cost. The use of structured lipids containing behenic acid in the treatment of obesity acts as a related agent as the deviation agent from the normal nutrient metabolism, by inhibiting the action of pancreatic lipase in the intestine triglycerides, which reduces its absorption and increases the excretion of lipids and cholesterol in the feces, without causing collateral damages such as diarrhea, insufficient power supply to the body, and decreased absorption of minerals and fat-soluble vitamins. The new structure of the lipid molecule formed by interesterification shows the advantage of adding specific fatty acids, such as high nutritional value. However, these fatty acids depend on the position they occupy in the triacylglycerol to be more bioavailable, which makes use of the most interesting behenic acid,

once structured lipids containing at least one behenic acid molecule in the triacylglycerol position may be used as an agent has great potential in the treatment of obesity.

Keywords: low calorie lipids, inhibitors of pancreatic lipase, Anti-obesogenic potential

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica complexa, caracterizada por excesso de gordura corporal, em consequência do desequilíbrio energético decorrente do aumento na ingestão calórica somado a baixa/nenhuma atividade física e ao declínio concomitante do gasto energético, onde o balanço entre adipogênese e adiposidade determina o grau de obesidade do indivíduo. A adiposidade leva ao desenvolvimento simultâneo de hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão arterial sistêmica que, coletivamente, compõem a chamada síndrome metabólica e está diretamente relacionada ao desenvolvimento de doenças como *diabetes mellitus* tipo 2, doença coronariana, acidente vascular cerebral, osteoartrite, apneia do sono e cânceres de mama, colo e ovário, tornando-se um fator de risco, apesar da atual consciência pública sobre as suas consequências (KAHN e FLIER, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2009; BUSNELLO, SANTOS e PONTIN, 2016).

Embora a medicação antiobesidade possa ter valor potencial como um complemento para as estratégias comportamentais e educacionais para reduzir a obesidade, muitas drogas foram banidas pela FDA (Food and Drug Administration/EUA) devido aos efeitos colaterais, e poucas ainda estão no mercado para uso a longo prazo (DEL RE, FRAYNE e HARRIS, 2014). Por isso, o uso de compostos naturais que possuem esse efeito, é muito atraente para pessoas obesas ou acima do peso, justamente por não provocarem efeito colateral e apresentarem outras propriedades nutricionais (LUNAGARIYA *et al.*, 2014). O ácido behênico é um ácido graxo de cadeia longa saturada presente em diversos óleos e gorduras de origem vegetal, o qual possui a ação de inibir lipases digestivas e atuar como um agente antiobesidade, melhorando e prevenindo os teores de colesterol e de triglicérides no sangue (KOJIMA *et al.*, 2013).

A utilização de matérias-primas contendo ácido behênico, como o óleo de crambe totalmente hidrogenado, para obtenção de lipídios estruturados pode resultar em triacilgliceróis (TAG) com diferentes funções nutricionais e aplicações industriais, por meio da reação de interesterificação deste com diversos óleos e gorduras de origem animal e vegetal. Dessa forma, o objetivo desta revisão foi expor as propriedades do ácido behênico em

composições de lipídios estruturados frente à inibição da lipase pancreática e seus diversos benefícios ao tratamento da obesidade.

## 2. DESENVOLVIMENTO DO CONTEÚDO

### 2.1 Obesidade

A obesidade está associada a um quadro de inflamação crônica sistêmica de baixo grau, que predispõe o indivíduo à resistência à insulina e ao desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2, o que implica aumento do risco para doenças cardiovasculares. Está diretamente relacionada a alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo. Entre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória induzida pela obesidade, destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), o qual aumenta a expressão de diversos genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória e, conseqüentemente, está ligado à patogênese de diferentes doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (BASTOS, ROGERO e ARÊAS, 2009).

O problema do excesso de peso e da obesidade tem alcançado proporções epidêmicas no mundo todo e são definidos como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo que pode prejudicar a saúde. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014, 41 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade estavam acima do peso ou obesos, e mais de 1,9 bilhão de adultos (18 anos ou mais) estavam acima do peso, onde destes mais de 600 milhões eram obesos. Em estudos epidemiológicos, o diagnóstico do estado nutricional de adultos é feito a partir do Índice de Massa Corporal (IMC), obtido pela divisão do peso, medido em quilogramas, pelo quadrado da altura, medida em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), onde o excesso de peso é diagnosticado quando o IMC alcança valor igual ou superior a  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ , enquanto que a obesidade é diagnosticada com valores de IMC superiores a  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ .

No Brasil, com a preocupação do avanço da obesidade, foi implantado desde 2006 em todas as capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, o Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) que tem como objetivo monitorar por inquérito telefônico a frequência e distribuição dos principais determinantes das DCNT. De acordo com o Vigitel de 2013, no conjunto dos 26 estados e no Distrito Federal, a frequência de adultos obesos foi de 17,5%. No sexo masculino, a frequência da obesidade duplicou da faixa de 18 a 24 anos para a faixa de 25 a 34 anos de idade, declinando após os 65 anos. Entre as mulheres, a frequência da obesidade tendeu a aumentar com a idade até os 54 anos. A frequência de obesidade tendeu a diminuir com o

aumento do nível de escolaridade em ambos os sexos. O estudo também revela que a obesidade cresceu no país, pois em 2006, quando os dados começaram a ser coletados pelo Ministério, o índice era de 11%. Com o reconhecimento da obesidade como doença epidêmica que aflige globalmente a população emerge a necessidade de melhorar a qualidade e a eficácia dos tratamentos disponíveis (BRASIL, 2014).

## 2.2 Ácidos graxos na regulação e/ou controle da obesidade

Os ácidos graxos são os principais componentes dos lipídios e possuem uma cadeia alifática e um grupo carboxílico. São encontrados facilmente na natureza e apresentam entre 4 e 24 átomos de carbono. Podem ser classificados quanto ao número de carbonos na cadeia, se dividindo em ácidos graxos de cadeia curta (4 a 6 carbonos), de cadeia média (7 a 12 carbonos) e de cadeia longa (13 carbonos ou mais). Em relação à ausência ou presença de ligações duplas na cadeia, os ácidos graxos são classificados em saturados e insaturados, respectivamente. Os insaturados são divididos ainda em ácidos graxos monoinsaturados (1 dupla ligação - MUFA) e poli-insaturados (2 ou mais duplas ligações- PUFA) (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

O alto consumo de lipídios é um dos principais responsáveis pelo excedente calórico acumulado no organismo, o que conduz o indivíduo à obesidade. Essa é a primeira vertente que surge quando se relaciona lipídios versus obesidade. Contudo, existem diversos tipos de lipídios interessantes, que figuram como estratégias nutricionais no controle e tratamento de diversas doenças, como a obesidade.

A gordura presente na dieta, principalmente a saturada, pode influenciar a ação da insulina em armazenar lipídios no músculo, aumentar os níveis de colesterol sérico e influenciar no aparecimento de doenças cardiovasculares. Um dos mecanismos proposto para evitar a ação deletéria desses ácidos graxos é a redução do número de receptores hepáticos de LDL-c, o que pode inibir a remoção dessa lipoproteína e também aumentar os níveis de triacilgliceróis no plasma (CINTRA, ROPOLLE e PAULI, 2011). Entretanto, existem ácidos graxos de cadeia longa saturada de baixo valor calórico, como o ácido behênico, que possui baixa absorção e inibe lipases digestivas, promovendo o aumento de excreção e baixa absorção de TAGs no intestino. Dependendo da composição do TAG na dieta, essa absorção parcial aumenta os níveis de HDL-c, diminui os níveis de LDL-c e triacilgliceróis no sangue, apresentando propriedades antiobesogênicas (KANJILAL *et al.*, 2013; KOJIMA *et al.*, 2013).

Os ácidos graxos de cadeia média saturada também possuem baixo valor calórico por serem absorvidos através da parede intestinal sem re-síntese do triacilglicerol nas células intestinais, sofrendo, predominantemente,  $\beta$ -oxidação, e não são estocados nas células adiposas. Consequentemente, constituem boa fonte de energia para pacientes com insuficiência pancreática e má absorção de gordura (JENNINGS e AKOH, 2001). Porém, quando voltado para pacientes obesos e com *diabetes mellitus* tipo 2, eles são limitados, por disponibilizarem rapidamente energia, e alguns, como o ácido láurico, serem capazes de ativar a via dos *Toll like receptors* (TLRs). Esta via engloba proteínas responsáveis pelo reconhecimento de agentes invasores, provocando o estímulo de uma resposta inflamatória que exerce prejuízo em importantes vias de sinalização, como as de controle da fome, controladas pela leptina e insulina (CINTRA, ROPOLLE e PAULI, 2011).

Os ácidos graxos monoinsaturados, encontrados principalmente no azeite de oliva, tem demonstrado exercer efeitos benéficos para a saúde, melhorando quadros clínicos também relacionados à obesidade. O ácido oléico (18:1) é um ácido graxo monoinsaturado, que diminui as concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (PEREZ-JIMENEZ *et al.*, 2005; GILMORE *et al.*, 2011; SALES-CAMPOS *et al.*, 2013). Previne a acumulação de gordura no tecido adiposo através da diminuição dos níveis de insulina no plasma e aumenta a atividade de enzimas lipolíticas hepáticas envolvidas na  $\beta$ -oxidação (LIAO *et al.*, 2010). Além disso, o ácido oléico é capaz de aumentar a transcrição da interleucina 10, uma potente interleucina pró-inflamatória, o que justifica seu potencial anti-inflamatório (CINTRA, ROPOLLE e PAULI, 2011).

A desregulação do metabolismo dos lipídios nos tecidos leva a perturbação sistêmica da ação da insulina e metabolismo da glicose. O ácido palmitoléico (C16:1,  $\omega$ -7) também é um ácido graxo monoinsaturado encontrado no azeite de oliva. Foi descrito como uma lipocina sintetizada e secretada pelo tecido adiposo, que possui a habilidade de associar este tecido ao controle do metabolismo sistêmico, atuando como um sinal hormonal que estimula a ação da insulina muscular e suprime a esteatose hepática (CAO *et al.*, 2008; OLEFSKY, 2008).

Outros ácidos graxos também envolvidos na imunidade e inflamação são os eicosanóides clássicos, derivados dos PUFA  $\omega$ -6, como o ácido araquidônico (AA), que incluem leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos, cujo papel principal é o de ampliar ou reduzir a inflamação, coordenando o recrutamento de leucócitos, produção de citocinas e quimiocinas, formação de anticorpos, proliferação e migração celular, e o reconhecimento de antígenos (LÓPEZ FARRÉ e MACAYA, 2006; CHIURCHIÙ e MACCARRONE, 2016)

De acordo com Queiroz *et al.* (2009) e Spite, Clària e Serhan (2014), na obesidade, o tecido adiposo está infiltrado por macrófagos ativados, os quais liberam quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), o inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1), interleucina-6 (IL-6), proteína 4 ligadora de retinol, proteína 1 quimioatrativa de macrófagos (MCP-1) e proteínas de fase aguda. Esses fatores exercem ações que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, e induzem à resistência à insulina e a disfunções vascular e cardíaca. Por outro lado Bastos, Rogero e Arêas (2009) relataram que os ácidos graxos poli-insaturados da série  $\omega$ -3, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosaexaenóico (DHA), apresentam ação anti-inflamatória, uma vez que diminuem a atividade dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, o que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ); e da proteína ativadora-1 (AP-1), o que leva a diminuição da resistência periférica à insulina, pois produzem mediadores lipídicos de pró-resolução. Esses ácidos graxos podem ser encontrados diretamente em óleos de peixe e de microrganismos (Single Cell Oil -SCO) ou por biotransformação do ácido linolênico no fígado, comumente encontrado em óleo de soja, canola, girassol e linhaça.

As doenças inflamatórias têm papel importante na saúde pública, já que estão relacionadas com a redução da qualidade de vida e a altos custos para os sistemas de saúde. Os medicamentos utilizados têm alto custo para os pacientes e muitas vezes estão relacionadas a múltiplos efeitos adversos. Sendo assim, a utilização de óleos que contem naturalmente estes ácidos graxos pode trazer novos horizontes no tratamento da obesidade, com redução de custos e minimização de efeitos colaterais.

### **2.3 Propriedades funcionais do ácido behênico**

O ácido behênico ou ácido docosanóico é um ácido graxo saturado constituído de 22 carbonos (C22:0), de aparência sólido cristalino ceroso, com ponto de fusão de 79,9 °C (TIWARI e SAWANT, 2005). É encontrado na natureza, na gordura da semente do cacau bravo ou jacaré, rana, cacauí (*Theobroma microcarpum*) (9,8%) (GILABERT-ESCRIVÁ *et al.*, 2002); óleo de Pracaxi (1-16,2%) (POLONINI *et al.*, 2012; DOS SANTOS COSTA *et al.*, 2014); óleo de Baru (3,1-5,8%) (VERA *et al.*, 2009) óleo essencial de *Lippia sidoides* (nd) (MACAMBIRA *et al.*, 1988); Amendoim (1 a 5%) (CAMARGO *et al.*, 2011; DOS SANTOS COSTA *et al.*, 2014) e apresenta traços em gordura do leite dos animais e nos óleos de origem marinha. Os derivados de ácido behênico tem ampla utilidade em surfactantes e detergentes, plásticos e aditivos plásticos, materiais fotográficos e de gravação, alimentos e aditivos alimentares, cosméticos,

medicamentos e produtos para cuidados pessoais, aditivos de tinta, papel, têxteis, lubrificantes e aditivos de óleo combustível (TIWARI e SAWANT, 2005). O ácido behênico também é produzido pela hidrogenação do ácido erúcico (C22:1) encontrado em sementes oleaginosas da família Cruciferae como colza, mostarda e crambe, apresentando em média 45% a 60% (SONNTAG, 1991).

O ácido behênico vem sendo utilizado por ser parcialmente absorvido pelo corpo humano, devido inibir a ação da lipase pancreática, apresentando potencial para reduzir calorias em óleos e gorduras. Kanjilal *et al.* (1999) produziram lipídio estruturado utilizando óleo de girassol e etil behenato e notaram que este possuía baixo valor calórico (5.2–5.4 kcal/g), devido à baixa absorção de ácido behênico no intestino dos ratos Wistar (28%). Outro estudo de Kanjilal *et al.* (2013) constataram que lipídios estruturados catalisados por lipase Lipozyme TL IM, por meio de interesterificação de behenato etílico com óleos de girassol e de soja, separadamente, apresentavam baixo valor calórico 5,36 kcal/g e 5,2 kcal/g, respectivamente. Kojima *et al.* (2013) comprovaram o efeito antiobesidade do ácido behênico associado ao ácido oléico em humanos.

Além do baixo valor calórico demonstrado, o ácido behênico também impede a deposição da gordura visceral e do triacilglicerol hepático, devido à diminuição e/ou retardamento da absorção intestinal de TAGs, como demonstrado no estudo utilizando 1(3)-behenoil-2,3(1)-dioleoil-rac-glicerol (BOO) na dieta de ratos Wistar por Kojima *et al.* (2010). Além disso, apresentou efeitos hipocolesterolêmicos, tanto nos animais que receberam a dieta normal quanto à dieta hiperlipídica, diminuindo a deposição de lipídios nas artérias e os níveis de colesterol, particularmente o LDL-colesterol, triglicérides e mantendo os níveis ácidos graxos essenciais necessários no sangue e no fígado (KANJILAL *et al.*, 2013).

Apesar de o ácido behênico diminuir a digestão de triacilgliceróis pela não atuação da lipase pancreática, o qual leva ao aumento da excreção fecal de gorduras e ácidos graxos sem diferenciação entre saturados e insaturados, este fornece energia suficiente para sustentar o crescimento de ratos e hamsters, devido sua digestão parcial. Além disso, não influencia na absorção de minerais e vitaminas lipossolúveis, não apresentando efeitos adversos à saúde, sendo considerado um material alimentício seguro (WEBB *et al.*, 1991; KOJIMA *et al.*, 2013).

Quando os triacilgliceróis são digeridos no intestino, os ácidos graxos provenientes de *sn*-1 e *sn*-3 são liberados pela lipase pancreática, resultando em dois ácidos graxos livres e um monoacilglicerol *sn*-2, onde este último é absorvido pelas células do endotélio intestinal. Se ácidos graxos saturados de cadeia longa ( $\geq 16C$ ) encontram-se em *sn*-1 e *sn*-3, sua biodisponibilidade é menor, pois os ácidos graxos livres, após a hidrólise pela lipase

pancreática, podem interagir com íons divalentes (por exemplo:  $\text{Ca}^{2+}$ ) formando sais insolúveis que não são biodisponibilizados com facilidade. Assim como os ácidos graxos localizados em *sn*-1 e *sn*-3 são absorvidos com pouca eficiência, estes fornecem menos calorias, causando menor impacto sobre o perfil lipídico sanguíneo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Dessa forma, a utilização do ácido behênico na composição de lipídios estruturados é muito interessante, pois além de ter baixa absorção pelo organismo humano, por ser um ácido graxo saturado de cadeia longa, este também possui propriedades de inibição da lipase pancreática, diminuindo ainda mais a sua absorção e a de outros ácidos graxos. Portanto, trata-se de um ótimo composto para ser utilizado no tratamento da obesidade.

Sabe-se que o ácido behênico atua na inibição da lipase pancreática, entretanto não há evidências claras de como essa atuação acontece. Arishima *et al.* (2009) e Kojima *et al.* (2013) sugerem que o triacilglicerol contendo ácido behênico (BOO) reduz a absorção de gordura através da inibição da hidrólise de triacilglicerol no lúmen intestinal. Arishima *et al.* (2009) ainda reportam que BOO pode influenciar tanto na formação do complexo enzima-substrato quanto impedir a sua lipólise pela lipase pancreática. Já Kojima *et al.* (2013) apontam que isso leva à inibição da hidrólise de outros triacilgliceróis, o que resulta na diminuição da absorção de TAGs e na diminuição da deposição da gordura visceral em ratos. Kanjilal *et al.* (1999) propuseram que a baixa taxa de hidrólise dos TAGs é devido à baixa difusão do ácido behênico da fase oleosa para aquosa e o ácido behênico hidrolisado pode inibir a atuação da lipase pancreática, bloqueando a interface.

Yoshida, Aoyama e Yamamoto (1991) observaram essa diminuição da absorção de triacilgliceróis em ratos alimentados por uma semana com uma dieta à base de óleo de milho e 18% TAG composto por behênico/caprício/caprício, e reportaram que a absorção aparente de TAG foi de 39% e do ácido behênico 8%, quando comparados com ratos alimentados exclusivamente com óleo de girassol. Webb *et al.* (1991) avaliaram os efeitos biológicos de um triacilglicerídeo randomizado compreendendo ácido caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), e behênico (C22:0); e constataram que 75-82% do teor em ácido behênico não foi absorvido, tanto por ratos como por hamsters, e excretado nas fezes. O ácido behênico foi metabolizado rapidamente representando uma recuperação de 3-15% da absorção de ácidos graxos na gordura total das carcaças, não apresentando toxicidade para ratos, quando consumido durante 28 dias consecutivos, em níveis de até 15% na dieta ou 83% na gordura total. Jandacek *et al.* (1993) investigaram os efeitos do ácido behênico no colesterol e apesar de ter sido metabolizado (19-20%) por hamsters, notaram que ele diminuiu a ação da lipase pancreática em hidrolisar TAGs, comprovado pela presença deste intactos nas fezes. Afirmaram ainda que

ácidos graxos de cadeia longa pode alterar mais a absorção do colesterol do que ácidos de cadeia média, quando presentes em TAG contendo ácido behênico, comprovado num segundo estudo, onde o colesterol fecal era quase três vezes maior que o do grupo controle alimentado com óleo de cártamo. Estudo em humanos feito por Kojima *et al.* (2013) também verificaram aumento na excreção fecal de gorduras sem diferenciação de ácidos graxos saturados e insaturados; quando ingeriram biscoitos contendo triacilglicerol estruturado de ácido behênico e ácido oléico (ingestão de BOO - 2,46 g/dia representando 4,1% da gordura total da dieta) durante 1 semana ou 7 dias. Segundo o autor, o ácido behênico pode ser utilizado como um agente antiobesidade.

## 2.4 Lipídios Estruturados (LE)

As propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais das gorduras naturais dependem da sua composição em ácidos graxos (AG) saturado e insaturado, do comprimento da cadeia do AG, e da distribuição organizada desses AG nos TAG (posições *sn*-1,3 ou *sn*-2) (XU, 2000). A estrutura e composição de ácidos graxos de TAGs afetam a sua absorção e a distribuição de ácidos graxos no organismo. Com isso, há um crescente interesse em usar óleos e gorduras para o tratamento e prevenção de doenças, bem como para a melhoria da saúde (WILLIS *et al.*, 1998;).

Os lipídios estruturados são definidos como triacilgliceróis (TAG) que são normalmente obtidos por interesterificação química ou enzimática, que modifica a composição de ácidos graxos e/ou a distribuição posicional destes na estrutura do glicerol. Esta modificação na estrutura dos lipídios pode melhorar ou modificar as características físicas e/ou químicas dos triacilgliceróis, bem como modificar uma ou mais propriedades nutricionais (IWASAKI e YAMANE, 2000).

A reação de interesterificação consiste na redistribuição dos ácidos graxos nas moléculas dos triacilgliceróis, por meio da hidrólise simultânea de ligações ésteres existentes e formação de novas ligações éster nas moléculas glicéridicas, resultando na modificação da composição triacilglicéridica, cuja característica final é totalmente determinada pela composição total em ácidos graxos das matérias-primas iniciais (O'BRIEN, 2009). Essa redistribuição dos ácidos graxos nas moléculas de TAG pode levar a uma alteração substancial na funcionalidade da matriz lipídica, oferecendo contribuições importantes para o aumento e otimização do uso dos mesmos nos produtos alimentícios.

As reações catalisadas por lipases ocorrem sob condições suaves, a temperaturas inferiores a 70 °C e pressão atmosférica, com maior seletividade do que as catalisadas quimicamente (XU, 2000). Sob a perspectiva de produzir lipídios com composições muito específicas para aplicações funcionais e medicinais, os métodos de interesterificação enzimática são mais interessantes.

A interesterificação de óleos e gorduras pode ser aplicada por diversas razões: para influenciar o comportamento na fusão, fornecendo consistência desejada em temperatura ambiente e de refrigeração; para melhorar ou modificar o comportamento cristalino, de forma a facilitar os processos de produção e, para diminuir a tendência à recristalização durante a vida útil do produto (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Um novo grupo de substitutos de gorduras de baixa caloria vem ganhando reconhecimento no mercado, como a família dos lipídios estruturados que contêm ácidos graxos de cadeia curta, média ou longa ou ácidos graxos com propriedades não digestivas, ou ainda ácidos graxos com posições diferentes dos óleos encontrados na natureza, que geram novas propriedades nutricional, farmacêutica e físico-química, com diversas aplicações e mercados (AKOH, 1996).

Arishima *et al.* (2009) estudaram o potencial de diferentes TAGs em retardar a ação da lipase pancreática *in vitro* e verificaram que a taxa de lipólise foi menor para TAGs contendo ácido behênico do que TAGs contendo ácido palmítico e esteárico, misturados com ácido oléico. Porém, a taxa foi menor quando o ácido behênico se apresentou em TAGs contendo ácidos graxos de cadeia longa, como linoléico e linolênico. Além do que, TAGs que são capazes de derreter ou dissolver no óleo líquido à temperatura do corpo, têm um maior potencial como um retardador digestivo. Assim, TAGs contendo ácido behênico e ácidos graxos insaturados são capazes de retardar a ação da lipase pancreática, independente da posição em que se encontram na estrutura do glicerol.

Encontramos diferentes tipos de lipídios estruturados de baixo valor calórico contendo ácido behênico na literatura. Kanjilal *et al.* (1999) e Kanjilal *et al.* (2013) utilizaram behenato etílico com óleos de girassol e de soja, separadamente, para produzir lipídios estruturados de baixo valor calórico e com potencial hipocolesterolêmico. Kojima *et al.* (2010) adicionaram na dieta de ratos um lipídio estruturado formado por behênico-oléico-oléico (BOO) para investigar se o composto possuía atividade antiobesidade e seus efeitos inibitórios na absorção de TAG. Arishima *et al.* (2007) estudaram indivíduos com hiperlipidemia para avaliar o efeito supressor do LE BOO. Tynek e Ledóchowska (2005) obtiveram LE com baixo valor calórico com propriedades que podem ser usadas para a produção de margarina e

gorduras de fritura, utilizando como base o azeite de oliva e o óleo de colza com alto teor de erúcido totalmente hidrogenado. Mounika e Yella Reddy (2012) incorporaram à estearina de palma, ácidos graxos de cadeia média como caprótico, ácido caprílico e ácido behênico para agregar valor a um subproduto da indústria de óleos e obter uma gordura com propriedade diferenciada. Guedes *et al.* (2014), produziram gorduras interesterificadas a base de óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado na busca de gorduras alternativas com baixo/ausência de ácidos graxos trans e obtiveram características adequadas para certas aplicações alimentares, tais como a substituição de gorduras parcialmente hidrogenadas. Assim, são diversas as aplicações do ácido behênico, podendo ser usado tanto na indústria de alimentos como na indústria farmacêutica.

## 2.5 Drogas comerciais que diminuem a absorção lipídica

A inibição da lipase pancreática leva a uma diminuição na absorção intestinal de gordura e pode ser utilizado no tratamento da obesidade. Existem diversos compostos químicos comerciais que diminuem esta absorção. Porém os principais que utilizam ácidos graxos em sua composição são: Caprenin, Salatrim, Olestra e Orlistat.

O Caprenin® (PAC) ou Caprocapylobehenin, foi desenvolvido pela Procter & Gamble em parceria com a Grinsted products, é um triacilglicerol contendo ácidos graxos de cadeia média e longa, composto principalmente por ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), e ácido behênico (C22:0) e provê 5 kcal/g. Webb e Sanders (1991) estudaram se o PAC é qualitativamente digerido, absorvido, e reorganizado como outras gorduras e óleos alimentícios que contêm ácidos graxos de cadeia média e de cadeia longa. Os testes *in vitro* demonstraram que o PAC puro, óleo de coco (OC) e o óleo de amendoim (OA) foram hidrolisados pela lipase pancreática de suíno. Todos os triacilgliceróis puros também foram digeridos *in vivo* por ambos os ratos machos e fêmeas. No entanto, substancialmente mais OA (74%) e OC (51%) foram recuperados no sistema linfático em relação ao CAP (10%). Estas diferenças quantitativas são devido à composição em ácidos graxos de cada triacilglicerol e das principais rotas de captação de ácidos graxos. Não houve evidência de rearranjo significativo das posições dos ácidos graxos no glicerol durante a digestão e absorção, pois esses ácidos graxos recuperados em gordura linfática tendem a ocupar as mesmas posições glicerídicas de seus óleos puros originais. Concluiu-se que o PAC é qualitativamente digerido, absorvido e processado como qualquer gordura ou óleo comestível que contém ácido graxo de cadeia média e ácidos graxos de cadeia muito longa. Webb *et al.* (1991) estudaram o potencial

de toxicidade oral do caprenin, sendo administrado na dieta semipurificada a 0, 5, 10, e 15% contrabalanceando com o óleo de milho adicionado em 18, 13, 8, e 3%, respectivamente, para manter o teor de gordura dietética total, com 18% e fornecer uma fonte de ácidos graxos essenciais. Os autores observaram que o Caprenin não era tóxico para ratos, quando consumido durante 28 dias consecutivos, em níveis de até 15% na dieta (83% de gordura total da dieta).

O Salatrim, comercializado como Benefat®, desenvolvido pela Nabisco Foods Group em parceria com a Pfizer Food Science, é um lipídio estruturado de baixa caloria, aproximadamente 5 kcal/g, que é caracterizado pela combinação de ácidos graxos de cadeia curta (C<sub>2-4</sub>) com ácidos graxos de cadeia longa (C<sub>16-22</sub>, geralmente o esteárico) na molécula de glicerol. Existem dois tipos de triacilglicerol (TAG) em sua composição, um composto formado por dois ácidos graxos de cadeia curta e um ácido de cadeia longa, ligados ao glicerol (CCL-TAG), e um outro composto contendo dois ácidos graxos de cadeia longa e um de cadeia curta ligados ao glicerol (LLC-TAG) (HAN *et al.*, 2011). É possível que esta combinação de ácidos graxos de cadeia curta e longa na mesma molécula resulte em uma hidrólise parcial pela lipase pancreática e uma formação de mono e diestearoilglicerol pouco digestível, o que leva a um aumento da excreção de lipídios pelas fezes (LIVESEY, 2000). Sorensen *et al.* (2008) compararam os efeitos dos lipídios do Salatrim com o lipídio tradicional no apetite, ingestão de energia *ad libitum* e hormônios gastrointestinais. Foi constatado que o Salatrim diminuiu moderadamente o apetite de jovens saudáveis e não foram encontrados evidências de envolvimento com os hormônios gastrointestinais.

O Olestra, cujo nome comercial é Olean®, foi desenvolvido pela empresa Procter & Gamble, e é uma mistura de hexa-, hepta- e octaesteres de sacarose obtidos pela esterificação da sacarose com ácidos graxos de cadeia longa provenientes de óleos comestíveis. De acordo com Peters *et al.* (1997) e Kanjilal *et al.* (2013) as propriedades físicas desse poliéster de sacarose são semelhantes aos triacilgliceróis normais e se adaptam para a maioria das aplicações em que são utilizados óleos e gorduras. No entanto, o grande inconveniente de Olestra é 'vazamento anal', o resultado de uma gordura totalmente não digerível que passa pelo sistema gastrointestinal. Estudos realizados por Roy *et al.* (2002) investigaram os efeitos da substituição do triacilglicerol da dieta pelo Olestra em jovens, o qual resultou em uma perda de peso e de gordura corporal significativa, concluindo que a substituição de 1/3 da gordura dietética com Olestra em períodos de até 10 semanas resulta em perda de peso tanto em homens como em mulheres. Lovejoy *et al.* (2003) também estudaram o consumo de Olestra em uma dieta de baixa gordura, por 9 meses, e obtiveram uma melhora significativa

nos fatores de risco cardiovasculares, grande parte explicado pela perda de peso. Porém, o consumo de dieta com baixo teor de gordura a longo prazo, com ou sem Olestra não diminui o colesterol HDL.

O Orlistat, é um medicamento conhecido como Xenical® produzido pela indústria farmacêutica Roche, é uma lactona altamente lipofílica com propriedades anfifílicas, sendo um dos compostos mais utilizados no tratamento da obesidade. De acordo com Drent e Van Der Veen (1995) o Orlistat em uma dose de 50 mg, três vezes por dia, leva a um aumento significativo na perda de peso em pessoas moderadamente obesas, devido à inibição da lipase pancreática. Estes resultados são confirmados em um estudo de doses múltiplas, utilizando 10 mg, 60 mg e 120 mg de Orlistat três vezes ao dia versus placebo. O uso deste na inibição da lipase não tem influência significativa sobre os níveis de vários sistemas hormonais, incluindo hormônios da tireóide, catecolaminas e IGF-I em jejum. O mesmo é verdade para as respostas de vários hormônios gastrointestinais e pancreáticos depois da ingestão de um elevado teor de gordura da refeição. Em geral, o Orlistat é muito bem tolerado, embora seja observado um aumento da ocorrência de efeitos colaterais gastrointestinais.

### 3. CONCLUSÃO

O ácido behênico demonstrou ter um grande potencial de inibir a lipase pancreática tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentando efeito antiobesidade. Pode ser amplamente empregado na forma de lipídio estruturado em conjunto com outros ácidos graxos, apresentando novas características físico-químicas e nutricionais.

### 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKOH, C. C. New Developments in low calorie fats and oils substitutes **Journal of Food Lipids**, v. 3, n. 4, p. 223-232, 1996. ISSN 1745-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.1996.tb00070.x> >. Acesso em: 06/03/2016.

ARISHIMA, T. et al. Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. **Journal of Food Lipids**, v. 16, n. 1, p. 72-88, 2009. ISSN 1745-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01133.x> >. Acesso em: 06/05/2015.

ARISHIMA, T. et al. Suppressive effect of 1-behenoyl-2,3-dioleoyl-rac-glycerol (BOO) on postprandial serum triacylglycerol elevation. **Japanese Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 1069 - 1075, 2007. ISSN 03863603. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->



DRENT, M. L.; VAN DER VEEN, E. A. First clinical studies with orlistat: a short review. **Obesity research**, v. 3 Suppl 4, p. 623S-625S, 1995. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029398377&partnerID=40&md5=01412cc65a18fa3c321d52e772f10150> >.

GILABERT-ESCRIVÁ, M. V. et al. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian Theobroma species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 13, p. 1425-1431, 2002. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1107> >. Acesso em: 03/10/2016.

GILMORE, L. A. et al. Consumption of High-Oleic Acid Ground Beef Increases HDL-Cholesterol Concentration but Both High- and Low-Oleic Acid Ground Beef Decrease HDL Particle Diameter in Normocholesterolemic Men. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1188-1194, June 1, 2011 2011. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/141/6/1188.abstract> >. Acesso em: 05/04/2016.

GUEDES, A. M. M. et al. Physicochemical Properties of Interesterified Blends of Fully Hydrogenated Crambe abyssinica Oil and Soybean Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 111-123, 2014. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2360-7> >. Acesso em: 05/04/2016.

HAN, L. et al. Enzymatically catalyzed synthesis of low-calorie structured lipid in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12635-12642, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-83055179044&partnerID=40&md5=ab64f56074180bbb83fc1712e187ab48> >. Acesso em: 05/04/2016.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 129-140, 10/4/ 2000. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111770000120X> >. Acesso em: 05/04/2016.

JANDACEK, R. J. et al. Effects of dietary behenate and a caprenin-like fat on lipids in the hamster. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 243-249, 4// 1993. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0955286393900596> >. Acesso em: 10/04/2015.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 273-278, 2001. ISSN 0308-8146.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380258/> >. Acesso em: 06/03/2016.

KANJILAL, S. et al. Hypocholesterolemic effects of low calorie structured lipids on rats and rabbits fed on normal and atherogenic diet. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 259-265, 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612012319> >. Acesso em: 05/04/2015.

KANJILAL, S. et al. **Synthesis and estimation of calorific value of a structured lipid-potential reduced calorie fat.** 1999. 1045-55 ISBN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.biomedsearch.com/nih/Synthesis-estimation-calorific-value-structured/10580332.html> >. Acesso em: 10/04/2015.

KOJIMA, M. et al. The consumption of a structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids increases fecal fat excretion in humans. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 12, p. 997-1001, 2013. ISSN 13458957. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84888633646&partnerID=40&md5=0aae616c88e0277b0179a5effda6be37> >. Acesso em: 10/04/2015.

KOJIMA, M. et al. Structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids suppresses triacylglycerol absorption and prevents obesity in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 1, p. 77, 2010. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.lipidworld.com/content/9/1/77> >. Acesso em: 10/04/2015.

LIAO, F.-H. et al. Effects of different ratios of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids on regulating body fat deposition in hamsters. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 811-817, 2010. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900709004018> >. Acesso em: 10/08/2015.

LIVESEY, G. The absorption of stearic acid from triacylglycerols: an inquiry and analysis. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 02, p. 185-214, 2000. ISSN 1475-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1079/095442200108729061> >. Acesso em: 04/05/2016.

LÓPEZ FARRÉ, A.; MACAYA, C. Utilidad terapéutica de los ácidos grasos omega-3 Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. **Revista Española de Cardiología Suplementos**, v. 6, n. 4, p. 31D-37D, 2006/01/01 2006. ISSN 1131-3587. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1131358706748245> >. Acesso em: 20/03/2016.

LOVEJOY, J. C. et al. Consumption of a controlled low-fat diet containing olestra for 9 months improves health risk factors in conjunction with weight loss in obese men: the Ole' Study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 27, n. 10, p. 1242-1249, //print 2003. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0802373> >. Acesso em: 10/08/2015.

LUNAGARIYA, N. A. et al. Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 897-921, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84907660761&partnerID=40&md5=6d278cb43ceec4fa60b7dbf5e5933236> >. Acesso em: 10/04/2015.

MACAMBIRA, L. M. A. et al. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste - *Lippia sidoides* Cham. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 449-452, 1988. ISSN 0044-5967. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59671988000500449&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59671988000500449&nrm=iso) >. Acesso em: 10/04/2015.

MOUNIKA, C.; YELLA REDDY, S. Specialty Fats Enriched with Behenic and Medium Chain Fatty Acids from Palm Stearin by Lipase Acidolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 9, p. 1691-1697, 2012// 2012. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-012-2059-1> >.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils : formulating and processing for applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009. ISBN 9781420061666 1420061666.

OLEFSKY, J. M. Fat Talks, Liver and Muscle Listen. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 914-916, 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408011203> >. Acesso em: 10/03/2016.

PEREZ-JIMENEZ, F. et al. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 7, p. 421-424, 2005. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-22244490340&partnerID=40&md5=1c022080bc565465462f83ddf141b2e1> >. Acesso em: 20/06/2016.

PETERS, J. C. et al. Assessment of the Nutritional Effects of Olestra, a Nonabsorbed Fat Replacement: Introduction and Overview. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 8, p. 1539S-1546S, August 1, 1997 1997. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/127/8/1539S.abstract> >. Acesso em: 10/04/2015.

POLONINI, H. C. et al. Amazon native flora oils: in vitro photoprotective activity and major fatty acids constituents. **Rev Bras Farm**, v. 93, n. 1, p. 102-8, 2012. Acesso em: 18/05/2016.

QUEIROZ, J. C. F. D. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 582-594, 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500011&nrm=iso) >. Acesso em: 20/02/2016.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química Nova**, v. 30, p. 1295-1300, 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000500043&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000500043&nrm=iso) >. Acesso em: 10/05/2016.

ROY, H. J. et al. Effect on body weight of replacing dietary fat with olestra for two or ten weeks in healthy men and women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 259-267, 2002. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036016084&partnerID=40&md5=dc7f34b0fb10d410046e9394063a3041> >. Acesso em: 10/04/2015.

SALES-CAMPOS, H. et al. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013. ISSN 1389-5575. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/234029752\\_An\\_Overview\\_of\\_the\\_Modulatory\\_Effects\\_of\\_Oleic\\_Acid\\_in\\_Health\\_and\\_Disease](https://www.researchgate.net/publication/234029752_An_Overview_of_the_Modulatory_Effects_of_Oleic_Acid_in_Health_and_Disease) >. Acesso em: 15/05/2016.

SORENSEN, L. B. et al. The effect of salatrim, a low-calorie modified triacylglycerol, on appetite and energy intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1163-1169, May 1, 2008. Disponível em: < <http://ajcn.nutrition.org/content/87/5/1163.abstract> >. Acesso em: 10/04/2015.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, CHARLES N. Resolvins, Specialized Proresolving Lipid Mediators, and Their Potential Roles in Metabolic Diseases. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 21-36, 1/7/ 2014. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155041311300418X> >. Acesso em: 03/02/2016.

TIWARI, N. J.; SAWANT, S. B. Behenic acid esters: kinetics and properties. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 1, p. 30-35, 2005. ISSN 1438-9312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200401031> >. Acesso em: 10/04/2015.

TYNEK, M.; LEDÓCHOWSKA, E. STRUCTURED TRIACYLGLYCEROLS CONTAINING BEHENIC ACID: PREPARATION AND PROPERTIES. **Journal of Food Lipids**, v. 12, n. 1, p. 77-89, 2005. ISSN 1745-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2005.00007.x> >.

VERA, R. et al. Características químicas de amêndoas de barueiros (*dipteryx alata* vog.) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 112-118, 2009. ISSN 0100-2945. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452009000100017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452009000100017&nrm=iso) >. Acesso em: 11/05/2016.

WEBB, D. R. et al. Caprenin 2 - Short-term safety and metabolism in rat and hamsters. **International Journal of Toxicology**, v. 10, p. 341 - 356, 1991.

WEBB, D. R.; SANDERS, R. A. Caprenin 1 - Digestion, absorption, and rearrangement in thoracic duct-cannulated rats. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 325-340, 1991. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025834588&partnerID=40&md5=15f0786b46549abfd7a4779fb5fb0c04> >. Acesso em: 10/04/2015.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 4, p. 287-303, 2000. ISSN 1438-9312. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200004\)102:4<287::AID-EJLT287>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200004)102:4<287::AID-EJLT287>3.0.CO;2-Q) >. Acesso em: 12/05/2016.

YOSHIDA, R.; AOYAMA, T.; YAMAMOTO, T. Absorption of mono-saturated long-chain di-middle-chain triglyceride. **Digest Absorpt**, v. 14, p. 27 - 30, 1991.

## CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS COM POTENCIAL ANTI-OBESIDADE E FONTE DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Débora K. T. Moreira <sup>a</sup>; Juliana N. R. Ract <sup>b</sup>, Ana Paula B. Ribeiro <sup>c</sup>; Gabriela A. Macedo <sup>a,d</sup>

a - Departamento de Ciências de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – CEP: 13083-862 – Campinas/SP - Brasil, Telefone: 55 (19) 3521-4085 - e-mail: ([deborakono@hotmail.com](mailto:deborakono@hotmail.com)).

b- Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Av. Professor Lineu Prestes, 580 – CEP: 05508-000 - São Paulo/ SP – Brasil.

c - Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – CEP: 13083-862 – Campinas/SP – Brasil.

d- Departamento de Alimentos e Nutrição – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – CEP: 13083-862 – Campinas/SP - Brasil, Telefone: 55 (19) 3521-4077 - e-mail: ([macedoga@gmail.com](mailto:macedoga@gmail.com)).

Artigo a ser submetido na revista LWT- Food Science and Technology

### RESUMO

A estrutura dos óleos e gorduras naturais pode ser redesenhada, a partir da reorganização dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerídeo (TAG), levando à modificações no comportamento químico, físico e nutricional. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi produzir lipídios estruturados (LE), a base de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado, por meio de interesterificação enzimática; e avaliar as modificações químicas e físicas perante as misturas originais. Dentre as misturas avaliadas, a mistura OSC (oliva, soja e crambe) apresentou a melhor combinação, em relação às classes de ácidos graxos saturados, insaturados e poli-insaturados. A interesterificação causou aumento no tempo da cristalização e diminuiu a porcentagem de gordura sólida de todas as misturas, principalmente pela lipase Lipozyme TL IM (TL), em função do rearranjo dos ácidos graxos nos TAG. A modificação das misturas simples pelas lipases provocou uma alteração no comportamento térmico, levando à diminuição da temperatura do início e do fim da cristalização, e da entalpia, indicando que as amostras interesterificadas liberaram menos energia ao cristalizarem. Em relação à regioespecificidade, a lipase TL atuou de forma randômica, enquanto a lipase de *Rhizopus* sp. foi específica para posição *sn*-1,3. Houve aumento nos teores de TAGs monossaturados com ácido behênico e diminuição dos tri-insaturados pela dissociação do TAG trissaturado e dissaturado pela TL, o qual provocou alterações associadas a formação de cristais com morfologia típica de esferulitos. Na avaliação cinética de produção do LE, a estabilização se deu após 8h de reação. Foi possível sintetizar um LE com ácido behênico e ácidos graxos insaturados, com características físico-químicas diferentes da mistura original.

**Palavras chave:** interesterificação enzimática; regioespecificidade; ácido behênico.

### ABSTRACT

The basic structure of the oils and fats can be redesigned from the reorganization of fatty acids in the main chain of triacylglycerol (TAG), leading to changes in the physical, chemical, and nutritional behavior. In this way, the objective of this work was to produce structured lipids (SL), which are the base of olive oil, soybean oil and fully hydrogenated crambe oil, by

enzymatic interesterification and to evaluate the physical and chemical changes before in the original mixture. Among the evaluated mixtures, the OSC mixture (olive, soybean and crambe) showed the best combination of the 3 fatty acids classes: saturated, unsaturated and polyunsaturated. The interesterification increased the induction time and decreased the percentage of all solid mixtures, mainly by lipase Lipozyme TL IM (TL), due to fatty acids rearrangement in the TAGs. The modification of simple mixtures by lipases caused changes in the thermal profile and enthalpy, therefore reducing the temperature at the start and finish of crystallization. Which indicates that less energy was released in the interesterified samples crystallization. In regard to regiospecificity, the TL acted randomly, while *Rhizopus* sp. was specific in the position *sn*-1,3. There was an increase in monounsaturated TAGs with behenic and reduction of triunsaturated by disaturated TAG dissociation, which is formed by behenic acid in the interesterification reaction catalyzed by TL, developing spherulites crystals. In the LE production kinetics, stabilization occurred after 8h of reaction. However, it was possible to create an LE with behenic acid and unsaturated fatty acids, with different characteristics from the original mixture.

**Keywords:** enzymatic interesterification; regiospecific distribution; behenic acid.

## 1.INTRODUÇÃO

Lipídios estruturados (LE) são definidos como triacilgliceróis (TAG) reestruturados ou modificados, obtidos por meio de interesterificação química ou enzimática a partir de triacilgliceróis de cadeias curta, média e/ou longa, de gorduras vegetais ou animais, ou ainda por engenharia genética, com a finalidade de alterar a composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula de glicerol. São sintetizados com o objetivo de obter lipídios nutracêuticos ou funcionais, que possam proporcionar benefícios específicos para a saúde, bem como melhorar ou modificar as características físicas, químicas e reológicas de óleos e gorduras, além de alterar ou incrementar as propriedades nutricionais dos alimentos (D'AGOSTINI e GIOIELLI, 2002; OSBORN e AKOH, 2002).

Os lipídios estruturados com baixa caloria têm sido amplamente utilizados em estudos de absorção e empregados em nutrição clínica no combate à obesidade. Estudos anteriores relatam sua obtenção através de interesterificação de óleos vegetais e o ácido behênico (ARISHIMA *et al.*, 2007; ARISHIMA *et al.*, 2009; KOJIMA *et al.*, 2010; KOJIMA *et al.*, 2013). A lipase pancreática é uma enzima digestiva que catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e monoacilgliceróis no intestino. O ácido behênico inibe a atuação da lipase pancreática, através do impedimento da hidrólise dos triacilgliceróis, consequentemente a sua absorção, que promove a redução das calorias e lhe concede o efeito antiobesidade (ARISHIMA *et al.*, 2009). Essa inibição pode ser explicada pela não formação do complexo enzima-substrato (KOJIMA *et al.*, 2013); ou devido à baixa difusão do ácido behênico na fase oleosa,

que bloquearia a interface de atuação da lipase (KANJILAL *et al.*, 1999); resultando no impedimento da hidrólise.

O ácido behênico pode ser obtido por meio da hidrogenação do óleo de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), uma oleaginosa da família Brassicaceae que possui 38% de óleo na composição da sua semente. O óleo de crambe é constituído por até 57% de ácido erúico (C22:1), podendo ser aplicado em uma diversidade de produtos industrializados (PITOL, 2010). Contudo, não pode ser direcionado ao consumo humano, devido ao seu alto grau de toxicidade, pois pode causar lesões cardíacas e perturbar outros processos fisiológicos. Entretanto, quando hidrogenado completamente, a dupla ligação do ácido erúico presente em sua composição é eliminada e este é convertido em ácido behênico (C22:0) que pode ser ingerido sem restrições nutricionais (MCNEILL & SONNET, 1995 apud NO *et al.*, 2013).

Outro papel importante dos lipídios estruturados é o fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados e/ou ácidos graxos essenciais (AGE), como o ácido linoléico (18:2n-6) e o ácido linolênico (18:3n-3) (SILVA e GIOIELLI, 2009; RODRIGUES-RACT *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011; CAO *et al.*, 2013), que são encontrados em óleos vegetais, como o de soja. Esses ácidos graxos são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento ao longo do ciclo da vida humana, além de promoverem melhorias na saúde (STEIN, 1999; WEN CHANG *et al.*, 2004). Da mesma forma, o ácido oléico (18: 1n-9) (VISTISEN, MU e HØY, 2006; NUNES *et al.*, 2012), encontrado no azeite de oliva, apesar de não ser essencial, desempenha um ótimo papel na redução de riscos de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e síndrome metabólica (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

De acordo com Osborn e Akoh (2002), é interessante, do ponto de vista nutricional, incorporar ácidos graxos de cadeia longa insaturados na posição *sn*-2, tornando-os mais biodisponíveis, já que a lipase pancreática exerce menor atividade sobre estes ácidos graxos quando estão presentes nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos triacilgliceróis. Por este motivo, a localização do ácido behênico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 pode favorecer a baixa absorção dos lipídios, sem comprometer os ácidos graxos localizados em *sn*-2. Com base nesta perspectiva, a síntese deste tipo de LE, exige modificações específicas nas posições desejadas na molécula do glicerol. Embora a interesterificação química, catalisada por alcóxidos de metais seja simples e de baixo custo, não possui caráter regioespecífico, mas sim aleatório, além de apresentar a desvantagem de gerar grande quantidade de resíduos químicos, como os sabões. Em contraste, as reações catalisadas por lipases são mais promissoras para a modificação posicional específica dos triacilgliceróis e geram menos resíduos na produção de LE. Além disto, a enzima pode ser reutilizada repetidamente e os lipídios minoritários, assim como

outros compostos com função bioativa, são melhores preservados, uma vez que a reação ocorre em temperaturas mais amenas quando comparadas às praticadas na interesterificação química (IWASAKI e YAMANE, 2000).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo sintetizar lipídios estruturados com menor aporte calórico resultante de sua ingestão, visando à prevenção e o tratamento da obesidade, e com melhores propriedades nutricionais, promovendo melhor absorção de ácidos graxos das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6. Foram utilizados como matérias-primas óleo de soja, por seu baixo custo e alto teor de ácidos graxos insaturados, azeite de oliva, por seu aroma e alto teor de ácido oleico, e óleo de crambe totalmente hidrogenado, como fonte de ácido behênico, devido à sua absorção parcial durante a digestão.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matérias-primas (MP)**

Foram utilizadas no experimento as seguintes matérias-primas: azeite de oliva extra virgem, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado. O azeite de oliva, da variedade Arbequina, do tipo extra virgem, foi doado pela empresa Olivas do Sul (Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil); o óleo de soja foi adquirido no comércio local de Campinas/SP e o óleo de crambe totalmente hidrogenado foi doado pela empresa Cargill. As lipases utilizadas foram a *Thermomyces lanuginosa* imobilizada (Lipozyme TL IM) da Novozymes A/S e a lipase bruta de *Rhizopus* sp. foi obtida por fermentação sólida no laboratório de bioquímica de alimentos da FEA/UNICAMP.

### **2.2 Obtenção da lipase de *Rhizopus* sp.**

A lipase bruta de *Rhizopus* sp. foi obtida conforme Costa (1997) e Macedo, Pastore e Rodrigues (2004) utilizando o meio de cultura composto por 40% de água destilada e 60% de farelo de trigo (m/m), e incubados a 30 °C por 120 horas. O meio foi filtrado, concentrado com sulfato de amônio até atingir 80% de saturação. Em seguida foi centrifugado e dialisado utilizando membrana de celulose (Sigma-Aldrich), contra água destilada por 24 horas, sob-refrigeração. Posteriormente, o material foi congelado e liofilizado, sendo denominado de preparação enzimática bruta.

A atividade da lipase foi determinada de acordo com Macedo, Park e Pastore (1997). O substrato utilizado foi uma emulsão contendo 25% de azeite de oliva extra virgem e 75% de

goma arábica a 7% (v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M usando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima (mg) necessária para liberar 1  $\mu$ mol de ácido graxo em um minuto de reação nas condições do ensaio.

### 2.3 Caracterização das matérias-primas

O azeite de oliva, o óleo de soja e o óleo de crambe totalmente hidrogenado foram caracterizados quanto à sua composição em ácidos graxos (AOCS Ce 1f-96 -2009), composição triacilglicerólica (AOCS Ce 5-86 – 2009 e comportamento térmico (perfil de cristalização) (AOCS Cj 1-94 - 2009). O índice de iodo e o de saponificação foram calculados a partir da composição em ácidos graxos segundo os métodos AOCS Cd 1C-85 (2009) e AOCS Cd 3a-94 (2009), respectivamente.

### 2.4 Reação de Interesterificação

Os lipídios estruturados (LE) foram produzidos a partir da interesterificação de três misturas em diferentes proporções. A primeira foi preparada com azeite de oliva e óleo de crambe totalmente hidrogenado; a segunda com azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado; e o terceiro com óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado, conforme descrição apresentada na Tabela 1. A quantidade máxima de óleo de crambe totalmente hidrogenado foi de 10% com intuito de manter as misturas fundidas à temperatura máxima de atuação das lipases, que corresponde a 60 °C.

**Tabela 1.** Proporção dos óleos para obtenção dos lipídios estruturados.

Sistemas	Matéria-prima	Proporção (% m/m)
Mistura 1 (OC)	Azeite de oliva	90
	Óleo de crambe totalmente hidrogenado	10
Mistura 2 (OSC)	Azeite de oliva	45
	Óleo de soja	45
	Óleo de crambe totalmente hidrogenado	10
Mistura 3 (SC)	Óleo de soja	90
	Óleo de crambe totalmente hidrogenado	10

As reações de interesterificação foram realizadas de acordo com Speranza, Ribeiro e Macedo (2016) com modificações. A reação ocorreu em frascos de vidros âmbar fechados hermeticamente e adicionados de gás nitrogênio para evitar oxidação. A reação ocorreu em

banho maria Dubnoff a 60 °C por 24 horas, sob agitação orbital de 180 rpm. As amostras foram fundidas a 80 °C e depois resfriadas e mantidas a 60 °C por 10 min ou até estabilizar nesta temperatura. Em seguida, foram adicionados 60 U por grama de substrato total de lipase Lipozyme TL IM e 13 U por grama de substrato total de *Rhizopus* sp., onde uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo em um minuto, por miligrama de enzima a 37°C. Após a reação, a lipase foi removida com membrana Millex hidrofílica de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm de poro e 33 mm de diâmetro e armazenada em freezer -20 °C. A reação foi feita numa escala de 100g de substrato, utilizando 5% de enzima (m/m).

## **2.5 Estudo da cinética da produção de lipídios estruturados**

Ao final do experimento foi realizada a cinética da reação com o intuito de otimizar a produção do lipídio estruturado, por meio da determinação do melhor tempo de reação e da melhor quantidade de enzima a ser utilizada. A reação foi catalisada pela Lipozyme TL IM em diferentes proporções (2,5, 5, 10 e 15% em relação ao peso total do substrato) em diferentes tempos de reação (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 24 horas). A produção do lipídio se deu conforme a reação de interesterificação descrita anteriormente e a avaliação do processo empregou a técnica de comportamento térmico na cristalização por calorimetria de varredura diferencial (DSC) conforme o método AOCS Cj 1-94 (2009).

## **2.6 Caracterização físico-química das misturas simples e dos lipídios estruturados**

### **2.6.1. Purificação dos lipídios estruturados**

Após remoção da lipase por filtração, os lipídios estruturados foram purificados visando à remoção dos ácidos graxos livres. Foi adicionado etanol aos LEs na proporção 3:1 e a mistura foi mantida em banho Maria a 80 °C por 5 min. Por fim, uma vez separadas as fases, a fase alcoólica foi descartada e o procedimento repetido por mais duas vezes (FARMANI, SAFARI e HAMED, 2006).

### **2.6.2. Composição em ácidos graxos**

A composição em ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso CGC Agilent 6850 Series GC System, após esterificação realizada segundo Hartman e Lago (1973). Os

ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento da AOCS Ce 1f-96 (2009) em coluna capilar DB-23 Agilent (50% Cyanopropyl-methylpolysiloxane), de dimensões: 60 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: gás de arraste: hélio, em vazão de 1,0 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura do detector = 280 °C; temperatura do injetor = 250 °C; temperatura do forno = 110-215 °C a 5 °C/min, 215 °C por 24 min; volume de injeção = 1,0 µL; injeção split, razão 1:50. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos.

#### 2.6.3. Teor de acilgliceróis parciais (HPSEC)

As análises de classes de compostos glicerídicos foram realizadas segundo Dobarganes, Velasco e Dieffenbacher (2000). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Perkin Elmer LC-250 com detector de índice de refração Sicon Analytic. Foram utilizadas as colunas Jordi gel de divinilbenzeno (DVB) de 100 e 500 Å de porosidade, 5µ do tamanho da partícula, 30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno. A fase móvel utilizada foi de tetrahydrofurano (THF) grau HPLC com fluxo de 1 mL/min. As famílias de compostos foram identificadas por comparação dos tempos de eluição com padrões de: triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos livres (AG).

#### 2.6.4. Composição triacilglicerólica

As composições em triacilgliceróis foram obtidas segundo o método AOCS Ce 5-86 (2009), em cromatógrafo gasoso CGC Agilent 6850 Series GC System. A coluna capilar utilizada foi a DB-17 HT Agilent Catalog: 122-1811 (50% fenil-metilpolisiloxano), com dimensões de 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da coluna = 1,0 ml/min; velocidade linear = 40 cm/seg; temperatura do detector = 375 °C; temperatura do injetor = 360 °C; temperatura do forno: 280-340 °C a 2 °C/min e 340 °C por 40 min; gás de arraste: hélio; volume injetado = 1,0 µL, injeção split, razão 1:100; concentração amostra = 10 mg/ml de tetrahydrofurano. A identificação dos TAGs foi realizada segundo uma metodologia preditiva utilizando o software PrOleos 2 segundo Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995) e

comparando o tempo de retenção com os possíveis TAG de maior porcentagem dentro dos grupos com determinado número de carbono.

#### 2.6.5. Distribuição Regioespecífica

A distribuição regioespecífica dos ácidos graxos na cadeia do triacilglicerol foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear de alta resolução do  $^{13}\text{C}$ . Amostras de 250 mg foram dissolvidas em 0,5 mL de clorofórmio deuterado em tubos de RMN de 5 mm, e os espectros foram registrados em um espectrômetro Bruker Advance DPX operando a 300 MHz. A determinação foi realizada à frequência de 75,8 MHz com uma sonda multi-nuclear de 5 milímetros operando a 30 °C, segundo método descrito por Vlahov (2005). Os resultados mostraram as posições de ácidos graxos saturados, ácido oleico e a somatória dos ácidos linoléico e linolênico nas posições sn-2 e sn-1,3.

#### 2.6.6. Isotermas de cristalização

As isotermas de cristalização foram realizadas à temperatura de 15 °C, segundo Marangoni & McGauley (2003). Foi utilizado o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker Mq20 NMR Analyzer, juntamente com o banho seco TCON 2000 Duratech. A amostra foi primeiramente fundida e então mantida por 60 min a 70 °C para completa destruição do seu histórico cristalino (RIBEIRO *et al.*, 2009). Em seguida, as leituras foram efetuadas automaticamente a cada minuto à temperatura de 15 °C.

#### 2.6.7. Comportamento térmico de cristalização

A análise térmica das amostras foi realizada em calorímetro diferencial de varredura (Differential Scanning Calorimeters – DSC) modelo Q2000 (TA Instruments) conforme o método AOCS Cj 1-94 (2009), usando massas de amostras de 8 a 12 mg. A curva de cristalização foi obtida através do aquecimento a 80 °C por 10 min, com posterior resfriamento de 80 °C a -80 °C com taxa de 10°C/min. Os dados foram processados no *software* Platinum™.

### 2.6.8. Microestrutura cristalina

A morfologia e estudo das dimensões cristalinas foram de acordo com Ribeiro, Grimaldi, *et al.* (2009). As amostras foram fundidas à temperatura de 70 °C em forno de micro-ondas. Com o auxílio de um tubo capilar, uma gota de amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida em temperatura controlada (70°C) e coberta com uma lamínula. As lâminas foram preparadas em duplicata e mantidas durante 4 h em BOD à temperatura de 15 °C. A morfologia dos cristais foi avaliada com o uso de microscópio de luz polarizada (Olympus BX 53) acoplado a câmara de vídeo digital (Media Cybernetics). As lâminas foram colocadas sobre o suporte da placa de aquecimento, mantida à mesma temperatura de cristalização. As imagens foram capturadas pelo aplicativo Image Pro-Plus 7.0 (Media Cybernetics), utilizando luz polarizada, com ampliação de 40 vezes. Para cada lâmina foram focalizados três campos visuais. O diâmetro médio dos cristais e o número de elementos cristalinos foram os parâmetros de avaliação selecionados para a análise quantitativa das imagens.

## 2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram baseadas na Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey, para determinar as diferenças significativas das médias ao nível de probabilidade de 5% ( $p < 0.05$ ), utilizando o *software Minitab16*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Caracterização física e química das misturas antes e após a interesterificação

A escolha das matérias-primas, óleo de soja e azeite de oliva, foi realizada de acordo com os benefícios nutricionais proporcionados pelo seu perfil lipídico, uma vez que possuem ácidos graxos insaturados de cadeia longa ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9). Já a escolha do óleo de crambe totalmente hidrogenado foi realizada por conter ácido behênico, um inibidor natural da enzima lipase pancreática, na sua composição. A distribuição desses ácidos graxos na estrutura do glicerol é de grande importância tecnológica, pois o óleo de crambe totalmente hidrogenado é sólido e possui alto ponto de fusão (TIWARI e SAWANT, 2005); e nutricional, pelo fato dos ácidos graxos na posição *sn*-2 serem melhores absorvidos do que os da posição *sn*-1 e 3 (MCCLEMENTS, DECKER e PARK, 2008). Portanto, a interesterificação pode facilitar o

uso do ácido behênico e aumentar a biodisponibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados.

Diante do exposto, verificou-se primeiro a composição em ácidos graxos das matérias-primas para encontrar as melhores combinações entre os óleos e a gordura escolhidos, como apresentado na Tabela 2.

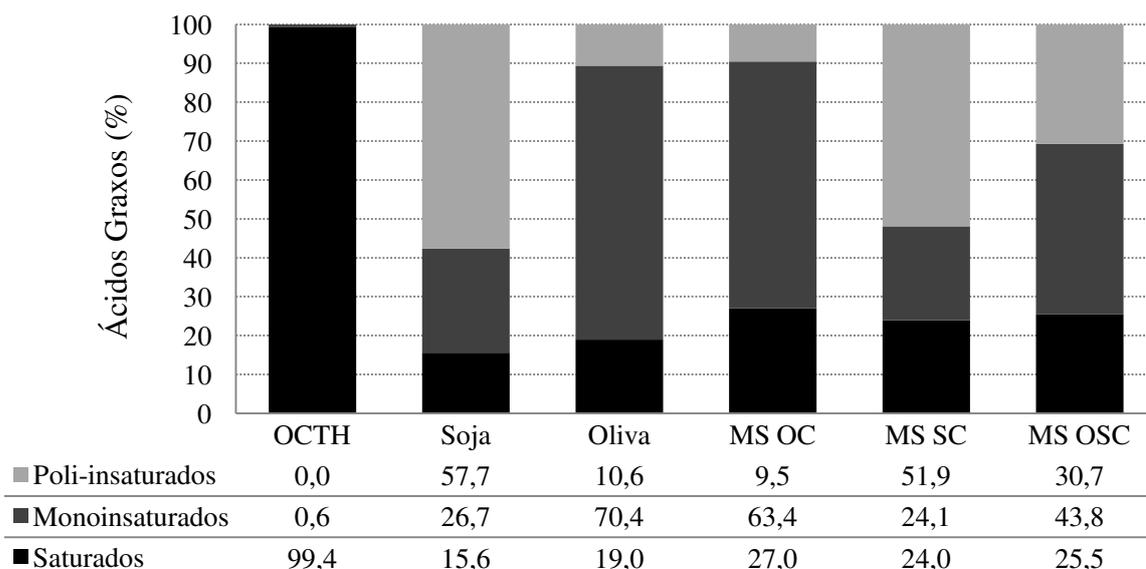
O óleo de crambe totalmente hidrogenado apresentou os ácidos, esteárico (31,7%), araquídico (5,9%) e behênico (57,0%) como os principais ácidos da sua composição, estando de acordo com Guedes (2014). Esses ácidos se formaram a partir da saturação das ligações duplas dos ácidos graxos originais do óleo de crambe. No perfil lipídico do óleo de soja foram predominantes os ácidos, palmítico (11,1%), oléico (26,4%), linoléico (51,5%) e linolênico (5,4%), sendo semelhantes com Ribeiro *et al.* (2009) e Guedes (2014). Para o azeite de oliva os ácidos graxos que formam sua composição são principalmente os ácidos palmítico (16,5%), oléico (67,7%) e linoléico (10,0%), apresentando dentro das estimativas da ANVISA (1999).

**Tabela 2.** Composição em ácidos graxos (% m/m) das amostras de óleos puros e das misturas simples de óleo de soja (S), azeite de oliva (O) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (C).

ÁCIDO GRAXO		ÓLEO PURO			MISTURA SIMPLES		
		CRAMBE	SOJA	OLIVA	OC	OSC	SC
Ac. Láurico	C12:0	0,1	-	-	-	-	-
Ac. Mirístico	C14:0	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1
Ac. Palmítico	C16:0	2,4	11,1	16,5	15,0	12,6	10,2
Ac. Palmitoléico	C16:1	-	0,1	2,2	2,0	1,1	0,1
Ac. Heptadecanóico	C17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ac. Heptadecenóico	C17:1	-	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
Ac. Esteárico	C18:0	31,7	3,4	1,8	4,8	5,5	6,2
Ac. Oléico	C18:1	0,2	26,3	67,7	61,0	42,3	23,7
Ac. Linoléico Trans	C18:2 t	-	0,2	-	-	0,1	0,2
Ac. Linoléico	C18:2	-	51,5	10,0	9,0	27,7	46,4
Ac. Linolênico trans	C18:3 t	-	0,6	-	-	0,3	0,5
Ac. Linolênico	C18:3	-	5,4	0,6	0,6	2,7	4,9
Ac. Araquídico	C20:0	5,9	0,4	0,4	1,0	0,9	0,9
Ac. Gadoléico	C20:1	-	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
Ac. Behênico	C22:0	57,0	0,4	0,2	5,9	6,0	6,1
Ac. Erúxico	C22:1	0,4	-	-	-	-	-
Ac. Lignocérico	C24:0	2,1	0,2	-	0,2	0,3	0,4
Índice de Iodo (gI <sub>2</sub> /100g)		0,5	132	83	-	-	-
Índice de saponificação (mgKOH/g)		169	192	193	-	-	-

Os índices de iodo e saponificação estão representados na Tabela 2, foram calculados a partir da composição em ácidos graxos e apresentaram resultados similares com Ambiel (2013) e Guedes (2011) para o óleo de crambe totalmente hidrogenado, com os parâmetros de qualidade e identidade do Codex (2003) para o azeite de oliva virgem e dentro do Codex (2005) para o óleo de soja. O índice de iodo representa o grau de insaturação dos óleos e gorduras e estão de acordo com o esperado, uma vez que o óleo de soja apresentou um índice maior, seguido do azeite de oliva e crambe hidrogenado de acordo com o grau de insaturação da amostra. O índice de saponificação é uma indicação da quantidade relativa de ácidos graxos de alto e baixo peso molecular, e está de acordo com os tamanhos das cadeias de ácidos graxos presentes nas matérias-primas.

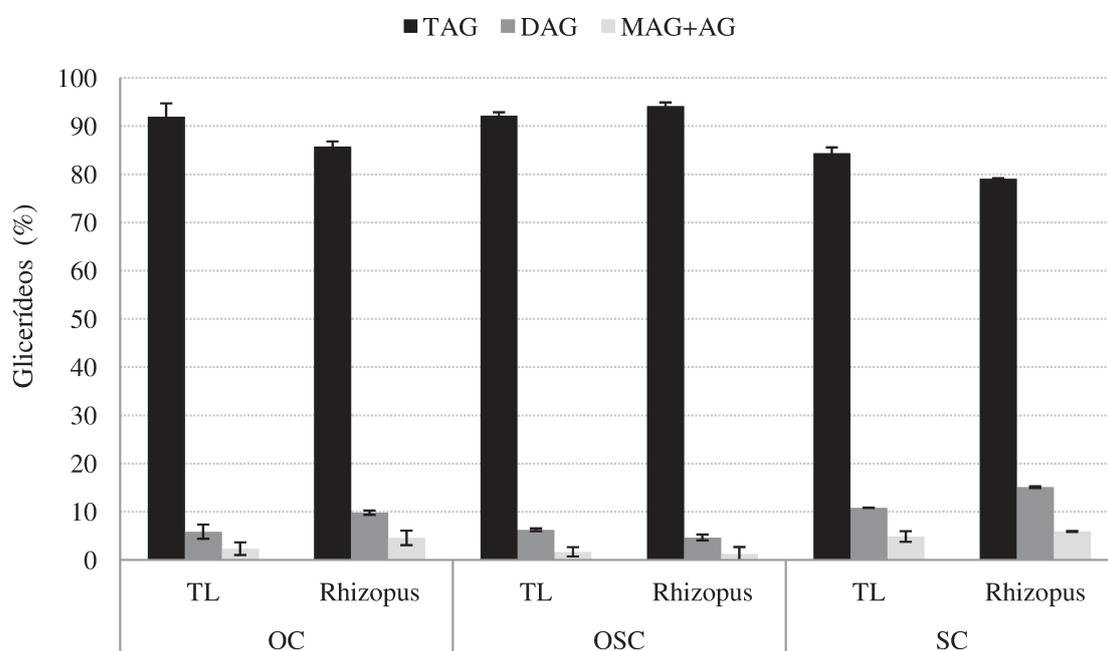
A Figura 1 mostra a proporção dos ácidos graxos poli-insaturados, monoinsaturados e saturados na composição das matérias-primas e misturas simples. A mistura de azeite de oliva com óleo de crambe totalmente hidrogenado apresentou mais ácidos graxos monoinsaturados e saturados, provenientes dos ácidos oléico e behênico, respectivamente. A mistura óleo de soja com óleo de crambe totalmente hidrogenado apresentou quantidades semelhantes de monoinsaturados e saturados e uma quantidade elevada de poli-insaturados, principalmente linoléico. Já a mistura das três matérias-primas apresentou uma quantidade intermediária das 3 classes de ácidos graxos quando comparada com as misturas OC e SC, sobressaindo os ácidos graxos monoinsaturados (oléico).



**Figura 1.** Composição em classes de ácidos graxos (% m/m) do óleo de crambe totalmente hidrogenado (OPTH), do óleo de soja, do azeite de oliva e das misturas simples (MS) de OC, SC e OSC.

Após a análise de composição em ácidos graxos foi feita a reação de interesterificação das misturas simples para modificar as características de óleos e gorduras, por meio da alteração da distribuição dos ácidos graxos na estrutura do glicerol, com o uso das lipase Lipozyme TL IM e *Rhizopus* sp. A reação foi realizada a 60 °C, conforme testes preliminares, adicionando a quantidade máxima de óleo de crambe totalmente hidrogenado que mantivesse a mistura líquida, a qual foi 10%, tanto para a mistura OC, SC e OSC.

Após a reação de interesterificação foi feito primeiro a análise das classes glicéridicas, como mostra a Figura 2. Essa análise separa os compostos em 3 classes: triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) mais ácidos graxos livres (AG). Observa-se que a quantidade de triacilgliceróis é maior do que as outras, comprovando que houve a hidrólise seguida de esterificação, deixando pouca quantidade de diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres, tanto para a reação catalisada com a lipase Lipozyme TL IM como com *Rhizopus* sp. Resultados semelhantes foram encontrados por Guedes *et al.* (2014) num estudo de interesterificação química de misturas de óleo de soja (OS) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OCTH) em diferentes proporções.



**Figura 2.** Classe de compostos acilgliceróis (%) em misturas simples e interesterificadas de OSC (Oliva, Soja e Crambe), OC (Oliva e Crambe) e SC (Soja e Crambe).

Após a confirmação do alto teor de TAG, foi feita a avaliação do comportamento térmico destes por DSC para analisar a diferença entre as misturas simples e interesterificada

de Oliva e Crambe (OC), Soja e Crambe (SC) e Oliva, Soja e Crambe (OSC), como mostra a Tabela 3, onde se pode visualizar a temperatura inicial (Ti), final (Tf), variação de temperatura ( $\Delta T$ ), temperatura máxima de pico das duas cristalizações (TMP), além da altura do pico (AP) e a entalpia envolvida.

**Tabela 3.** Eventos de cristalização (DSC) da mistura simples (MS) e mistura interesterificada (MI) durante 24h, das misturas de OC (Oliva e Crambe), SC (Soja e Crambe) e OSC (Oliva, Soja e Crambe).

Amostra	Enzima	Cristalização	Ti (°C)	Tf (°C)	$\Delta T$ (°C)	TMP (°C)	Entalpia (J/g)	AP (W/g)	
OC	MS	Pico 1	41,68	27,48	14,21	40,79	10,72	0,84	
		Pico 2	-6,91	-56,99	-50,09	-46,51	37,23	0,25	
		Pico 3	-	-	-	-	-	-	
	Lipozyme TL	Pico 1	17,46	-23,39	-40,85	5,91	16,83	0,12	
		IM	Pico 2	-39,73	-56,92	-17,20	-50,16	13,46	0,30
	MI	<i>Rhizopus</i> sp.	Pico 1	26,41	15,68	10,73	22,96	1,68	0,06
Pico 2			12,84	-43,28	56,12	-2,62	21,97	0,11	
Pico 3			-43,28	-45,89	50,53	-57,21	14,69	0,37	
SC	MS	Pico 1	39,91	23,855	16,06	38,945	7,975	0,52	
		Pico 2	-6,98	-64,17	-57,19	-40,12	20,58	0,10	
	Lipozyme TL	Pico 1	17,03	-64,53	-81,56	-1,97	37,63	0,12	
		IM	Pico 2	-65,73	-71,63	-5,90	-70,14	0,35	0,01
	MI	<i>Rhizopus</i> sp.	Pico 1	29,18	16,46	12,72	25,77	2,61	0,09
			Pico 2	14,69	-69,57	84,26	-7,28	40,80	0,11
Pico 3			-69,57	-73,83	4,27	-72,64	0,40	0,02	
OSC	MS	Pico 1	33,80	22,44	-11,37	31,20	2,34	0,11	
		Pico 2	-7,27	-54,44	-47,17	-14,20	17,34	0,12	
	Lipozyme TL	Pico 1	17,39	-49,18	0,91	-66,56	27,38	0,13	
		IM	Pico 2	-58,35	-67,29	-63,06	-8,94	2,58	0,07
	MI	<i>Rhizopus</i> sp.	Pico 1	26,05	15,97	10,08	22,80	1,65	0,06
			Pico 2	12,70	12,59	2,76	-42,29	20,64	0,10
Pico 3			-44,28	-45,96	50,79	-57,92	14,48	0,35	

Onde, Ti – Temperatura inicial; Tf – Temperatura final; TMP - Temperatura Máxima de Pico; AP – Altura do Pico

Todas as misturas antes e após a interesterificação com a Lipozyme TL IM apresentaram dois picos de cristalização, caracterizados por seu retorno à linha base. As misturas simples exibiram o primeiro pico de cristalização intenso (altura do pico), o qual diminuiu de intensidade após a interesterificação. Este pico é característico de TAGs de elevado pontos de fusão, originados, principalmente do óleo de crambe totalmente hidrogenado. Assim, as misturas simples foram caracterizadas pela presença de TAGs trissaturados e dissaturados com ácidos graxos de cadeia longa no primeiro pico, e TAGs de

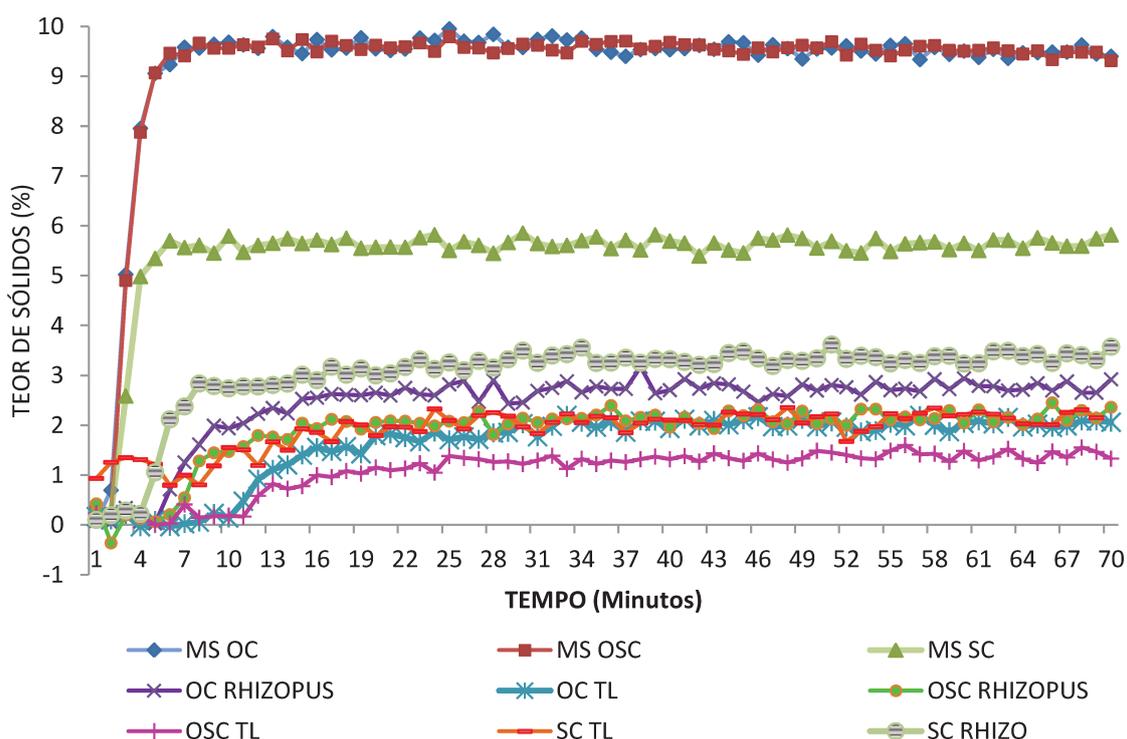
ponto de fusão intermediários no segundo. Já as misturas interesterificadas não apresentaram o primeiro pico referente aos TAGs tri e dissaturados, devido à redistribuição dos ácidos graxos, entretanto apresentaram também dois picos referentes aos novos TAGs formados.

A modificação das misturas simples por ambas as lipases provocou uma alteração no perfil térmico, levando a diminuição da temperatura do início e do fim da cristalização, e da entalpia, indicando que as amostras interesterificadas liberaram menos energia ao cristalizarem, ou seja, a energia medida nesse processo se refere ao rearranjo das moléculas da fase líquida, que perdem energia e reacomodam no estado sólido. Além disso, nota-se que quanto mais ácidos graxos poli-insaturados nos TAGs das amostras, menor a temperatura final e a entalpia de cristalização, como pode ser observado para a mistura SC. Em relação à atuação das enzimas, pode-se notar que a *Rhizopus* sp obteve 3 picos no perfil térmico das misturas, provavelmente pela quebra e/ou redistribuição incompleta dos TAGs tri e dissaturados formados por ácido behênico, apresentando um gasto de energia maior para formação dos cristais do que a lipase Lipozyme TL IM.

Para saber se houve modificação no conteúdo sólido de gordura pelos novos TAGs formados após a interesterificação, foi feita a análise de isoterma de cristalização das amostras a 15°C, conforme Figura 3. O tempo de indução de formação dos cristais foram de 3 minutos das misturas simples para 13, 12 e 16 min utilizando a Lipozyme TL IM, e 7, 5 e 8 min utilizando a *Rhizopus* sp. para as mistura interesterificadas OC, SC e OSC, respectivamente. O teor de sólidos também diminuiu após a interesterificação, onde todas as amostras interesterificadas OC (3,2 e 2,2%), OSC (2,5 e 1,6%) e SC (3,6 e 2,5%) com *Rhizopus* sp. e Lipozyme TL IM, respectivamente, apresentaram diferença significativa em relação às suas misturas simples OC (10,0%), OSC (9,9%) e SC (5,9%). As misturas interesterificadas OC não apresentaram diferença entre as lipases, porém houve diferença nas amostras interesterificadas OSC e SC, onde a Lipozyme TL IM apresentou maiores modificações.

O azeite de oliva e o óleo de soja são líquidos na temperatura analisada (15°C) ocasionando a diluição da rede cristalina da gordura do crumbe nas misturas simples, diminuindo a interação cristalina e, por consequência, a consistência, sendo mais intenso após a reação de interesterificação, quando avaliado visualmente durante o experimento. Entretanto, essa consistência também pode ser explicada pelo elevado ponto de fusão do óleo de crumbe totalmente hidrogenado, provocado pela presença de TAGs trissaturados, o qual foi responsável pela nucleação e cristalização do lipídio, pois a presença de cadeias longas e saturadas concorre para o aumento do ponto de fusão da gordura devido à maior interação das moléculas e ao empacotamento da cadeia (SZYDŁOWSKA-CZERNIAK *et al.*, 2005). Após a

reação de interesterificação, as misturas apresentaram aumento no tempo de indução, ou seja, ficaram mais líquidas, precisando de mais tempo para a formação de um núcleo estável de tamanho crítico; e diminuição na porcentagem de sólido de todas as misturas, principalmente pela lipase Lipozyme TL IM, em função do rearranjo dos ácidos graxos nos TAGs, especialmente pela redução do conteúdo de TAG di e trissaturados (saturado-saturado-insaturado; saturado-saturado-saturado), como mostra a Figura 3.

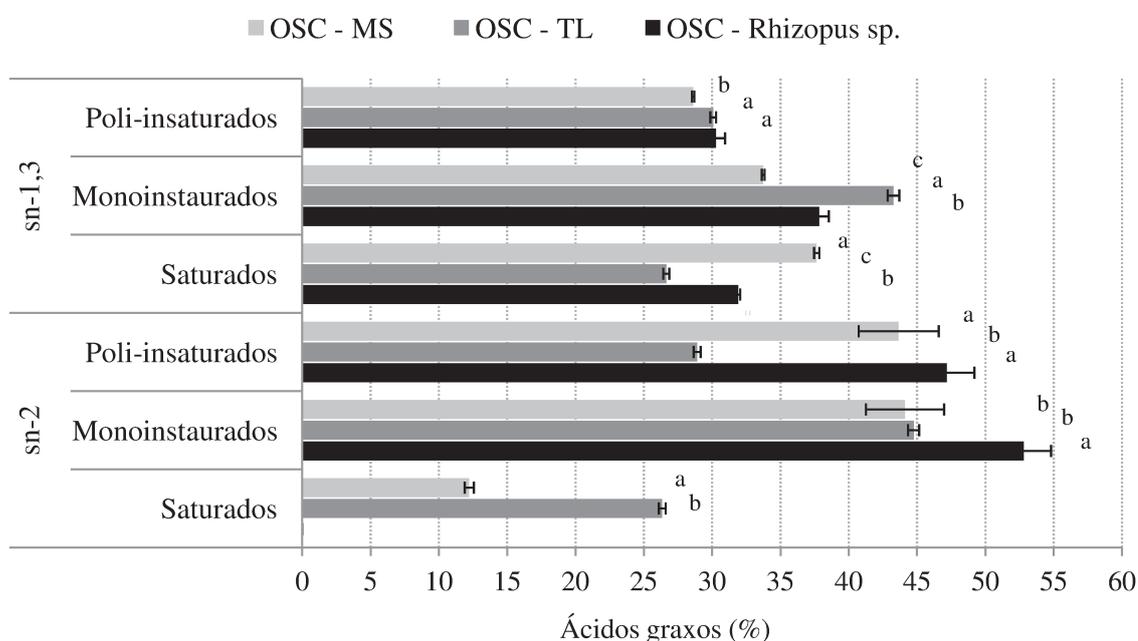


**Figura 3.** Isoterma de cristalização a 15,0 °C de misturas simples e interesterificadas de OSC (Oliva, Soja e Crambe), OC (Oliva e Crambe) e SC (Soja e Crambe).

De forma geral, observa-se que o desempenho da lipase bruta de *Rhizopus* sp. foi inferior quando comparada com a comercial Lipozyme TL IM, devido possuir menor atividade em relação a proporção utilizada de 5% (m/m) em relação ao peso final do substrato, o que provocou menores mudanças físico químicas das amostras, levando a uma reação de interesterificação incompleta no período de 24h, como pode ser bem observado nos resultados de DSC e RMN. Fato que pode ser explicado por se tratar de uma mistura semipurificada diferente da lipase Lipozyme TL IM.

Com os resultados obtidos sabe-se que as duas enzimas modificaram as misturas simples e que estas apresentaram mudanças físicas e químicas de acordo com o seu perfil

lipídico. Portanto para aprimorar a caracterização e dar sequência a este projeto, foi necessário fazer duas escolhas, onde a primeira foi à matéria-prima e a segunda a lipase a ser utilizada. Para a matéria-prima, escolheu-se a combinação de azeite de oliva, óleo de soja e crambe totalmente hidrogenado, por conter um perfil de ácidos graxos equilibrado entre saturados (Ac. Behênico), monoinsaturados e poli-insaturados. Já para a produção do lipídio estruturado, fez-se a seleção da lipase de acordo com a determinação posicional dos ácidos graxos na molécula do glicerol através da técnica de ressonância nuclear magnética  $^{13}\text{C}$ . Este método permite determinar a composição em grupos de ácidos graxos saturados e dos ácidos oléico (monoinsaturado) e linoléico/linolênico (poli-insaturados) nas posições *sn*-1,3 e *sn*-2 dos triacilgliceróis, conforme a Figura 4.



**Figura 4.** Distribuição regioespecífica das diferentes classes de ácidos graxos (%) das misturas simples e interesterificadas, pelas enzimas Lipozyme TL IM (TL) e *Rhizopus sp.*, de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC). As letras minúsculas diferentes no gráfico indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

De acordo com Da Silva *et al.* (2011), o óleo de soja analisado por RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou ser rico em ácidos graxos poli-insaturados, contendo 23,6% de ácido oleico e 73,7% de ácido linoléico mais ácido linolênico na posição *sn*-2. Entretanto, foi praticamente isento de ácidos graxos saturados nesta posição, uma característica típica de óleos vegetais. Nas posições *sn*-1,3, o óleo de soja apresentou 24,8% de ácidos graxos saturados, principalmente palmítico e

esteárico; 25,1% de ácido oleico e 50,1% de ácido linoléico + linolênico. Já para o azeite de oliva, Vlahov (2005) também determinou os grupos posicionais por RMN  $^{13}\text{C}$  e encontrou para o azeite de oliva com médio teor de ácido oléico, 84,5% de ácidos monoinsaturados e 15,5% de linoléico na posição *sn-2*; e na posição *sn-1,3* encontrou 28,4% de saturados, principalmente ácido palmítico; 66,8% de monoinsaturados e 4,8% de ácido linoléico. Levando em consideração que a mistura simples possui TAGs originais de cada óleo e as misturas interesterificadas apresentam TAGs diferentes, não pelo tipo de ácidos graxos, pois estes se mantêm inalterados, mas sim pela modificação destes nas posições do glicerol pela lipase. Observa-se que os óleos de soja e oliva praticamente não apresentaram ácidos graxos saturados na posição *sn-2*, indicando que os presentes na mistura simples foram provenientes do óleo de crambe totalmente hidrogenado, assim como o aumento na posição *sn-1,3*. Verifica-se também que a proporção de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados foi proporcional a quantidade de óleos adicionados na mistura simples (45:45:10% m/m). Resultados semelhantes foram apresentados por Ambiel (2013) e Guedes (2011).

Em relação à mistura OSC, o conteúdo de ácidos graxos saturados na mistura simples foi maior na posição *sn-1,3* do que na *sn-2*, enquanto que a porcentagem de mono e poli-insaturados foram maiores na posição *sn-2*. Após a interesterificação das misturas simples houve diferença dos grupos nas posições de acordo com a lipase utilizada. O conteúdo de ácidos graxos saturados nas posições *sn-2* foi de 26,3% para Lipozyme TL IM e 0% para a *Rhizopus* sp, comparado com 12,2% da mistura simples. Já na posição *sn-1,3* foi de 26,6% para Lipozyme TL IM e 31,9% para a *Rhizopus* sp., comparado com 37,7% da mistura simples, mostrando que a Lipozyme TL IM atuou de forma não específica ao randomizar o grupo ácidos graxos saturados nas duas posições do TAG, enquanto a *Rhizopus* concentrou os ácidos graxos saturados apenas na posição *sn-1,3*, indicando que o ácido behênico foi preferencialmente incorporado nas posições *sn-1,3* pela *Rhizopus* sp. e nas três posições pela Lipozyme TL IM. Para os ácidos graxos monoinsaturados, não houve diferença significativa na posição *sn-2* da mistura interesterificada por Lipozyme TL IM quando comparada a mistura simples, porém houve um aumento de 9,6% na posição *sn-1,3*. Já a *Rhizopus* sp aumentou os ácidos monoinsaturados tanto na posição *sn-2* (8,7%) como na *sn-1,3* (4,1%). Em relação ao grupo dos ácidos poli-insaturados, a Lipozyme TL IM reduziu 14,8% na posição *sn-2*, enquanto a *Rhizopus* não modificou este grupo nesta posição, não havendo diferença significativa quanto a matriz. Na posição *sn-1,3* não houve diferença significativa

na atuação entre as lipases, entretanto aumentaram aproximadamente 1,5% os ácidos poli-insaturados nesta posição.

Segundo Macrae e Hammond (1985), as enzimas podem mostrar especificidade pelo tipo de ácido graxo ou pela posição ocupada na molécula do glicerol. As lipases ácido graxo específicas catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG. Já as regioespecíficas, possuem a capacidade de selecionar a posição da ligação éster numa molécula e são classificadas em dois grupos: Lipases não específicas, catalisam a hidrólise de TAG para ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório, não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que este está esterificado no glicerol; e Lipases 1,3 específicas, que catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 dos acilgliceróis. Perante isso, nota-se que neste estudo a lipase de Lipozyme TL IM atuou de modo aleatório nas três posições (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) tentando randomizar as quantidades dos 3 grupos, perdendo sua especificidade nas condições testadas neste trabalho. No entanto, a lipase de *Rhizopus* sp. apresentou especificidade na posição *sn*-1,3, pois atuou especificamente nesta posição, porém mais nos TAGs provindos do óleo de soja e do azeite de oliva, do que nos de óleo de crambe totalmente hidrogenado, produzindo mais monoacilgliceróis contendo ácidos graxos insaturados e nenhum saturado na posição *sn*-2, indicando baixa especificidade desta enzima para esta posição; à medida que na posição *sn*-1,3 realocou os ácidos graxos, deixando-os proporcional aos grupos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. A ausência de ácidos graxos saturados na posição *sn*-2, pode ser explicada pela instabilidade química das moléculas 1,2(2,3) diacilglicerol e 2 monoacilglicerol, durante a atuação da lipase *sn*-1,3, que provocou a isomerização espontânea, ocorrendo hidrólise de acordo com Macrae e Hammond (1985).

A não especificidade da lipase Lipozyme TL IM pode ter sido provocada pela migração acil da posição *sn*-2 para as posições *sn*-1 ou *sn*-3, ou o oposto, ocorrendo do mesmo modo e até que o equilíbrio dinâmico fosse alcançado. A razão para esta migração é a existência de acilgliceróis parciais, especialmente diacilgliceróis, que são intermediários necessários e inevitáveis. De acordo com Mu, Xu e Høy (1998) a migração acil é um sério problema na interesterificação catalisada por lipases e ocorre principalmente em reatores descontínuos, o que resulta em menor pureza dos lipídios estruturados específicos, mesmo que a lipase seja *sn*-1,3 específica. A alta relação entre o substrato e a enzima exige longo tempo para a reação alcançar o equilíbrio, o que resulta conseqüentemente em migração acil. Gamboa e Gioielli (2006) e Cao *et al.* (2013) também verificaram que a ocorrência da migração acil em processos descontínuos pode ter promovido a randomização da

interesterificação enzimática, mesmo utilizando lipases regioespecíficas na produção de lipídios estruturados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Speranza (2014), observando que a lipase de *Rhizopus* sp., também produzida por fermentação sólida, foi específica na posição *sn*-1,3, tanto para LE a base de óleo de patauá e estearina de palma, como para o LE a base de óleo de murumuru e buriti. Quanto à lipase Lipozyme TL IM também não foi observado especificidade, atuando de forma aleatória nas misturas. Da Silva *et al.* (2011) verificaram a regioespecificade da Lipozyme TL IM em lipídios estruturados formulados por mistura de banha de porco e óleo de soja; e também perceberam que houve uma distribuição aleatória dos ácidos graxos independente do tipo para a proporção 80:20, respectivamente.

Analisando de forma funcional os LEs obtidos por Lipozyme TL IM e *Rhizopus* sp., verifica-se que a lipase de *Rhizopus* sp. atuou conforme esperado e de acordo com a literatura, tendo inserido o ácido behênico nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e os ácidos insaturados na posição *sn*-2. Por outro lado, a lipase Lipozyme TL IM atuou posicionando o ácido behênico e os ácidos graxos insaturados na mesma proporção nas três posições do TAG. O que também é interessante, pois a inibição da lipase é parcial e não total, ou seja, uma parte do lipídio será absorvida e outra parte não, e de qualquer forma a Lipozyme TL IM adicionou ácido behênico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e insaturados na posição *sn*-2. Além disso, o ácido behênico na posição *sn*-2, pode aumentar a capacidade de inibição, uma vez que a não absorção do monoacilglicerol impede a absorção de outros ácidos graxos, pela não formação dos quilomícrons (BERRY, 2009). Assim, podemos notar que os dois LEs possuem capacidade tanto de inibição da lipase pancreática, como para a absorção dos lipídios insaturados. Entretanto, para a continuação do estudo, a lipase escolhida foi a Lipozyme TL IM por questões de segurança, por ser considerada GRAS e por já ser um produto comercial, produzido pela empresa Novozymes na forma imobilizada. Então, descartou-se a lipase de *Rhizopus* sp, pois a produção no laboratório é de pequena escala e principalmente por ser uma enzima bruta o qual poderia apresentar toxicidade aos animais nos testes *in vivo*.

Com as modificações causada pela interesterificação catalisada pela Lipozyme TL IM, no comportamento da mistura simples de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado foi analisada feita a composição de triacilgliceróis para saber quais classes foram formadas baseadas no número de carbono. Os TAGs que representam as misturas foram obtidos com a ajuda do programa PrOleos, por isso os TAGs da mistura interesterificada são possibilidades baseadas na maior porcentagem dos possíveis TAGs que poderiam ser formados, uma vez que a enzima Lipozyme TL IM trabalhou de maneira

aleatória como foi observado nos resultados de especificidade por RMN  $^{13}\text{C}$ . A Tabela 4 mostra a composição em triacilgliceróis das misturas simples e interesterificadas de oliva, soja e crambe, variando de 50 a 66 átomos de carbono.

**Tabela 4.** Composição em triacilgliceróis (TG% m/m) individuais e quanto ao número de carbono (NC) das matérias-primas e das misturas antes e após a interesterificação de oliva, soja e crambe (OSC) catalisada pela lipase Lipozyme TL IM (TL).

Grupos (NC)	TAG*	Mistura simples - OSC		Mistura Interesterificada – OSC – TL	
		Individual (%)	Total (%)	Individual (%)	Total (%)
50	POP	3,5	6,2	2,6	4,7
	PLP	2,6		2,1	
52	POS	0,4	35,6	2,0	28,4
	POO	16,7		10,4	
	PLO	9,9		11,5	
	PLL	7,3		4,5	
	PLnL	1,3		0,0	
	SSS	1,0		0,0	
54	PPBe	0,0	52,6	0,5	52,1
	SOS	0,0		2,9	
	SOO	0,0		8,6	
	OOO	19,3		5,1	
	OLO	11,3		18,1	
	OLL	8,9		12,2	
	LLL	9,2		4,9	
	LLnL	2,4		0	
	LLnLn	0,47		0	
	56	POBe		0,0	
PLBe		0,0	1,6		
OLA		0,0	0,5		
58	SOBe	0,0	0,6	0,8	9,2
	OOBe	0,0		3,6	
	SSBe	0,6		0,0	
	OLBe	0,0		3,6	
	LLBe	0,0		1,3	
62	<b>SBeBe</b>	1,0	1,0	0,0	0,0
66	<b>BeBeBe</b>	4,0	4,0	0,0	0,0

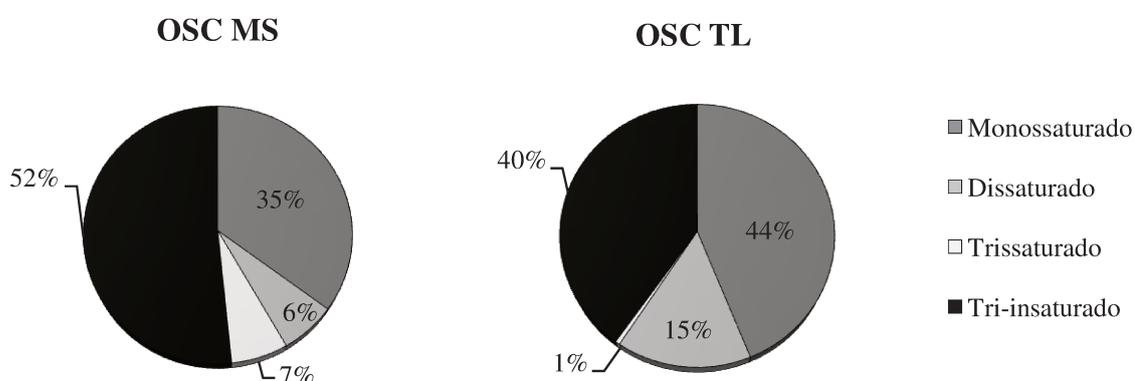
\*Para os TAGS, onde: P – palmítico (C16:0); S – esteárico (C18:0); O – Oléico (C18:1); L – Linoléico (C18:2); Ln – Linolênico (C18:3); A – Araquídico (C20:0); Be – Behênico (C22:0)

A mistura simples apresentou 49,74% de triacilgliceróis com 54 átomos de carbono e 35,61% com 52 átomos de carbono, indicando que esta fração apresentou predominância de triacilgliceróis di-insaturados e tri-insaturados, compostos em grande parte por ácido oléico e linoléico, de acordo com a Figura 5. A interesterificação da mistura OSC formou novos

compostos com a desintegração de outros, como o desaparecimento dos grupos 62 e 66; diminuição dos grupos 50 e 52; e aumento dos grupos 56 e 58. Essa nova formação se deu pela redistribuição dos ácidos graxos, principalmente pelo ácido behênico e esteárico que compõe o óleo de crambe totalmente hidrogenado. Assim, nota-se que houve aumento nos TAGs monossaturados formados com ácido behênico e diminuição dos Tri e di-insaturados.

A formação dos novos TAGs monossaturados deve-se pela dissociação dos TAGs tri e dissaturados e sua redistribuição com outros ácidos graxos, principalmente o oléico provindo do azeite de oliva e o linoléico do óleo de soja. Isso explica os eventos de cristalização por DSC, pois o desaparecimento do primeiro pico da mistura simples após a interesterificação coincide com o desaparecimento dos TAGs 62 e 66; e o aumento da extensão do primeiro novo pico se dá pelo aumento dos grupos 58 e 56 e o segundo novo pico continua com o grupo 54, o qual sofreu pequenas modificações. Esses resultados também justificam as mudanças nas características físico-químicas tais como o baixo ponto de fusão, baixo teor de sólidos e o surgimento de uma consistência semissólida à temperatura ambiente observada a olho nu no laboratório durante as análises, bem diferente da mistura simples, e de suas matérias-primas individuais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Guedes (2011), onde os ácidos graxos ficaram distribuídos predominantemente em TAG 52, 54, 56 e 58, em todas as misturas interesterificadas quimicamente com óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado. Além dos grupos 56 e 58 apresentarem aumento em seu conteúdo após a interesterificação como consequência da randomização dos TAG, com a inserção de ácido behênico nesses grupos.



**Figura 5.** Distribuição de classes de TAGs das misturas simples (MS) e interesterificada com Lipozyme TL IM, de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC).

Para explicar as diferenças nas características macroscópicas da rede microestrutural da mistura OSC antes e depois da interesterificação fez-se a análise de microscopia sob luz polarizada, com o objetivo de verificar diferentes tipos de cristais e as mudanças morfológicas que ocorrem durante o crescimento dos mesmos (ROUSSEAU, HILL e MARANGONI, 1996). A Tabela 5 mostra os resultados referente à variação no diâmetro médio e ao número de cristais presentes na mistura OSC antes e após a interesterificação por microscopia sob luz polarizada.

**Tabela 5.** Diâmetro e área dos cristais das misturas antes e depois da interesterificação, por cristalização rápida a 15 °C.

Mistura	Contagem total	Área $\pm$ DP (%)	DMC* $\pm$ DP ( $\mu\text{m}$ )	FVDMC** $\pm$ DP ( $\mu\text{m}$ )
Simples	2561	0,010 $\pm$ 0,004	0,069 $\pm$ 0,014	0,003 - 0,634
Interesterificada	170	0,018 $\pm$ 0,002	0,337 $\pm$ 0,456	0,003 - 0,861

Os dados estão apresentados com Médias  $\pm$  Desvio padrão

DMC\* - Diâmetro Médio dos Cristais

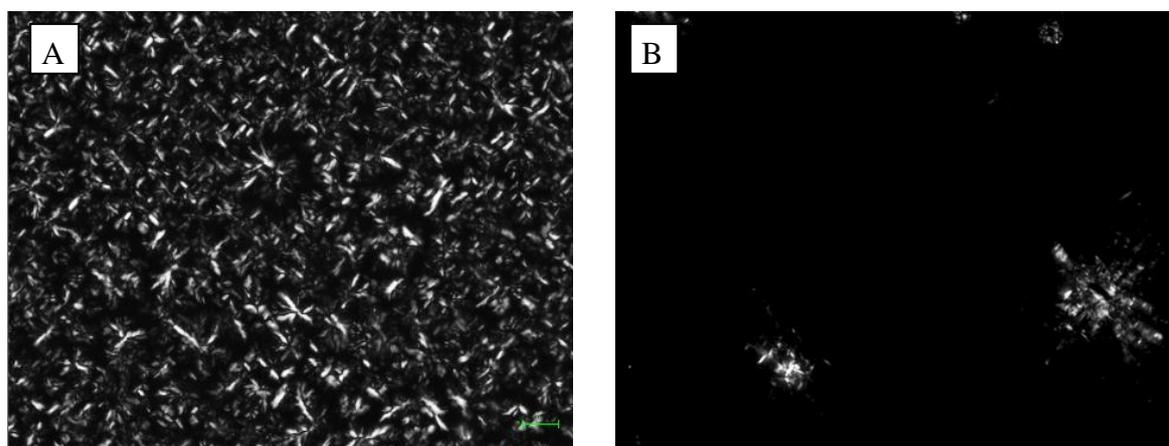
FVDMC\*\* - Faixa de variação dos diâmetros médios dos cristais

As amostras de OSC apresentaram diferenças na forma cristalina, no tamanho e no número dos cristais em função da diluição da gordura do óleo de crambe totalmente hidrogenado no azeite de oliva e no óleo de soja, e da interesterificação. Contudo, os cristais da mistura simples já apresentaram diferença das matrizes, devido à diminuição das barreiras físicas que impedem o crescimento dos cristais, principalmente pela presença de maior quantidade de matriz líquida composta pelo óleo de soja e pelo azeite de oliva (RODRIGUES-RACT *et al.*, 2010). Esta modificação aumenta após a reação de interesterificação, devido ocasionar a diminuição do número dos cristais, com correspondente aumento de diâmetro, por meio da redistribuição do ácido behênico do óleo de crambe totalmente hidrogenado com outros ácidos, principalmente oléico e linoléico, dos óleos de oliva e soja, respectivamente, como podem ser visto na Figura 5. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com lipídios estruturados obtidos a partir de banha de porco com óleo de soja (SILVA, ESCOBEDO e GIOIELLI, 2008); gordura do leite e óleo de girassol (RODRIGUES-RACT *et al.*, 2010); e óleo de soja com óleo de crambe totalmente hidrogenado (GUEDES, 2011). Assim, a interesterificação enzimática utilizando a lipase Lipozyme TL IM alterou a característica da rede cristalina quando comparada com os padrões da cristalização antes da reação.

A diferença na estrutura dos cristais também foi consequência da temperatura de análise e da temperatura de fusão da amostra. A formação de cristais menores e em maior número na mistura simples a temperatura de 15 °C se deve à temperatura de cristalização ser

distante do ponto de fusão da amostra, uma vez que na análise do perfil térmico a cristalização começa a 33,80°C. Já a mistura interesterificada apresentou a formação de cristais maiores e em menor quantidade, devido ao pequeno conteúdo de gordura sólida e de estar próximo a sua temperatura inicial de cristalização, que foi de 17,39°C. Deste modo, uma temperatura intermediária de cristalização auxilia na formação de cristais maiores, em menor número e com formas distintas (SILVA, ESCOBEDO e GIOIELLI, 2008).

A Figura 6 apresenta a estrutura cristalina das amostras, por cristalização lenta a temperatura de 15°C. As misturas simples e interesterificada apresentaram cristalizações diferentes, indicando mudança no tipo de cristais presentes a 15°C após a reação de interesterificação. Os esferulitos observados na mistura simples foram caracterizados por cristais com núcleo compacto, cercado de agulhas longas e finas distribuídas radialmente. Por outro lado, os esferulitos observados nos lipídios estruturados foram caracterizados por pequenos núcleos cercados de cristais orientados aleatoriamente (BERGER, JEWELL e POLLITT, 1979).



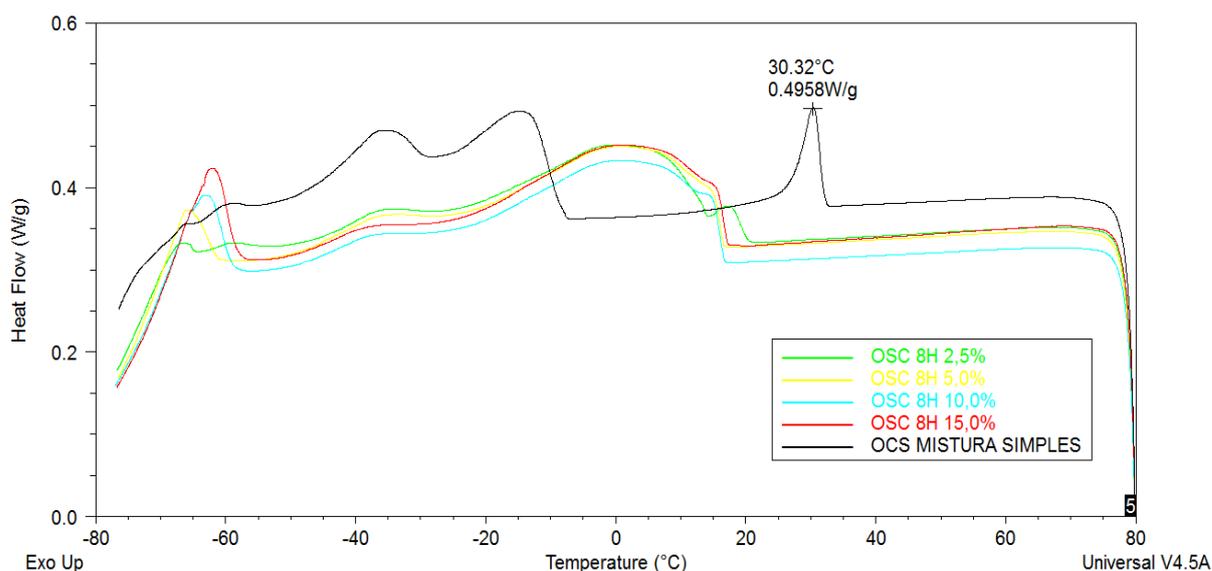
**Figura 6.** Imagens de cristalização digitalizadas das misturas simples (A) e interesterificada (B) de oliva, soja e crambe por resfriamento lento a 15°C/24h, com aumento de 40X.

### 3.2. Estudo de cinética de reação por DSC

Com a caracterização do LE concluída, fez-se uma cinética de produção (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 24 horas) catalisada pela Lipozyme TL IM em diferentes proporções (2,5, 5, 10 e 15% em relação ao peso total do substrato). A reação foi avaliada por meio da análise de DSC para otimização da reação. No Anexo 1, pode-se observar os resultados dos eventos de

cristalização das misturas simples e interesterificada de oliva, soja e crambe totalmente hidrogenado.

Pode-se notar que a mistura simples apresenta dois picos distantes um do outro, pois o primeiro começa com 33,8°C e termina com 22,4°C; e o segundo se forma só a -7,3°C e vai até -54,4°C. Após a reação de interesterificação, inicialmente os picos são distribuídos em 3 e com o passar do tempo ou com o aumento da quantidade de enzima, este número volta para 2 picos novamente, porém com características diferentes. O primeiro pico começa a estabilizar em 17°C e terminar com -48°C aproximadamente; e o segundo pico com -60 até -68°C aproximadamente; e a energia gasta para cristalização aumenta no primeiro pico e a diminui no segundo. Isto fica claro a partir de oito horas de reação com 5% de enzima, repetindo os resultados até 24 horas de reação de interesterificação. Dessa forma se escolheu produzir o LE com oito horas de reação utilizando 5% de enzima imobilizada Lipozyme TL IM, pois foi o menor tempo com a menor quantidade de enzima utilizada que foi capaz de hidrolisar os TAGs tri e dissaturados e redistribuí-los para obter os mesmos resultados, conforme a Figura 7. De acordo com De Martini Soares *et al.* (2013), o longo tempo de reação de interesterificação não são adequados, uma vez que observaram aumento considerável do teor de ácidos graxos livres nas misturas interesterificadas, sem quaisquer alterações nos valores de SFC, além da diminuição progressiva da atividade de lipase na reação de interesterificação ao longo da operação e migração acil que pode afetar na especificidade da enzima.



**Figura 7.** Termograma da mistura OSC interesterifica com diferentes quantidades de enzima e 8h de reação.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível obter por interesterificação enzimática mais de um lipídio estruturado a base de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado com características físicas e químicas diferentes da mistura original, que contivesse tanto ácido behênico, como ácidos mono e poli-insaturados no triacilglicerol. A adição do azeite de oliva e do óleo de soja promoveu a diluição dos ácidos graxos saturados de cadeia longa do óleo de crambe totalmente hidrogenado. A reação de interesterificação proporcionou à mistura dos óleos uma menor cristalização à temperatura ambiente e conseqüentemente um menor ponto de fusão, pela redistribuição do ácido behênico nos TAGs. Essa distribuição foi modificada conforme a especificidade da lipase utilizada, uma vez que a lipase de *Rhizopus* sp. apresentou especificidade por ácidos graxos insaturados e especificidade na posição *sn*-1,3 dos TAGs da mistura simples, enquanto que a Lipozyme TL IM atuou de forma aleatória. No entanto, as duas enzimas foram bem sucedidas ao adicionar o ácido behênico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e os ácidos graxos insaturados na posição *sn*-2. Porém, devido a lipase de *Rhizopus* sp ser uma enzima bruta, optou-se por trabalhar com a lipase comercial Lipozyme TL IM na produção dos LEs. O melhor tempo e a melhor proporção de enzima foi com 8h e utilizando 5% da lipase, respectivamente, para a produção do LE.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBIEL, H. C. I. **Desenvolvimento de hardfat à base de óleo de algodão e óleo de crambe totalmente hidrogenado pra aplicação em spread de chocolate**. 2013. 84 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

ANTONIOSI FILHO, N. R.; MENDES, O. L.; LANÇAS, F. M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, v. 40, n. 9, p. 557-562, 1995. ISSN 1612-1112. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02290268> >. Acesso em: 10/04/2014.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Society, 2009.

ARISHIMA, T.; TACHIBANA, N.; KOJIMA, M.; TAKAMATSU, K.; IMAIZUMI, K. Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. **Journal of Food Lipids**, v. 16, n. 1, p. 72-88, 2009. ISSN 1745-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01133.x> >. Acesso em: 06/05/2015.

ARISHIMA, T.; TSUJII, S.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; SAGI, N.; IMAIZUMI, K.; OKUDA, H. Suppressive effect of 1-behenoyl-2,3-dioleoyl-rac-glycerol (BOO) on postprandial serum triacylglycerol elevation. **Japanese Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 1069 - 1075, 2007. ISSN 03863603. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-36849074143&partnerID=40&md5=59280e10d88cb151252ceaf034284cc0> >. Acesso em: 06/05/2015.

BERGER, K. G.; JEWELL, G. G.; POLLITT, R. J. M. **Em Food microscopy; Vaughan, JG, ed:** Academic Press: London 1979.

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 01, p. 3-17, 2009. ISSN 1475-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0954422409369267> >. Acesso em: 12/05/2015.

CAO, Y.; QI, S.; ZHANG, Y.; WANG, X.; YANG, B.; WANG, Y. Synthesis of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification of triacetin with camellia oil methyl esters and preliminary evaluation of their plasma lipid-lowering effect in mice. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3733-44, 2013. ISSN 1420-3049.

CODEX. **Codex Standard for olive oils and olive pomace oils - CODEX STAN 33, 1981.** Codex Alimentarius - FAO/WHO 2003.

\_\_\_\_\_. **Codex Standards for named vegetable oils - CODEX STAN 210, 1999.** FAO/WHO, C. A.-. 2005.

COSTA, V. D. S. R. D. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de lipase de uma nova linhagem de Rhizopus Sp.** 1997. 78 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 345-354, 2002. ISSN 1516-9332. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322002000300010&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000300010&nrm=iso) >.

DA SILVA, R. C.; SOARES, F. A. S. D. M.; FERNANDES, T. G.; CASTELLS, A. L. D.; DA SILVA, K. C. G.; GONÇALVES, M. I. A.; MING, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; GIOIELLI, L. A. Interesterification of Lard and Soybean Oil Blends Catalyzed by Immobilized Lipase in a Continuous Packed Bed Reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 12, p. 1925-1933, 2011. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-011-1869-x> >.

DE MARTINI SOARES, F. A. S.; OSORIO, N. M.; DA SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA-DIAS, S. Batch and continuous lipase-catalyzed interesterification of blends containing olive oil for trans-free margarines. **European journal of lipid science and technology**, v. 115, n. 4, p. 413-428, 2013. ISSN 1438-9312.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, 2000.

FARMANI, J.; SAFARI, M.; HAMEDI, M. Application of palm olein in the production of zero-trans Iranian vanaspati through enzymatic interesterification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 8, p. 636-643, 2006. ISSN 1438-9312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200600025> >.

GAMBOA, O. W. D.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 646, 2006. ISSN 0100-4042.

GUEDES, A. M. M. **Gordura plástica obtida a partir de óleo de soja e óleo de Crambe abyssinica (Hochst)** 2011. 125 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

GUEDES, A. M. M.; MING, C. C.; RIBEIRO, A. P. B.; DA SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Physicochemical Properties of Interesterified Blends of Fully Hydrogenated Crambe abyssinica Oil and Soybean Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 111-123, 2014. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2360-7> >. Acesso em: 05/04/2016.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Pract**, v. 22, n. 6, p. 475-6 passim, Jul 1973. ISSN 0023-6853 (Print) 0023-6853.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 129-140, 10/4/ 2000. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S13811177000120X> >. Acesso em: 05/04/2016.

KANJILAL, S.; PRASAD, R. B.; KAIMAL, T. N.; GHAFLOORUNISSA; RAO, S. H. **Synthesis and estimation of calorific value of a structured lipid-potential reduced calorie fat.** 1999. 1045-55 ISBN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.biomedsearch.com/nih/Synthesis-estimation-calorific-value-structured/10580332.html> >.

KOJIMA, M.; ARISHIMA, T.; SHIMIZU, R.; KOHNO, M.; KIDA, H.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. The consumption of a structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids increases fecal fat excretion in humans. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 12, p. 997-1001, 2013. ISSN 13458957. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84888633646&partnerID=40&md5=0aae616c88e0277b0179a5effda6be37> >. Acesso em: 10/04/2014.

KOJIMA, M.; TACHIBANA, N.; YAMAHIRA, T.; SEINO, S.; IZUMISAWA, A.; SAGI, N.; ARISHIMA, T.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. Structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids suppresses triacylglycerol absorption and prevents obesity in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 1, p. 77, 2010.

ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.lipidworld.com/content/9/1/77> >. Acesso em: 10/04/2014.

MACEDO, G. A.; PARK, Y. K.; PASTORE, G. M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 2, p. 90-95, 1997. ISSN 0001-3714.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 687-693, 2/25/ 2004. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203001535> >. Acesso em: 02/03/2013.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193-218, 1985. ISSN 0264-8725.

MARANGONI, A. G.; MCGAULEY, S. E. Relationship between Crystallization Behavior and Structure in Cocoa Butter. **Crystal Growth & Design**, v. 3, n. 1, p. 95-108, 2003/01/01 2003. ISSN 1528-7483. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cg025580l> >. Acesso em: 04/03/2016.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 48-67, 2008/10/27 2008. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701764245> >. Acesso em: 05/08/2014.

MU, H.; XU, X.; HØY, C.-E. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 9, p. 1187-1193, 1998. ISSN 0003-021X.

NO, D. S.; ZHAO, T.; KIM, B. H.; CHOI, H.-D.; KIM, I.-H. Enrichment of erucic acid from crambe oil in a recirculated packed bed reactor via lipase-catalyzed ethanolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, n. 0, p. 6-10, 3// 2013. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111771200269X> >. Acesso em: 18/01/2014.

NUNES, P. A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 265-268, 8/15/ 2012. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X1200174X> >.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 110-120, 2002. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00010.x> >.

PITOL, C. **Tecnologia e produção: crambe** Fundação MS, 2010.

RIBEIRO, A. P. B.; BASSO, R. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; DOS SANTOS, A. O.; CARDOSO, L. P.; GUARALDO GONÇALVES, L. A. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1153-1162, 2009. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909001653> >. Acesso em: 14/09/2015.

RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; DOS SANTOS, A. O.; CARDOSO, L. P.; GONÇALVES, L. A. G. Thermal Behavior, Microstructure, Polymorphism, and Crystallization Properties of Zero Trans Fats from Soybean Oil and Fully Hydrogenated Soybean Oil. **Food Biophysics**, v. 4, n. 2, p. 106-118, 2009. ISSN 1557-1866. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-009-9106-y> >. Acesso em: 14/09/2015.

RODRIGUES-RACT, J. N.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; SILVA, R. C. D.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de girassol. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 258-267, 2010. ISSN 0101-2061. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000100038&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000100038&nrm=iso) >. Acesso em: 10/04/2016.

ROUSSEAU, D.; HILL, A. R.; MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 2. Microstructure and polymorphism. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 8, p. 973-981, 1996. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02523404> >. Acesso em: 14/09/2015.

SALES-CAMPOS, H.; SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; SILVA, J. S. D.; CARDOSO, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013. ISSN 1389-5575. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/234029752\\_An\\_Overview\\_of\\_the\\_Modulatory\\_Effects\\_of\\_Oleic\\_Acid\\_in\\_Health\\_and\\_Disease](https://www.researchgate.net/publication/234029752_An_Overview_of_the_Modulatory_Effects_of_Oleic_Acid_in_Health_and_Disease) >. Acesso em: 15/05/2016.

SILVA, R. C. D.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados por interesterificação química de banha e óleo de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 330-335, 2008. ISSN 0100-4042. Acesso em: 14/09/2015.

SILVA, R. C. D.; GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Química Nova**, v. 32, p. 1253-1261, 2009. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000500032&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000500032&nrm=iso) >. Acesso em: 14/09/2015.

SPERANZA, P. **Production of special lipids by enzymatic interesterification of Amazonian oils and influence on the biological activity**. 2014. 156 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas/SP.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13-20, 1/20/ 2016. ISSN 0168-1656. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165615301966> >. Acesso em: 03/06/2016.

STEIN, J. Chemically defined structured lipids: current status and future directions in gastrointestinal diseases. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 14, n. 2, p. 79-85, 1999. ISSN 1432-1262. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s003840050190> >. Acesso em: 08/02/2016.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; LACH, M.; SZŁYK, E. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry studies of  $\beta'$ → $\beta$  transitions in fat mixtures. **Food chemistry**, v. 92, n. 1, p. 133-141, 2005. ISSN 0308-8146.

TIWARI, N. J.; SAWANT, S. B. Behenic acid esters: kinetics and properties. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 1, p. 30-35, 2005. ISSN 1438-9312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200401031> >. Acesso em: 10/04/2015.

VISTISEN, B.; MU, H.; HØY, C. E. Lymphatic recovery of exogenous oleic acid in rats on long chain or specific structured triacylglycerol diets. **Lipids**, v. 41, n. 9, p. 827-834, 2006. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33751210319&partnerID=40&md5=2e1d72252e72b07af632d4e4bd48eb19> >. Acesso em: 14/09/2015.

VLAHOV, G. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy to check 1,3-random, 2-random pattern of fatty acid distribution in olive oil triacylglycerols. **Spectroscopy**, v. 19, n. 2, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2005/765236> >. Acesso em: 05/05/2015.

WEN CHANG, N.; TEN WU, C.; NA CHEN, F.; CHAO HUANG, P. High polyunsaturated and monounsaturated fatty acid to saturated fatty acid ratio increases plasma very low density lipoprotein lipids and reduces the hepatic hypertriglyceridemic effect of dietary cholesterol in rats. **Nutrition Research**, v. 24, n. 1, p. 73-83, 1// 2004. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531703002057> >. Acesso em: 03/09/2014.

## 6. ANEXO

**Anexo 1.** Eventos de cristalização (DSC) de amostra de mistura simples (MS) e interesterificada (MI) de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC).

Amostra	Tempo (hora)	Enzima (%)	Cristalização	Ti (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)	TMP (°C)	Entalpia (J/g)	AP (W/g)
MS OSC	0	0	Pico 1	33,80	22,44	-11,37	31,20	2,34	0,11
			Pico 2	-7,27	-54,44	-47,17	-14,20	17,34	0,12
			Pico 3	-	-	-	-	-	-
MI OSC	2,5	2,5	Pico 1	35,65	22,64	13,01	33,25	4,03	0,20
			Pico 2	10,28	-64,59	74,87	-13,11	24,90	0,09
			Pico 3	-	-	-	-	-	-
	5,0	5,0	Pico 1	31,74	20,37	11,37	29,01	2,44	0,10
			Pico 2	12,34	-60,55	72,89	-4,565	27,62	0,11
			Pico 3	-62,82	-69,28	6,47	-66,61	1,50	0,04
	10,0	10,0	Pico 1	24,07	14,12	9,95	20,05	1,25	0,05
			Pico 2	14,12	-59,41	73,53	-2,495	30,00	0,12
			Pico 3	-61,26	-68,01	6,75	-65,58	1,59	0,04
15,0	15,0	Pico 1	20,94	-58,91	79,85	-1,09	33,07	0,13	
		Pico 2	-58,91	-67,79	8,88	-63,89	2,67	0,07	
		Pico 3	-	-	-	-	-	-	
MI OSC	2,5	2,5	Pico 1	30,10	20,66	9,45	27,71	2,21	0,12
			Pico 2	12,13	-56,85	68,98	-4,68	26,74	0,10
			Pico 3	-64,10	-69,57	5,47	-67,58	0,59	0,02
	5,0	5,0	Pico 1	21,01	-51,52	72,53	-0,48	28,58	0,13
			Pico 2	-63,32	-68,01	4,69	-66,40	0,40	0,02
			Pico 3	-	-	-	-	-	-
	10,0	10,0	Pico 1	16,96	-59,20	76,16	-0,67	30,45	0,13
			Pico 2	-59,55	-68,22	8,67	-63,70	2,84	0,07
			Pico 3	-	-	-	-	-	-
15,0	15,0	Pico 1	18,24	-53,72	71,96	-0,39	29,01	0,13	
		Pico 2	-58,20	-67,43	9,23	-62,14	4,16	0,11	
		Pico 3	-	-	-	-	-	-	

Onde, Ti – Temperatura inicial; Tf – Temperatura final; TMP - Temperatura Máxima de Pico; AP – Altura do Pico

**Anexo 1.** Eventos de cristalização (DSC) de amostra de mistura simples (MS) e interesterificada (MI) de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC).

(continuação)

Amostra	Tempo (hora)	Enzima (%)	Cristalização	Ti (°C)	Tf (°C)	$\Delta T$ (°C)	TMP* (°C)	Entalpia (J/g)	AP** (W/g)	
MI OSC	8	2,5	Pico 1	21,15	-64,10	85,25	-0,53	28,62	0,12	
			Pico 2	-64,45	-68,08	3,63	-66,73	0,17	0,01	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
		5,0	Pico 1	16,89	-49,68	66,57	0,43	27,27	0,12	
			Pico 2	-60,69	-69,14	8,46	-65,79	2,12	0,06	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
		10,0	Pico 1	17,10	-47,33	64,43	1,10	26,26	0,12	
			Pico 2	-57,71	-68,36	10,66	-62,90	3,80	0,09	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
	15,0	Pico 1	17,46	-47,90	65,36	0,70	26,24	0,12		
		Pico 2	-57,07	-67,72	10,66	-61,88	4,14	0,11		
		Pico 3	-	-	-	-	-	-		
	MI OSC	12	2,5	Pico 1	16,75	-48,97	65,71	0,33	26,95	0,12
				Pico 2	-61,61	-69,43	7,82	-66,35	1,65	0,05
				Pico 3	-	-	-	-	-	-
5,0			Pico 1	17,32	-49,11	66,42	0,71	26,82	0,12	
			Pico 2	-59,41	-68,51	9,10	-65,45	2,25	0,06	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
10,0			Pico 1	19,66	-51,52	71,18	0,08	27,22	0,12	
			Pico 2	-56,93	-68,43	11,51	-62,82	4,48	0,10	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
15,0		Pico 1	17,53	-50,46	67,99	0,12	26,46	0,12		
		Pico 2	-56,85	-68,43	11,58	-62,01	4,88	0,11		
		Pico 3	-	-	-	-	-	-		

Onde, Ti – Temperatura inicial; Tf – Temperatura final; TMP - Temperatura Máxima de Pico; AP – Altura do Pico

**Anexo 1.** Eventos de cristalização (DSC) de amostra de mistura simples (MS) e interesterificada (MI) de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC).

(continuação)

Amostra	Tempo (hora)	Enzima (%)	Cristalização	Início (°C)	Fim (°C)	$\Delta T$ (°C)	TMP* (°C)	Entalpia (J/g)	AP** (W/g)	
MI OSC	16	2,5	Pico 1	13,98	-51,60	65,58	11,82	26,17	0,13	
			Pico 2	-61,90	-69,29	7,39	-66,50	1,27	0,04	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
		5,0	Pico 1	17,53	-50,74	68,27	0,71	27,02	0,12	
			Pico 2	-60,26	-68,15	7,89	-65,49	1,60	0,05	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
		10,0	Pico 1	16,89	-51,03	67,92	0,43	29,39	0,13	
			Pico 2	-57,99	-68,29	10,31	-63,09	3,72	0,09	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
	15,0	Pico 1	16,82	-47,90	64,72	0,77	28,43	0,14		
		Pico 2	-57,35	-67,58	10,23	-61,86	4,32	0,11		
		Pico 3	-	-	-	-	-	-		
	MI OSC	24	2,5	Pico 1	16,75	-49,96	66,71	0,625	27,67	0,13
				Pico 2	-62,18	-67,86	5,68	-65,84	0,70	0,027
				Pico 3	-	-	-	-	-	-
5,0			Pico 1	16,82	-48,47	65,29	0,74	26,86	0,13	
			Pico 2	-59,13	-67,72	8,59	-64,73	1,75	0,05	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
10,0			Pico 1	17,17	-50,245	67,42	0,46	24,97	0,12	
			Pico 2	-57,135	-67,86	10,73	-62,505	3,42	0,09	
			Pico 3	-	-	-	-	-	-	
15,0		Pico 1	17,39	-47,76	65,15	0,825	26,27	0,13		
		Pico 2	-56,85	-67,29	10,44	-61,59	4,317	0,12		
		Pico 3	-	-	-	-	-	-		

Onde, Ti – Temperatura inicial; Tf – Temperatura final; TMP - Temperatura Máxima de Pico; AP – Altura do Pico

### **CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS LIPÍDIOS ESTRUTURADOS DE BAIXO VALOR CALÓRICO NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA.**

Débora K. T. Moreira <sup>a</sup>; Paola S. Santos <sup>b</sup>; Alessandra Gambero <sup>b</sup>; Gabriela A. Macedo <sup>a,c</sup>

a- Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, rua Monteiro Lobato, 80, CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

b- Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade São Francisco, Av. São Francisco de Assis 218, CEP: 12916-900, Bragança Paulista, SP, Brasil.

c- Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, rua Monteiro Lobato 80, CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

Artigo a ser submetido na revista Food Research International

#### **RESUMO**

A obesidade atinge todas as classes sociais, sendo necessário o desenvolvimento de produtos eficazes que auxiliem na perda de peso ou na sua prevenção. Este trabalho teve como propósito estudar os efeitos antiobesidade do lipídio estruturado (LE) obtido por interesterificação enzimática, a base de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado. Foram utilizados 24 camundongos C57Bl/6 distribuídos em 4 grupos experimentais de acordo com a dieta consumida: Dieta Padrão Controle (DPC); Dieta Padrão Lipídeo Estruturado (DPLE), Dieta Hiperlipídica Controle (DHC); Dieta Hiperlipídica Lipídeo Estruturado (DHLE). Os animais que consumiram LE apresentaram um menor ganho de peso, apesar de ingerirem uma quantidade maior de dieta. O menor ganho de peso se refletiu em estoques reduzidos de tecido adiposo e redução do peso do fígado. Verificou-se um aumento significativo de lipídios excretados pelos animais nas fezes, embora nenhum sinal de toxicidade ou a presença de diarreia tenha sido detectado. Os animais que consumiram DHLE apresentaram uma diminuição do colesterol total, aumento da fração HDL-c e dos ácidos araquidônico e docosahexaenóico no fígado, diminuição do LDL-c e não desenvolveram esteatose hepática. Portanto, o presente estudo demonstrou que o LE pode ser um forte aliado no combate ou prevenção da obesidade e consequentemente outras doenças, não apresentando efeitos colaterais.

Palavras chave: lipídios antiobesidade; ácido behênico; experimento *in vivo*

#### **ABSTRACT**

Obesity affects all social classes, making it necessary to develop effective products that aid weight loss or help prevent weight gain. The objective of this work was to study the anti-obesity effects of structured lipid (SL) obtained by enzymatic interesterification, based on olive oil, soy oil and fully hydrogenated crambe oil. Twenty-four C57Bl/6 mice were distributed into 4 experimental groups according to the diet consumed: Control Diet (CD), Structured Lipid Diet (SLD), Hyperlipid Control Diet (HCD), Hyperlipid Structured Lipid Diet (HSLD). The animals that were fed SLs presented a smaller weight gain, despite a larger intake of the diet. The lowest weight gain was reflected in reduced amounts of adipose tissue and lower liver weight. A significant increase in lipids excreted by the animals in the feces was observed, despite there being no sign of toxicity or presence of diarrhea. The animals that

consumed the HSLD presented lower total cholesterol, and increased HDL-c, arachidonic acid and docosahexaenoic acid in the liver, and lower LDL-c. In addition, they did not develop hepatic steatosis. The study therefore showed that SLs could play a major role in combating or preventing obesity and other resultant diseases, without producing side effects.

Keywords: anti-obesity lipids; behenic acid; in vivo experiment.

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões, obesos. No Brasil, a obesidade vem crescendo cada vez mais. No levantamento publicado em 2015 realizado pelo IBGE, o índice era de quase 60%, onde cerca de 82 milhões de pessoas apresentaram o IMC igual ou maior do que 25 (sobrepeso ou obesidade), tendo uma prevalência maior de excesso de peso no sexo feminino (58,2%), que no sexo masculino (55,6%). Os dados anunciados pelo IBGE traduzem a urgência de se pensar em políticas públicas adequadas à prevenção e tratamento do sobrepeso e obesidade (ABESO, 2015; IBGE, 2015).

A Obesidade nada mais é do que o acúmulo de gordura corporal provinda do consumo energético em excesso e baixo gasto calórico associado a um quadro de inflamação de baixo grau crônica e sistêmica. Isto é agravante, pois está associada a vários riscos de doenças, como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, doença cardiovascular, dislipidemia, síndrome da hipoventilação, doenças osteoarticulares e alguns tipos de cânceres, o que possuem efeitos deletérios sobre a qualidade de vida da população (JEBB e PRENTICE, 1997; ECKERSLEY, 2001; BASTOS, ROGERO e ARÊAS, 2009).

Diferentes dietas têm sido propostas para o tratamento da obesidade, desde as de baixo conteúdo energético e equivalente nutricional, até as que propõem restrição de nutrientes, alterando a proporção de proteínas, carboidratos e gorduras (KLEIN *et al.*, 2004). Apesar dos estudos demonstrarem efeitos positivos, o aumento dos níveis de obesidade no mundo indica que estratégias mais eficazes de combate à obesidade precisam ser desenvolvidas. Dessa forma, a utilização de compostos naturais que possuem função de bloqueadores da absorção de gorduras gastrointestinais ajuda a acelerar o processo de emagrecimento ou o não desenvolvimento da obesidade de forma não agressiva, uma vez que são constituídos de lipídios que estão presentes na alimentação.

Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos ácidos graxos relacionados ao comprimento da cadeia, insaturação e distribuição estereoespecífica no metabolismo e saúde,

há crescente interesse em usar óleos e gorduras para a redução do risco de doenças, bem como para a melhoria da saúde. Um tipo de modificação de óleos e gorduras, muito utilizado ultimamente, é o processo de interesterificação enzimática que dá origem aos lipídios estruturados. Estes são normalmente misturas de triacilgliceróis modificadas para apresentar composição particular em ácidos graxos ou triacilgliceróis, a fim de obter alguma propriedade desejável, como o valor calórico reduzido ou o ponto de fusão alterado (KUBOW, 1996; PETRAUSKAITE *et al.*, 1998; BERRY, 2009).

A interesterificação de misturas entre gorduras sólidas e óleos vegetais pode formar produtos com excelentes características tecnológicas e nutricionais. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos antiobesidade de um lipídio estruturado formulado a partir de azeite de oliva, que é um excelente antioxidante, anti-inflamatório e combatente de doenças cardiovasculares (PEREZ-JIMENEZ *et al.*, 2005); óleo de soja, que é rico em ácidos poli-insaturados, que melhoram os índices de HDL-c e diminuem o LDL-c (RUSSO, 2009), além de ser uma matéria-prima de baixo custo no Brasil; e gordura totalmente hidrogenada de óleo de crambe, que contém ácido behênico, um inibidor natural da lipase pancreática (KOJIMA *et al.*, 2010).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

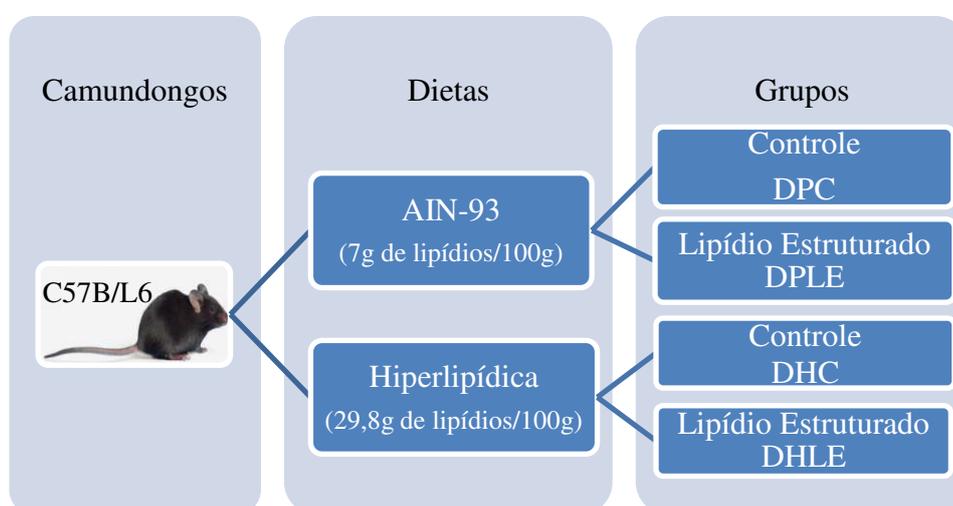
### 2.1. Matéria-prima

Neste experimento, utilizou-se um lipídio estruturado composto por óleo de soja (45% m/m), azeite de oliva extra virgem (45% m/m) e óleo totalmente hidrogenado de crambe (10% m/m), obtido por interesterificação enzimática, por lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada (Lipozyme TL IM) da Novozymes A/S, na proporção de 60 U por grama de substrato total. A reação ocorreu em banho Maria Dubnoff a 60 °C por 8 h a 180 rpm. Após a reação, a lipase foi removida e armazenada em freezer a -20 °C, até ser utilizada. A unidade de atividade (U) de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de ácido graxo em um minuto, por miligrama de enzima a 37 °C.

### 2.2. Ensaio Biológico

Foram utilizados 24 camundongos C57B/16 machos com 5 semanas de idade adquiridos do CEMIB/UNICAMP. Os camundongos passaram por 2 semanas de adaptação e depois foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais contendo 6 animais cada, conforme Figura 1, sendo: Grupo Dieta Padrão Controle (DPC) – camundongos alimentados

com ração AIN-93M; Grupo Dieta Padrão Lipídio Estruturado (DPLE) – camundongos alimentados com dieta AIN-93M modificada pela substituição do óleo de soja pelo lipídio estruturado (7% da dieta ou 16% da caloria total); Grupo Dieta Hiperlipídica Controle (DHC) – camundongos alimentados com dieta hiperlipídica constituída por óleo de soja e banha de porco; e Grupo Dieta Hiperlipídica Lipídio Estruturado (DHLE) – camundongos alimentados com dieta hiperlipídica modificada pela substituição da banha de porco e óleo de soja pelo lipídio estruturado (29,8% da dieta ou 52,7% da caloria total). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade São Francisco (CEUA/USF) de Bragança Paulista – SP – Brasil, sob protocolo número 001.002.2014 (Anexo 1).



**Figura 1.** Ilustração do modelo experimental, onde os animais receberam as dietas padrão controle (DPC), padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).

A composição das dietas pode ser visualizada na Tabela 1. Os animais foram acondicionados em isoletes individuais com ciclos artificiais de 12 horas claro e 12 horas escuro e temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C). Os animais se serviram *ad libitum* de água e ração, foram pesados semanalmente e tiveram a ingestão de ração monitorada durante 8 semanas. A ingestão de alimentos foi monitorada subtraindo o volume consumido do volume provido aos animais.

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais.

Composição	DPC		DPLE	DHC		DHLE
	(g/kg)	(Kcal/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(Kcal/kg)	(g/kg)
Amido de milho	397,5	1590,0	397,5	169,8	679,2	169,8
Caseína	200,0	800,0	200,0	200,0	800	200,0
Sacarose	100,0	400,0	100,0	100,0	400	100,0
Maltodextrina	132,0	528,0	132,0	132,0	528	132,0
Banha de porco	-	-	-	257,7	2319,3	-
Óleo de soja	70,0	630,0	-	40,0	360	-
Lipídio Estruturado	-	-	70,0	-	-	297,7
Celulose	50,0	-	50,0	50,0	-	50,0
Mix de minerais	35,0	-	35,0	35,0	-	35,0
Mix de vitaminas	10,0	-	10,0	10,0	-	10,0
L-Cistina	3,0	-	3,0	3,0	-	3,0
Colina	2,5	-	2,5	2,5	-	2,5
Total	1000	3948	1000	1000	5086,5	1000

Onde: dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE)

### 2.3. Avaliação da calorimetria indireta

Para a avaliação da calorimetria indireta, na última semana do experimento os animais foram condicionados individualmente em gaiolas acopladas ao sistema Oxylet/Physiocage (Panlab, Barcelona/Espanha) com temperatura = 22-23 °C, umidade = 45-55 %, ciclo claro escuro 12/12 horas, fluxo de ar de 0,5 L/min, durante 24 horas de análise, onde O<sub>2</sub> (%) e CO<sub>2</sub> (%) foram medidos a cada 9 minutos. O volume de oxigênio consumido (VO<sub>2</sub>); volume de gás carbônico produzido (VCO<sub>2</sub>); coeficiente respiratório (RQ), que é uma relação entre VCO<sub>2</sub>/ VO<sub>2</sub>, e gasto energético total (EE) foram calculados pelo Software Metabolism (Panlab, Barcelona, Espanha).

### 2.4. Glicemia basal e teste de intolerância a insulina (ITT)

Os animais foram colocados em jejum por 6 horas e a homeostase da glicose foi avaliada pelos níveis basais de glicose sanguínea e pelo teste de tolerância à insulina (ITT) como descrito previamente por Acedo *et al.* (2015). Foi realizada uma pequena incisão na cauda de cada animal para coleta de uma pequena gota de sangue (tempo 0) para determinação da glicemia basal utilizando o aparelho Accutrend Plus (Roche). Uma solução de insulina (1,5 U/kg) foi administrada via intraperitonal e amostras de sangue foram coletadas para determinação de glicose no soro a 0, 5, 10, 20 e 30 minutos. A constante de velocidade da queda da glicose durante o teste de tolerância à insulina (kITT) foi calculada pelo programa GraphPad InStat, obtendo o coeficiente angular da curva e os valores glicêmicos ajustados em um modelo linear (BONORA *et al.*, 1987).

## 2.5. Sacrifício dos animais e coleta de materiais

Após 6 horas de jejum, os animais foram anestesiados com uma mistura 1:1 v/v de cetamina 100 mg/ml e xilasina 2 % no volume de 0,3 µL para cada 100 g de peso corpóreo, visando uma anestesia profunda. Sangue periférico foi coletado por punção cardíaca. Os estoques de tecido adiposo (epididimal, subcutâneo, perirenal e mesentérico), fígado, intestino e o músculo gastrocnêmio foram retirados, pesados e os valores expressos em grama. Biópsias dos tecidos coletados e congelados foram adequadamente armazenadas a -80 °C para posterior utilização.

## 2.6. Avaliação histopatológica do fígado

Fragmentos de fígado foram armazenados em formalina tamponada a 10% até serem analisados, sob-refrigeração. Estes foram desidratados com etanol, diafanizados com xilol e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 2µm foram corados com hematoxilina e eosina. A presença de esteatose hepática foi capturada utilizando microscópio óptico acoplado a sistema de captação de imagens e foi avaliada através da quantificação de esteatose presente em 144 pontos sobrepostos na imagem. A avaliação foi feita de acordo com Turlin *et al.* (2001), usando uma escala de 5 graus: Grau 0 (G0), sem ou esteatose mínima,  $G0 < 5\%$ ; Grau 1 (G1),  $5\% \leq G1 < 25\%$ ; Grau 2 (G2),  $25\% \leq G2 < 50\%$ ; Grau 3 (G3),  $50\% \leq G3 < 75\%$ ; e Grau 4 (G4),  $75\% \leq G4 \leq 100\%$ .

## 2.7. Triglicerídeos e Colesterol total

Foram medidos triglicerídeos e colesterol total do soro e das frações lipídicas do fígado e tecido adiposo epididimal. As frações lipídicas dos tecidos hepático e adiposo epididimal foram extraídas com isopropanol (100 mg/ml), homogeneizadas em turrax e separadas em centrífuga 3000 rpm/10 min. Em seguida, foram determinadas pelos kits fotolorométricos comerciais da marca Laborlab<sup>®</sup> (Triglicérides GOD-PAP Liquid Stable; Colesterol COD-PAP Liquid Stable e HDL Colesterol Direto). As lipoproteínas de baixa densidade (LDL<sub>c</sub>) e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL<sub>c</sub>) foram determinadas de forma indireta conforme Friedewald, Levy e Fredrickson (1972). Foram utilizadas as seguintes equações:

$$VLDL_c = TG/5 \quad \text{Equação (1)}$$

$$LDL_c = \text{Colesterol Total} - HDL_c - VLDL_c \quad \text{Equação (2)}$$

## 2.8. Extração e avaliação dos lipídios totais do tecido hepático e das fezes

As fezes dos animais foram coletadas durante a avaliação da calorimetria indireta, pesadas e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A fração lipídica das fezes e do fígado foi extraída pelo método de Folch, Less & Sloane-Stanley (1957). Nesse método, 100 mg da amostra foram trituradas em ultra turrax com 800  $\mu\text{L}$  de solução salina 0,9% até sua completa homogeneização em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 5 ml de clorofórmio e metanol (2:1) e misturou em vortex por 10 minutos. Acrescentou mais 0,5 ml de NaCl 1M, misturou por mais 30 segundos e centrifugou em 2000 rpm por 10 minutos. A fase inferior foi coletada e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso. Os lipídios totais foram obtidos por análise gravimétrica.

## 2.9. Avaliação do perfil lipídico do fígado e das fezes

As análises de composição em ácidos graxos foram realizadas em cromatógrafo gasoso, após a esterificação realizada segundo Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento da AOCS Ce 1f-96 (2009) em coluna capilar DB-23 Agilent (50% Cyanopropyl-methylpolysiloxane), de dimensões: 60 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 mm de espessura do filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da coluna = 1,0 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura do detector = 280  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura do injetor = 250  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura do forno = 110-215  $^{\circ}\text{C}$  a 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 215  $^{\circ}\text{C}$  por 24 min; gás de arraste – hélio; volume de injeção = 1,0  $\mu\text{L}$ ; injeção split, razão 1:50. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos.

## 2.10. Análise dos Dados

Os dados obtidos foram organizados dentro dos 4 grupos experimentais, apresentando-os na forma de média com seu respectivo desvio-padrão. Foram calculadas análises de variância (ANOVA) para medidas repetidas e teste de *Tukey* com nível de significância em  $p < 0,05$ , para testar a significância das diferenças entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Minitab 16*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O lipídio estruturado foi produzido enzimaticamente utilizando 45% de óleo de soja, 45% de óleo de oliva e 10% de gordura totalmente hidrogenada de crambe (m/m), onde os ácidos graxos saturados (behênico), monoinsaturados (oléico) e poli-insaturados (linoléico e linolênico) foram distribuídos igualmente nas posições *sn-2*, *sn-1* e *sn-3* do glicerol, por meio da interesterificação com a lipase Lipozyme TL IM, com o propósito de diminuir a absorção dos lipídios totais, sem prejudicar a absorção de ácidos graxos insaturados (MUFA e PUFA's). Este trabalho utilizou dois grupos experimentais, o grupo dieta padrão, a fim de esclarecer se o lipídio estruturado obtido mantém o aporte calórico necessário para manter o metabolismo dos animais; e o grupo dieta hiperlipídica, onde a questão é saber se o consumo de LE (29,8% de lipídios estruturados na dieta) é capaz de diminuir a absorção dos lipídios consumidos na dieta, evitando que esses animais engordassem, e se a estrutura do LE provoca aumento na absorção de lipídios insaturados, conseqüentemente melhorando os níveis de colesterol no sangue.

O balanço energético positivo é importante contribuidor para o desenvolvimento da obesidade, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, promovendo aumento nos estoques de energia e peso corporal. A Tabela 2 mostra os resultados de peso corporal final, ganho de peso, consumo de ração, glicose basal e teste de resistência à insulina.

**Tabela 2.** Dados antropométricos, parâmetros bioquímicos e avaliação da calorimetria indireta dos animais que consumiram as dietas padrão e hiperlipídica.

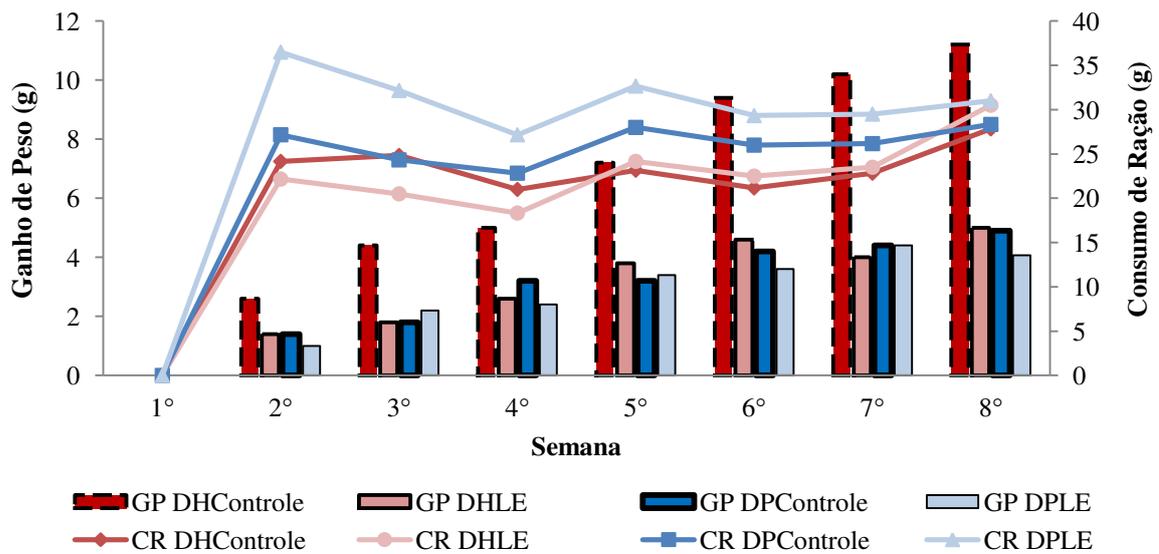
Variáveis	DPC	DPLE	DHC	DHLE
Peso corporal final (g)	29,7±3,1 <sup>ab</sup>	28,2±2,1 <sup>b</sup>	34,8±5,2 <sup>a</sup>	29,7±3,0 <sup>ab</sup>
Ganho de peso (g/semana/animal)	0,7±0,2 <sup>a</sup>	0,6±0,1 <sup>a</sup>	1,6±0,4 <sup>b</sup>	0,7±0,3 <sup>a</sup>
Consumo de ração (g/semana/animal)	26,1±2,0 <sup>a</sup>	31,2±3,2 <sup>b</sup>	23,6±2,4 <sup>a</sup>	23,1±3,8 <sup>a</sup>
Consumo de lipídios (%/semana/animal)	1,8±0,2 <sup>b</sup>	2,2±0,3 <sup>a</sup>	7,0±0,6 <sup>c</sup>	6,9±0,9 <sup>c</sup>
Glicose basal (mg/dL)	175,5±27,0 <sup>a</sup>	165,0±59,1 <sup>a</sup>	176,8±32,5 <sup>a</sup>	145,5±20,3 <sup>a</sup>
ITT (k)	2,1±0,8 <sup>a</sup>	2,6±0,1 <sup>a</sup>	2,1±0,2 <sup>a</sup>	2,8±0,1 <sup>a</sup>
VO <sub>2</sub> (ml/min/kg <sup>0,75</sup> )	27,6±4,9 <sup>a</sup>	28,7±4,0 <sup>a</sup>	29,4±2,8 <sup>a</sup>	29,5±2,9 <sup>a</sup>
Calorimetria Indireta				
VCO <sub>2</sub> (ml/min/kg <sup>0,75</sup> )	26,8±4,9 <sup>a</sup>	27,1±6,1 <sup>a</sup>	24,3±3,2 <sup>a</sup>	24,8±3,1 <sup>a</sup>
EE (kcal/day/kg <sup>0,75</sup> )	199,4±35,3 <sup>a</sup>	205,6±31,8 <sup>a</sup>	204,5±21,1 <sup>a</sup>	206,2±21,5 <sup>a</sup>
RQ	1,0±0,1 <sup>a</sup>	0,9±0,1 <sup>a</sup>	0,8±0,0 <sup>a</sup>	0,8±0,0 <sup>a</sup>

Onde, VO<sub>2</sub> - volume de O<sub>2</sub> consumido; VCO<sub>2</sub> - volume de CO<sub>2</sub> expirado; RQ - quociente respiratório; EE - gasto energético.

Os valores estão expressos em médias seguidas do desvio padrão.

As letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

Em relação ao ganho de peso, os animais que consumiram a Dieta hiperlipídica controle (DHC) apresentaram uma alteração significativa ( $p < 0,05$ ) no peso corpóreo quando comparados aos animais que consumiram as dietas padrão e dieta hiperlipídica constituída pelo lipídio estruturado, os quais mantiveram o mesmo peso. Quanto ao consumo de ração, os animais que receberam a dieta padrão LE se diferenciariam significativamente dos demais animais. Dessa forma, a adição do LE teve efeito tanto na dieta padrão como na dieta hiperlipídica, fazendo com que os animais não engordassem, mesmo consumindo uma quantidade igual ou superior de ração e conseqüentemente de lipídios, do que os demais. Podemos observar na Figura 2 que na oitava semana os animais que consumiram a DHC apresentaram ganho significativo de peso (11,2g), enquanto os que consumiram DHLE (5,0g) apresentaram pesos semelhantes aos animais que receberam a dieta padrão controle (4,9g) e com LE (4,1g).

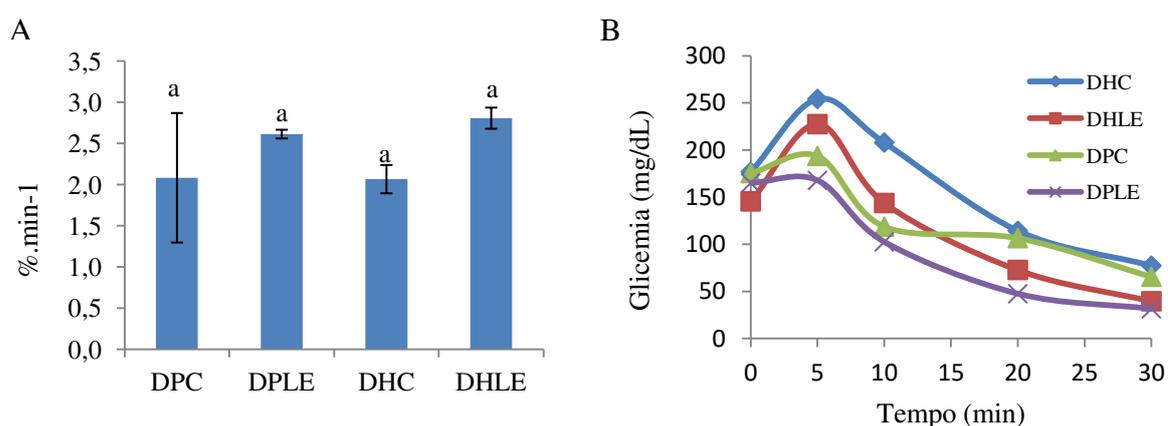


**Figura 2.** Ganho de peso (GP) e Consumo de Ração (CR) durante 8 semanas dos camundongos que consumiram a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).

O LE produzido se mostrou mais eficiente no combate ao aumento de peso do que estudos para diminuir a absorção de lipídios, feitos por Webb *et al.* (1993) que analisaram o caprenin, e Han, Kimura e Okuda (1999) empregando quitina e quitosana, pois verificaram que os animais testes não se diferenciaram no peso corporal, porém ingeriram mais ração quando comparados com os controles que consumiram dieta hiperlipídica. Além disso,

Kanjilal *et al.* (1999), Kojima *et al.* (2010) e Kanjilal *et al.* (2013) demonstraram, em estudos com ratos Wistar, que lipídios estruturados com ácido behênico nas posições *sn*-1,3 de TAG possuem baixas calorias, aproximadamente 5,3 kcal/g, devido a baixa absorção de ácido behênico no intestino dos animais.

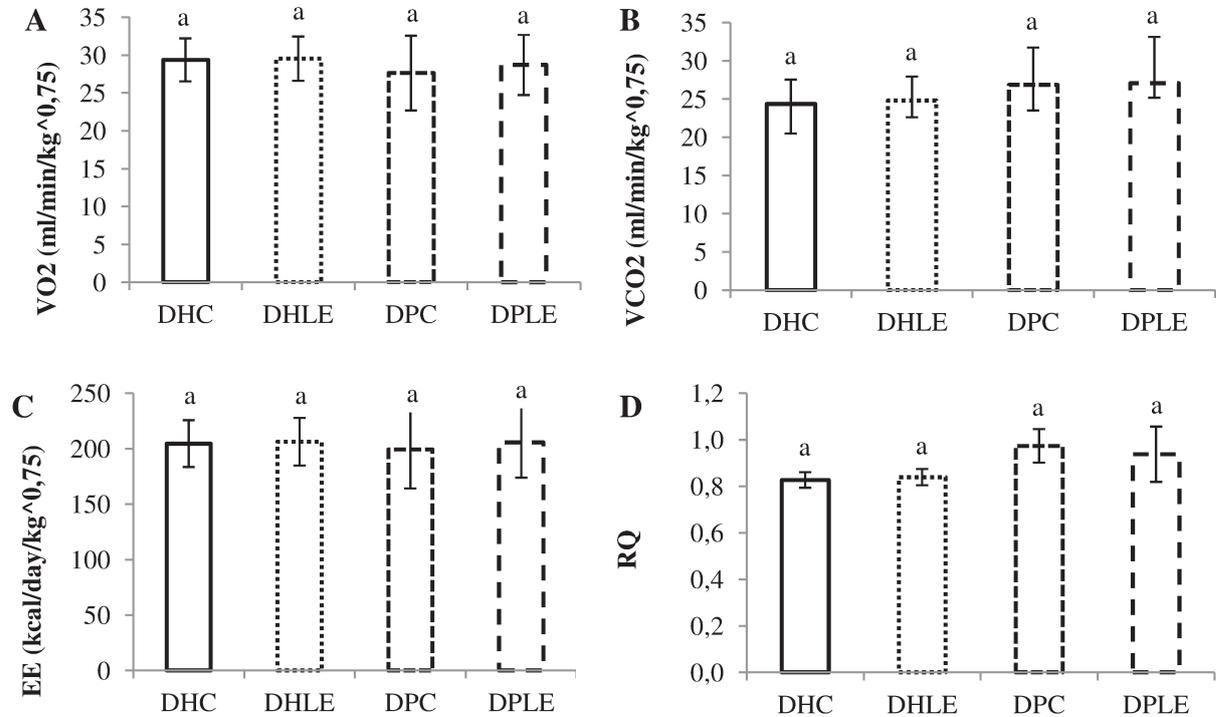
Em relação aos níveis glicêmicos encontrados no final do experimento, este não apresentou diferença significativa entre as médias das dietas consumidas pelos camundongos, conforme Figura 3. Para a avaliação da sensibilidade à insulina foi feito um teste de tolerância à insulina (ITT de 30') em animais submetidos a jejum prévio de 6h. O teste mostrou que os grupos não apresentaram diferença a sensibilidade à insulina ( $p < 0,05$ ), apesar da elevada diferença da quantidade de gordura central entre os grupos que consumiram DHC e DHLE. Isto aconteceu, provavelmente, devido o tempo de ensaio não ser suficiente para os controles adquirirem diferença significativa.



**Figura 3.** kITT (A) e o Decaimento dos níveis glicêmicos (B) durante o teste de tolerância a insulina dos animais que consumiram a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE) (Médias com a mesma letra não se diferem das demais pelo teste de Tukey com 95% de significância).

De Leeuw Van Weenen *et al.* (2009) obtiveram uma obesidade induzida em camundongos da linhagem C57BL6 com dieta hiperlipídica contendo 45% de lipídios do total da caloria com 4 semanas; Moreira (2011) conseguiu uma obesidade induzida em camundongos fêmeas da linhagem C57BL6 com dieta hiperlipídica incluindo 35% de gordura a partir de 3 meses de introdução da dieta e Galloukabani *et al.*, 2007 após 5 meses foi observado resistência a insulina. Isto demonstra a variação existentes entre os protocolos que

utilizam dietas hiperlipídicas e do tempo necessário para se conseguir o estabelecimento da resistência à insulina como resultado da obesidade.



**Figura 4.** Média e desvio padrão dos resultados da calorimetria indireta para: (A) volume de O<sub>2</sub> consumido (VO<sub>2</sub>), (B) volume de CO<sub>2</sub> expirado (VCO<sub>2</sub>), (C) gasto energético (EE) e (D) quociente respiratório (RQ) em camundongos que receberam as dietas padrão controle (DPC), padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE). (Médias com a mesma letra não se diferem das demais pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância).

Para avaliar se o consumo das diferentes dietas, controle e adicionada de LE, por camundongos acarretariam em alterações no metabolismo foi monitorado o metabolismo corporal por meio de calorimetria indireta, a qual estima o metabolismo por meio das medidas dos volumes de oxigênio consumido (VO<sub>2</sub>) e gás carbônico produzido (VCO<sub>2</sub>) durante o ciclo respiratório. Esses valores também permitem o cálculo do coeficiente respiratório (RQ = VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) e do gasto energético total (EE). Na Figura 4, podem-se verificar os valores de VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, RQ e EE dos camundongos submetidos às dietas padrão controle (DPC), padrão com LE (DPLE), hiperlipídica controle (DHC) e hiperlipídica com LE (DHLE). Não houve diferença significativa no consumo de O<sub>2</sub> e na produção de CO<sub>2</sub> para todos os grupos. O gasto energético foi semelhante para todas as dietas, implicando que o LE não aumenta ou altera o

metabolismo energético dos animais. Apesar dos animais que ingeriram LE apresentarem menor absorção de lipídios e conseqüentemente menor aporte calórico numa dieta balanceada, demonstrou fornecer energia utilizável suficiente para sustentar o metabolismo dos animais.

De acordo com McClave *et al.* (2003) é possível calcular a taxa de oxidação dos substratos energéticos glicídicos e lipídicos a partir da determinação dos volumes expiratórios de oxigênio e gás carbônico. Para cada substrato existe um valor de RQ, sendo 0,70 para o consumo de gordura, 0,80 para proteína e 1,00 para carboidrato. Com base no RQ medido, apesar de não haver diferença significativa, pode-se dizer que os animais submetidos ao consumo da dieta hiperlipídica controle ( $0,83 \pm 0,03$ ) e LE ( $0,84 \pm 0,03$ ), preferencialmente oxidaram menos proteína e carboidrato e mais lipídios, enquanto os animais que se alimentaram da dieta padrão controle ( $0,97 \pm 0,07$ ) e LE ( $0,94 \pm 0,12$ ) consumiram mais carboidratos para manterem seu metabolismo. O resultado obtido está de acordo com a ingestão nutricional e dentro da faixa relatada por Diener (1997), onde o RQ encontrado deve estar entre 0,67 e 1,30 (faixa fisiológica).

A Tabela 3 mostra a avaliação da composição corporal e a Figura 5 apresenta a quantidade (%) de lipídios totais no fígado e nas fezes dos animais que consumiram as diferentes dietas. Os animais controles da dieta hiperlipídica apresentaram uma diferença significativa no peso em todos os estoques de tecido adiposo, assim como no peso total quando comparado aos demais animais. Enquanto os animais que consumiram LE não se diferenciaram do controle da dieta padrão, mesmo os da DHLE. Então, os animais que consumiram DPLE e DHLE não engordaram provavelmente pela diminuição da absorção dos lipídios ingeridos, comprovado pelo aumento no consumo de ração para o grupo DPLE e o mesmo consumo de ração para o grupo DHLE, seguido pelo não aumento de peso, baixo armazenamento de lipídios no tecido adiposo, além do aumento de lipídios excretados pelos animais nas fezes. Não houve diferença significativa no acúmulo de gordura no fígado e no músculo gastrocnêmico avaliado pelo peso dos tecidos, apresentando assim, diferença somente no peso dos animais no armazenamento de lipídios no tecido adiposo. Durante o experimento, os animais não apresentaram diarreia, inferindo que os lipídios foram parcialmente absorvidos e não houve toxicidade na quantidade consumida pelos animais.

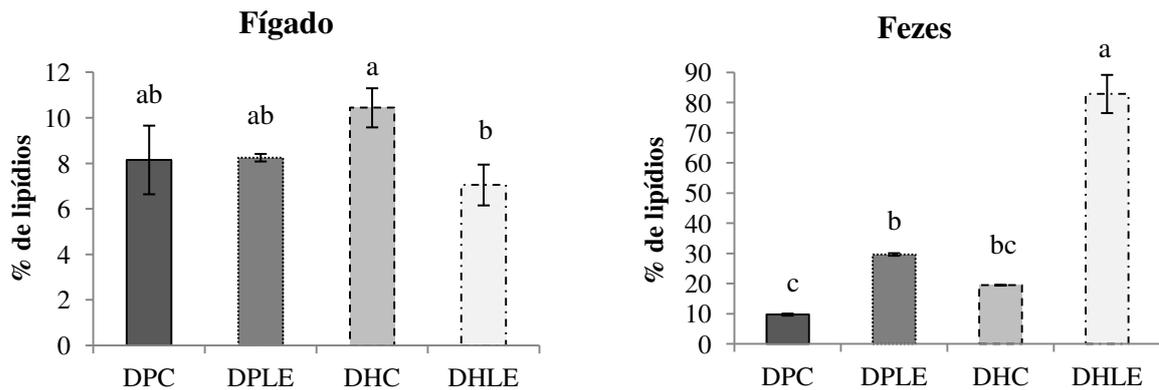
**Tabela 3.** Peso dos tecidos adiposo (TA), fígado e músculo Gastrocnêmico dos animais alimentados com a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).

Variáveis	DPC	DPLE	DHC	DHLE	
TA (g)	Epididimal	0,5±0,2 <sup>b</sup>	0,4±0,1 <sup>b</sup>	1,4±0,7 <sup>a</sup>	0,5±0,2 <sup>b</sup>
	Subcutâneo	0,1±0,1 <sup>b</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>	0,4±0,2 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>
	Perirenal	0,1±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,1±0,1 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>
	Mesentérico	0,3±0,1 <sup>b</sup>	0,3±0,2 <sup>b</sup>	0,6±0,2 <sup>a</sup>	0,3±0,2 <sup>b</sup>
	Total	0,9±0,4 <sup>b</sup>	0,8±0,3 <sup>b</sup>	2,5±1,2 <sup>a</sup>	1,0±0,5 <sup>b</sup>
Fígado (g)	1,1±0,1 <sup>a</sup>	1,0±0,2 <sup>a</sup>	1,1±0,2 <sup>a</sup>	1,1±0,2 <sup>a</sup>	
Músculo Gastrocnêmico (g)	0,1±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,1 <sup>a</sup>	

Os valores estão expressos em médias seguidas do desvio padrão.

As letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

Resultados semelhantes foram apresentados por um estudo sobre supressão da absorção de triacilglicerol a partir de um lipídio estruturado contendo ácido behênico e ácido oleico para prevenir a obesidade, conduzido por Kojima *et al.* (2010) em ratos, contendo 28% de lipídios na dieta (óleo de soja - SO), onde 5,6% foi substituído por BOO (1(3)-behenoyl-2,3 (1)-dioleoyl-rac-glicerol). Observaram que os animais que consumiram BOO promoveram uma redução significativa na deposição da gordura visceral, comprovado pelo menor peso dos tecidos adiposo (epididimal e mesentérico) e hepático; assim como excretaram mais ácidos graxos nas fezes. Kojima *et al.* (2013) também observaram que o peso úmido e o nível de gordura das fezes eram significativamente maiores no grupo dos indivíduos que ingeriram cookies contendo o BOO durante 7 dias (2,46g/dia de BOO), em comparação com os do grupo placebo, concluindo que o BOO aumentou a excreção fecal de gordura alimentar em humanos sem influenciar na absorção das vitaminas lipossolúveis e minerais. Arishima *et al.* (2009) reportaram num estudo *in vitro* que o ácido behênico possui baixa biodisponibilidade, o que leva a uma redução da absorção e conseqüentemente causa a diminuição do peso corporal e da deposição da gordura visceral.

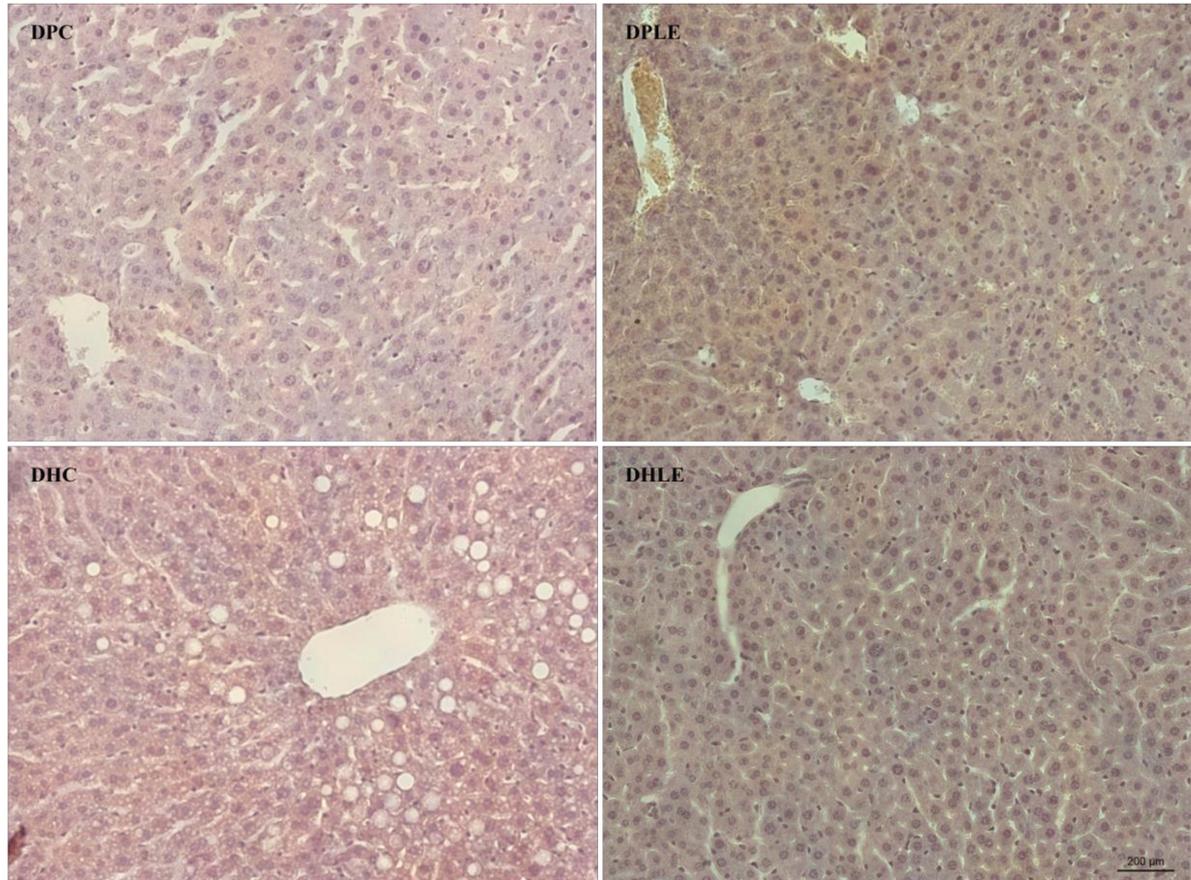


**Figura 5.** Lipídios totais (%) no fígado e nas fezes dos animais que consumiram as dietas padrão controle (DPC), padrão com LE (DPLE), hiperlipídica controle (DHC) e hiperlipídica com LE (DHLE). (As letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey ao nível de 95% de significância)

Resultados semelhantes foram apresentados por um estudo sobre supressão da absorção de triacilglicerol a partir de um lipídio estruturado contendo ácido behênico e ácido oleico para prevenir a obesidade, conduzido por Kojima *et al.* (2010) em ratos, contendo 28% de lipídios na dieta (óleo de soja - SO), onde 5,6% foi substituído por BOO (1(3)-behenoyl-2,3 (1)-dioleoyl-rac-glicerol). Observaram que os animais que consumiram BOO promoveram uma redução significativa na deposição da gordura visceral, comprovado pelo menor peso dos tecidos adiposo (epididimal e mesentérico) e hepático; assim como excretaram mais ácidos graxos nas fezes. Kojima *et al.* (2013) também observaram que o peso úmido e o nível de gordura das fezes eram significativamente maiores no grupo dos indivíduos que ingeriram cookies contendo o BOO durante 7 dias (2,46g/dia de BOO), em comparação com os do grupo placebo, concluindo que o BOO aumentou a excreção fecal de gordura alimentar em humanos sem influenciar na absorção das vitaminas lipossolúveis e minerais. Arishima *et al.* (2009) reportaram num estudo *in vitro* que o ácido behênico possui baixa biodisponibilidade, o que leva a uma redução da absorção e conseqüentemente causa a diminuição do peso corporal e da deposição da gordura visceral.

Apesar dos animais não terem se diferenciado significativamente quanto ao peso do fígado, estes obtiveram diferença na composição deste tecido, apresentando mais gordura os animais controle da dieta hiperlipídica e menos os que consumiram DHLE. Os animais que consumiram DPLE não se diferenciaram do controle. Assim, a adição do LE na dieta não promoveu acúmulo de gordura nos hepatócitos dos animais, portanto não causou injúrias e nem perturbações metabólicas no fígado. Entretanto, os animais que consumiram DHC

desenvolveram esteatose hepática, apresentando  $41,8\% \pm 2,7$ , sendo tanto macro como microvesicular e enquadrando-se no grau 2 de esteatose, de acordo com a avaliação da escala de 5 graus, como pode ser observado na Figura 6.



**Figura 6.** Avaliação histológica do fígado dos animais que consumiram as dietas as dietas padrão controle (DPC), padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE). Coloração com hematoxilina-eosina de cortes de fígado de 2,0 μm e ampliação da imagem de 200 X.

A presença de baixo grau de esteatose hepática nos animais que consumiram DHC confirma que o tempo de ensaio não foi suficiente para o desenvolvimento da resistência a insulina, uma vez que existe forte correlação desta com o aparecimento de injúrias no fígado (CHAN *et al.*, 2007; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF, 2016). De acordo com Marchesini *et al.* (2001) e Chan *et al.* (2007) a esteatose hepática não alcoólica deveria ser reconhecida como um componente da síndrome metabólica, por estar envolvida no contexto dos fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2 e

da doença cardiovascular precoce. Além disso, Scheen e Luyckx (2002) reportaram que a redução abrupta da massa adiposa, como no caso da cirurgia bariátrica, pode provocar alterações hepáticas indesejáveis não contornáveis dependendo do grau de obesidade, diferentes do uso de auxiliares na perda de peso, como o lipídio estruturado contendo behênico, que provoca a redução da massa adiposa de forma mais branda.

Sabendo que o LE promoveu a diminuição da absorção dos lipídios ingeridos na dieta, cabe agora entender se houve metabolização dos ácidos graxos posicionados na região *sn-2* e se promoveram melhores níveis de colesterol e produção de outros ácidos graxos essenciais pelo organismo dos animais.

O lipídio estruturado contém cerca de 6% de ácido behênico na sua composição, isto significa que a cada 100g de dieta, os animais consumiram 1,8g de ácido behênico, uma vez que a dieta é composta por 29,8% de LE. Os demais ácidos graxos principais que compõe o lipídio são: palmítico (16:0 – 12,6%), esteárico (18:0 – 5,5%), oléico (18:1 – 42,3%), linoléico (18:2 – 27,8%), linolênico (18:3 – 3,0%) e outros (2,8%). Sabendo a composição dos lipídios ingeridos e tendo conhecimento que o metabolismo destes é controlado pelo estado dietético via um conjunto complexo de sinais hormonais, e que depois de uma refeição, eles são armazenados como TG no tecido adiposo, porém antes, os ácidos graxos provindos da dieta são metabolizados pelo fígado e liberado no sangue como VLDL e enviado para o tecido adiposo para deposição como TG. Então, para avaliar a influência do LE no metabolismo dos lipídios no organismo dos camundongos, foi feita a análise do perfil de ácidos graxos no fígado dos animais, como demonstrado na Tabela 4 e no Anexo 2.

Os grupos que consumiram a dieta padrão não apresentaram diferença na composição e no percentual dos ácidos graxos encontrados. Já para os grupos que ingeriram a dieta hiperlipídica, pode-se observar uma diferença significativa nos resultados para os ácidos palmítico, araquidônico (AA) e docosaheptaenóico (DHA). Porém não houve diferença estatística na proporção de ácidos graxos saturados e insaturados.

**Tabela 4.** Perfil qualitativo de ácidos graxos do tecido hepático dos animais alimentados com as dietas padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta Hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).

Ácido Graxo (%)		DPC	DPLE	DHC	DHLE
Ac. Mirístico	C14:0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,7± 0,0	0,0± 0,0
Ac. Palmítico	C16:0	25,8± 0,7 <sup>a</sup>	26,0± 1,3 <sup>a</sup>	26,4± 0,3 <sup>a</sup>	21,1± 0,2 <sup>b</sup>
Ac. Palmitoléico	C16:1	5,2± 1,0 <sup>a</sup>	3,6± 0,8 <sup>ab</sup>	2,7± 0,0 <sup>a</sup>	0,0± 0,0
Ac. Esteárico	C18:0	8,6± 0,7 <sup>a</sup>	9,3± 0,4 <sup>a</sup>	8,1± 0,2 <sup>a</sup>	13,5± 4,6 <sup>a</sup>
Ac. Oléico	C18:1	22,8± 2,6 <sup>a</sup>	25,7± 1,5 <sup>a</sup>	30,3± 1,3 <sup>a</sup>	22,5± 5,7 <sup>a</sup>
Ac. Linoléico	C18:2	22,7± 2,0 <sup>ab</sup>	19,5± 1,1 <sup>b</sup>	21,9± 0,1 <sup>ab</sup>	25,3± 2,7 <sup>a</sup>
Ac. Linolênico	C18:3	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,7± 0,0	0,0± 0,0
Ac. Araquidônico	C20:4	9,0± 0,1 <sup>ab</sup>	9,5± 1,4 <sup>ab</sup>	6,2± 1,0 <sup>b</sup>	11,0± 3,0 <sup>a</sup>
Ac. Docosahexaenoico (DHA)	C22:6	5,8± 0,5 <sup>ab</sup>	6,4± 1,8 <sup>a</sup>	3,1± 0,7 <sup>b</sup>	6,7± 1,3 <sup>a</sup>
Soma (%)		100,0	100,0	100,0	100,0
Saturados (%)		34,4± 1,3 <sup>a</sup>	35,3± 1,7 <sup>a</sup>	35,1± 0,5 <sup>a</sup>	34,6± 4,5 <sup>a</sup>
Insaturados (%)		65,6± 1,3 <sup>a</sup>	64,7± 1,7 <sup>a</sup>	64,9± 0,5 <sup>a</sup>	65,4± 4,5 <sup>a</sup>
Insaturado/Saturado		1,9	1,8	1,8	1,9

Os valores estão expressos em médias seguidas do desvio padrão.

As letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

A maior quantidade de ácido araquidônico (C20:4,  $\omega$ -6, AA) no fígado dos animais que consumiram DHLE foi decorrente do alto teor de ácido linoléico da dieta, uma vez que este dá origem, entre outros, ao AA. O mesmo aconteceu para os elevados teores de DHA, porém seu precursor é o ácido linolênico, o qual permite a formação de três importantes ácidos graxos de cadeia longa: o ácido eicosapentaenóico (C20:5, EPA), o ácido docosapentaenóico (C22:5, DPA) e o ácido docosahexaenóico (C22:6, DHA). Estes formam os PUFA, designados como ácidos graxos essenciais (AGE) e derivam dos ácidos graxos da série  $\omega$ 3, ácido linolênico (ALA; 18:3) e os da série  $\omega$ 6, ácido linoléico (LA; 18:2) (VALENZUELA *et al.*, 2011). Com estes resultados, podemos considerar que o LE não alterou o metabolismo dos lipídios, pelo contrário, aumentou os níveis de ácidos graxos necessários para um melhor funcionamento do organismo dos animais. Não houve perdas nutricionais em relação ao ácido linoléico, uma vez que não houve diferença no perfil entre as dietas consumidas pelos camundongos. Além disso, a proporção de ácido graxo  $\omega$ 6/ $\omega$ 3, que é um indicador qualitativo da dieta, foi de 27,8%:3,0% ou 9,3:1, o qual está dentro da recomendação da WHO/FAO, onde a razão recomendada é de 5 a 10 unidades de  $\omega$ 6 para 1 unidade de  $\omega$ 3.

Não foi encontrado nenhum vestígio de ácido behênico na composição lipídica do fígado, sugerindo que este não foi absorvido pelo sistema digestivo. Porém, resultados

diferentes foram encontrados quando os lipídios foram analisados na carcaça dos animais. Yoshida, Aoyama e Yamamoto (1991) alimentaram ratos com uma dieta contendo TAG composto por Behênico/Capróico/capróico, por 1 semana, e relataram que a aparente absorção de TAG foi 39% e do ácido behênico 8%, quando comparados com ratos alimentados exclusivamente com óleo de girassol. Uma série de estudos sobre a alimentação de curto prazo foi realizada por Webb *et al.* (1991) para avaliar os efeitos biológicos do Caprenin® e também verificaram que o ácido behênico foi metabolizado tanto por ratos como por hamsters, indicado por uma recuperação de 3-15% da absorção de ácidos graxos na gordura total das carcaças no final do estudo.

Com a avaliação do perfil de ácidos graxos do fígado verificou-se que a baixa absorção e a alta excreção de lipídios pelos animais que consumiram LE, não interferiram no metabolismo dos lipídios. Portanto, deve-se agora entender se houve alteração na quantidade de TG e Colesterol total no fígado, tecido adiposo e no sangue, assim como os tipos de lipoproteínas encontradas no sangue (Tabela 5).

O alto consumo de colesterol na dieta pode promover alterações nos níveis séricos de colesterol, levando ao desenvolvimento da colesterolemia e indução da aterosclerose precoce. Entretanto, o efeito do colesterol dietético no plasma pode ser modificado pela quantidade e qualidade de ácidos graxos ingeridos (KHOSLA e SUNDRAM, 1996; LOTTENBERG, 2009). Portanto, a composição do lipídio total ingerido é tão importante quanto à do colesterol da dieta, na influência do Colesterol Total sanguíneo e nos tecidos.

O conteúdo de colesterol total (CT) e triglicérides (TG) no fígado, tecido adiposo epididimal (TAE) e sangue podem ser visualizados na Tabela 6, assim como os níveis de HDL, LDL e VLDL. No experimento os animais que ingeriram a dieta padrão apresentaram diferença significativa somente nos níveis de HDL, onde os valores do controle foram maiores do que os da amostra. Já os animais que consumiram a dieta hiperlipídica apresentaram diferença significativa na composição do tecido adiposo, resultando em níveis de TG e de colesterol bem menores para os animais que consumiram LE, assim como os teores de Colesterol total no sangue. A diferença na quantidade de TG armazenada no tecido adiposo dos animais mostra como o LE diminui a absorção de lipídios e evitou o aumento da deposição da gordura no TA.

Os animais que receberam a dieta padrão, tanto controle como LE, receberam uma alimentação regulada, onde a necessidade de se obter mais calorias está na forma de TG armazenado no TAE e no fígado, principalmente após um jejum prolongado de 6 horas. Por isso, apresentaram uma maior quantidade de TG e VLDL em circulação no sangue.

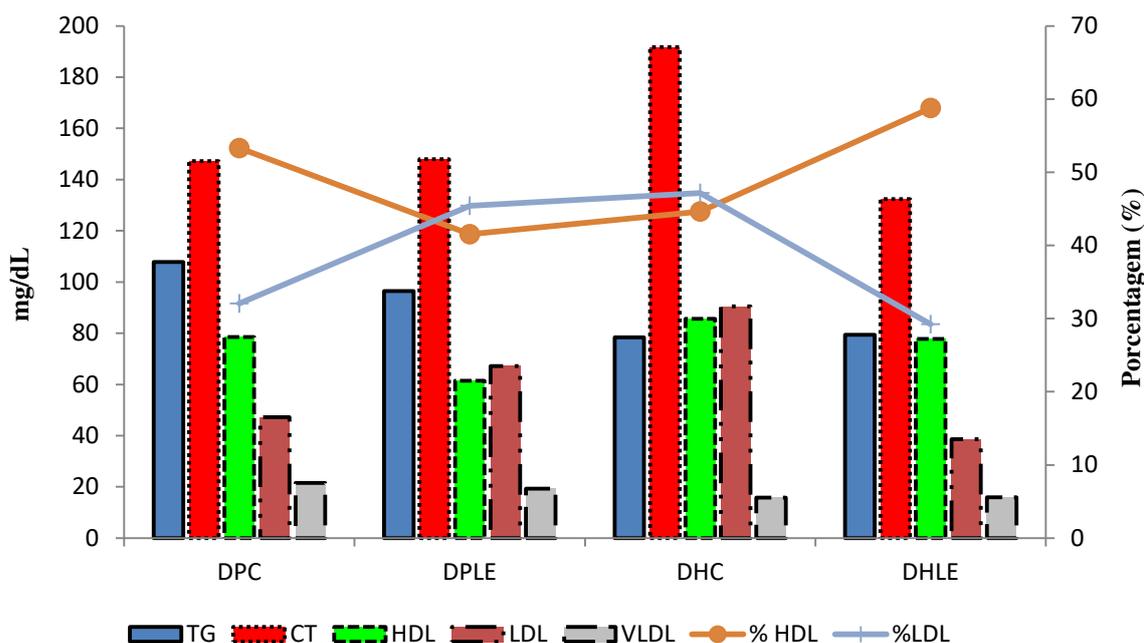
**Tabela 5.** Conteúdo de colesterol total e triglicérides no fígado, tecido adiposo epididimal (TAE) e sangue; e frações do colesterol (HDL-c, LDL-c, VLDL-c) no sangue dos camundongos alimentados com dieta padrão (DPC), dieta padrão com LE (DPLE), dieta hiperlipídica (DHC) e dieta hiperlipídica com LE (DHLE).

Variáveis		DPC	DPLE	DHC	DHLE
Fígado (mg/dL)	Triglicérides	68,5±2,8 <sup>a</sup>	59,5±10,1 <sup>a</sup>	60,9±20,4 <sup>a</sup>	70,2±10,0 <sup>a</sup>
	Colesterol Total	20,1±6,4 <sup>a</sup>	16,3±3,3 <sup>a</sup>	16,8±6,0 <sup>a</sup>	13,1±2,3 <sup>a</sup>
TAE (mg/dL)	Triglicérides	133,5±15,0 <sup>b</sup>	94,7±6,5 <sup>b</sup>	186,7±47,4 <sup>a</sup>	95,5±8,4 <sup>b</sup>
	Colesterol Total	21,40±3,6 <sup>b</sup>	24,3±4,9 <sup>b</sup>	44,6±6,0 <sup>a</sup>	24,70±3,2 <sup>b</sup>
Sangue (mg/dL)	Triglicérides	107,9±13,7 <sup>a</sup>	96,5±16,9 <sup>ab</sup>	78,4±9,9 <sup>b</sup>	79,4±17,4 <sup>b</sup>
	Colesterol Total	147,3±12,2 <sup>b</sup>	147,9±18,7 <sup>b</sup>	191,8±27,5 <sup>a</sup>	132,3±18,3 <sup>b</sup>
	HDL-c	78,5±9,4 <sup>a</sup>	61,4±5,5 <sup>b</sup>	85,6±3,2 <sup>a</sup>	77,8±12,2 <sup>a</sup>
	VLDL-c	21,6±2,7 <sup>a</sup>	19,3±3,4 <sup>ab</sup>	15,8±1,0 <sup>b</sup>	15,9±3,5 <sup>b</sup>
	LDL-c	47,2	67,2	90,4	38,7

Os valores estão expressos em médias seguidas do desvio padrão.

AS letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

O colesterol total possui várias frações e as mais importantes que atuam como fatores indicativos são o LDL-c, onde a elevada concentração no sangue indica aumento no risco de doenças cardiovasculares (DCV), devido sua associação no plasma com os mecanismos subjacentes à formação de placa aterosclerótica e o HDL-c, mostra uma associação negativa, pois um alto nível diminui a possibilidade do desenvolvimento desta doença (KHOSLA e SUNDRAM, 1996; SNIDERMAN *et al.*, 2003). Sob esse ponto de vista, o único grupo que apresentou risco de desenvolver uma DCV foi o DHC, uma vez que apresentou aumento nos níveis de colesterol total e LDL-c e diminuição no HDL-c. Assim, o consumo de LE na dieta hiperlipídica diminui o risco do desenvolvimento de DCV, pois ao contrário da DHC, não apresentou aumento no colesterol total e no LDL-c, e elevou os níveis da fração HDL-c, como pode ser observado na Figura 7.



**Figura 7.** Níveis de triacilgliceróis, Colesterol Total (CT), HDL-c, LDL-c, VLDL-c, porcentagem de HDL (% HDL) e porcentagem de LDL (%LDL) no sangue dos animais alimentados com a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).

Os animais que consumiram DPLE, apesar de apresentarem os mesmos níveis de TG e colesterol total sanguíneo do controle, apresentaram níveis maiores de LDL-c e níveis menores com diferença significativa na quantidade de HDL-c. Isto pode ter ocorrido, uma vez que a dieta padrão é uma dieta regulada que contém todos os nutrientes necessários na quantidade adequada para o desenvolvimento dos animais. O excesso de lipídios excretados nas fezes pelos camundongos que ingeriram DPLE provocou uma descompensação nos lipídios absorvidos, o qual levou a uma baixa quantidade de ácidos graxos que pudessem melhorar os níveis de HDL no sangue, apesar de que não houve diferença significativa entre os ácidos graxos poli-insaturados do controle. Cabe ressaltar, que com o resultado obtido só é possível saber se houve diferença e não quanto prejudicial foi para o organismo desse grupo.

A diminuição do colesterol total pelo ácido behênico pode ser explicada pelo mesmo mecanismo de ação do Orlistat, uma vez que atuam na inibição das lipases gastrointestinais. A capacidade do fármaco em inibir lipases gastrointestinais está em reduzir a disponibilidade de ácidos graxos e monoacilgliceróis, que são formados pela hidrólise dos TGs e responsáveis em formar micelas capazes de solubilizar o colesterol, permitindo sua absorção. Esta redução acontece devido à formação de uma fase oleosa persistente no intestino, constituída dos TG

não hidrolisados, a qual retém o colesterol e impede a sua absorção, levando a uma diminuição dos seus níveis no organismo (MULS *et al.*, 2001; KOJIMA *et al.*, 2013) também sugeriram que essa diminuição provocada pelo ácido behênico resulta na diminuição da absorção de TGs e conseqüentemente na diminuição da deposição da gordura visceral.

Kojima *et al.* (2010) também notaram significativamente ( $P < 0,05$ ) a diminuição do colesterol total no sangue e no fígado dos animais alimentados com BOO (5,6% de BOO na dieta). Assim como Kanjilal *et al.* (2013) verificaram a diminuição significativa dos lipídios séricos e hepáticos, principalmente do colesterol total, LDL-c e TG em estudo contendo 10% de lipídios estruturados a partir de ácido behênico e óleo de soja, e ácido behênico com óleo de girassol na dieta de ratos e coelhos machos, observaram ainda que os animais não apresentaram efeitos adversos sobre o crescimento e na ingestão da dieta. Efeitos similares foram encontrados por Lopes (2012) num estudo com orlistat, onde diminuiu o nível de HDL-c. Entretanto, para os níveis de glicose, colesterol, TG e LDL-c foram observadas apenas uma diminuição não significativa ( $p > 0,05$ ).

Almeida *et al.* (2011) estudou ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas (óleo de soja, gordura de peixe e porco, margarina e manteiga) e observou que a fonte lipídica que apresentou os melhores resultados para TG, Colesterol total, HDL-c, e razão Colesterol Total/HDL foi o óleo de soja. O consumo de gordura do peixe causou efeito sérico e tecidual semelhante ao encontrado nas outras fontes lipídicas (gordura de porco, manteiga e margarina), as quais podem contribuir para o surgimento e a progressão das doenças cardiovasculares.

O DHLE apresentou o melhor perfil lipoproteico do colesterol plasmático, o qual também pode ser uma resposta da adição de ácido oléico na dieta, pois assim como os ácidos poli-insaturados, os monoinsaturados também atuam no aumento do HDL-c e diminuição do LDL, melhorando quadros clínicos relacionados à obesidade (PEREZ-JIMENEZ *et al.*, 2005; GILMORE *et al.*, 2011; SALES-CAMPOS *et al.*, 2013). Portanto, a quantidade de ácidos graxos insaturados, tanto PUFA como MUFA, melhoraram o perfil lipoproteico dos animais que consumiram LE.

Para avaliar o perfil qualitativo dos ácidos graxos excretados, a Tabela 6 e o Anexo 3 mostram o perfil lipídico das fezes dos animais das diferentes dietas consumidas, indicando os ácidos graxos que não foram absorvidos pelo organismo dos animais durante o experimento. Os ácidos graxos que predominaram nas fezes dos animais foram o ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico, com diferença do ácido behênico para os animais que consumiram a dieta contendo LE e ácidos graxos traços para os que se alimentaram com DH. Os animais

eliminaram nas fezes, independente do tipo de ração consumida, mais ácidos graxos saturados, principalmente esteárico e palmítico, do que insaturados, oléico e linoléico. Porém os que consumiram a DPC eliminaram mais insaturados, uma vez que os lipídios base da dieta são formados por esses. A presença de traços de ácido behênico nos animais que consumiram dieta DHC, pode ser explicada pela transformação metabólica pela microbiota intestinal.

**Tabela 6.** Perfil qualitativo de ácidos graxos das fezes dos animais alimentados com a dieta padrão controle (DPC), dieta padrão com lipídio estruturado (DPLE), dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta Hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).

Ácido Graxo (%)		DPC	DPLE	DHC	DHLE
Ac. Mirístico	C14:0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,8± 1,0	0,0± 0,0
Ac. Pentanóico	C15:0	0,00± 0,0	0,0± 0,0	0,7± 0,1	0,0± 0,0
Ac. Palmítico	C16:0	41,9± 1,0	31,1± 0,4	20,7± 1,0	33,4± 1,8
Ac. Heptadecanóico	C17:0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,5± 0,5	0,0± 0,0
Ac. Esteárico	C18:0	29,5± 2,4	20,2± 0,9	50,9± 3,5	18,8± 0,3
Ac. Oléico	C18:1	15,3± 1,1	8,5± 0,6	17,1± 1,9	15,9± 0,5
Ac. Linoléico	C18:2	13,3± 0,7	3,0± 0,1	5,3± 0,3	6,1± 0,4
Ac. Linolênico	C18:3	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,3± 0,5	0,4± 0,0
Ac. Araquídico	C20:0	0,0± 0,0	6,1± 1,7	1,6± 0,0	3,7± 0,3
Ac. Gadoléico	C20:1	0,0± 0,0	0,0± 0,0	1,2± 0,5	1,3± 0,1
Ac. Behênico	C22:0	0,0± 0,0	31,1± 1,7	0,9± 0,2	19,1± 2,2
Ac. Lignocérico	C24:0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	1,3± 0,2
Soma (%)		100,0	100,0	100,0	100,0
Saturados (%)		71,4± 1,5 <sup>c</sup>	88,5± 0,5 <sup>a</sup>	76,2± 2,8 <sup>b</sup>	76,2± 1,0 <sup>b</sup>
Insaturados (%)		28,6± 1,5 <sup>c</sup>	11,5± 0,5 <sup>a</sup>	23,8± 2,8 <sup>b</sup>	23,8± 1,0 <sup>b</sup>
Insaturado/Saturado		0,4	0,1	0,3	0,3

Os valores estão expressos em médias seguidas do desvio padrão.

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

Kojima *et al.* (2013) também notaram nas fezes de humano que o BOO (triacilglicerol com behênico, oléico e oléico) não aumentou a excreção de ácidos graxos específicos e sim um aumento geral na excreção de todos os ácidos graxos de origem alimentar, o que levou a diminuição ou o retardamento da absorção intestinal de lipídios. A eliminação parcial dos lipídios nas fezes não teve impacto sobre os ácidos graxos necessários para funcionamento normal do organismo dos animais que consumiram DHLE. Provavelmente isto aconteceu devido à localização dos ácidos graxos insaturados no glicerol do LE, o qual fica comprovado pelo aumento na produção de AA e DHA no fígado.

Analisando de forma geral os resultados para os animais que consumiram as dietas com LE, os animais que se alimentaram com DPLE consumiram uma maior quantidade de

ração e não engordaram devido excretarem três vezes mais lipídios nas fezes do que os controles. Entretanto apresentaram baixos níveis de HDL-c e alto de LDL-c quando comparado com o controle e os demais animais do experimento. Não diferenciou do controle em relação ao peso corporal, ganho de peso, glicemia basal, KITT, peso dos tecidos adiposo, fígado e músculo gastrocnêmico; calorimetria indireta, lipídios totais no fígado, perfil lipídico do fígado e fezes, diferenciando apenas na presença de ácido behênico nas fezes; TG e CT no fígado, sangue e TAE; VLDL e não apresentaram esteatose hepática.

Os animais que consumiram DHLE apresentaram um menor ganho de peso e consumiram a mesma quantidade de ração, porém maior quantidade de lipídios na dieta, em relação ao controle. A diferença no peso do tecido adiposo mostrou um menor armazenamento de lipídios neste tecido, principalmente no epididimal, o qual apresentou baixas taxas de TG. Os animais excretaram 4 vezes mais lipídios do que o controle, sendo que os ácidos graxos foram excretados de forma geral, conforme o perfil da dieta. A diferença na quantidade de gordura apresentada pelo fígado, proporcionou ao DHLE o não desenvolvimento de esteatose hepática, diferente do controle que apresentou grau 2. Em relação ao perfil lipídico do fígado os animais apresentaram melhores níveis de ácido linoléico, AA e DHA, resultando na melhora do perfil lipoproteico do sangue, pois apresentou altos níveis para HDL-c e baixos níveis para o LDL-c e o colesterol total. Não se diferenciaram do controle para a taxa de glicose basal, KITT, calorimetria indireta, peso do fígado, peso do músculo gastrocnêmico, TG e CT no fígado, VLDL e TG no sangue; e quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados no fígado e nas fezes.

Dessa forma, fica comprovado que o LE possui efeitos antiobesidade, apresentando um quadro que pode levar a melhoria ou o não desenvolvimento da síndrome metabólica.

#### **4. CONCLUSÃO**

Lipídios estruturados a partir de óleo de soja, azeite de oliva e crambe totalmente hidrogenado obtidos por síntese enzimática, promoveram uma melhora na absorção de ácidos graxos essenciais e uma diminuição nos demais pela excreção nas fezes. Esta adição do LE na dieta padrão e na hiperlipídica permitiu que os camundongos não engordassem, permanecendo eutróficos, provavelmente devido à inibição da lipase pancreática, o que levou a baixa absorção de lipídios pelo organismo, aumento na excreção de lipídios nas fezes e a não deposição de gordura visceral, levando a não formação de esteatose no fígado. Além disso, a posição dos ácidos graxos na cadeia ajudou no aumento da síntese de AA e DHA e

apresentaram melhores resultados de colesterol total, HDL e LDL para os animais que consumiram DHLE, permanecendo assim saudáveis. Dessa forma, o presente estudo demonstrou que o LE pode ser um forte aliado no combate ou prevenção da obesidade e conseqüentemente outras doenças, não apresentando efeitos colaterais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO – Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. Quase 60% dos brasileiros estão acima do peso, revela IBGE. (2015). Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/noticia/quase-60-dos-brasileiros-estao-acima-do-peso-revela-pesquisa-do-ibge>> Acessado em: 06/05/2016

ACEDO, S. C.; CARIA, C. R.; GOTARDO, E. M.; PEREIRA, J. A.; PEDRAZZOLI, J.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A. Role of pentoxifylline in non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obesity in mice. **World J Hepatol**, v. 7, n. 24, p. 2551-8, Oct 28 2015.

ALMEIDA, M. E. F. D.; QUEIROZ, J. H. D.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. Lipídeos séricos e morfologia hepática de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas (óleo de soja, gordura de peixe e porco, margarina e manteiga). **Revista de Nutrição**, v. 24, p. 143-152, 2011. ISSN 1415-5273. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732011000100014&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732011000100014&nrm=iso)>. Acesso em: 11/10/2014.

ARISHIMA, T.; TACHIBANA, N.; KOJIMA, M.; TAKAMATSU, K.; IMAIZUMI, K. Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. **Journal of Food Lipids**, v. 16, n. 1, p. 72-88, 2009. ISSN 1745-4522. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01133.x>>. Acesso em: 06/05/2015.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 646-656, 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500017&nrm=iso)>. Acesso em: 04/04/2016.

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 01, p. 3-17, 2009. ISSN 1475-2700. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0954422409369267>>. Acesso em: 12/05/2015.

BONORA, E.; MANICARDI, V.; ZAVARONI, I.; COSCELLI, C.; BUTTURINI, U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. **Diabete Metab**, v. 13, n. 2, p. 116-21, Apr 1987. ISSN 0338-1684.

CHAN, H. L. Y.; DE SILVA, H. J.; LEUNG, N. W. Y.; LIM, S. G.; FARRELL, G. C. How should we manage patients with non-alcoholic fatty liver disease in 2007? **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 22, n. 6, p. 801-808, 2007. ISSN 1440-1746.

DE LEEUW VAN WEENEN, J. E.; HU, L.; JANSEN-VAN ZELM, K.; DE VRIES, M. G.; TAMSMA, J. T.; ROMIJN, J. A.; PIJL, H. Four weeks high fat feeding induces insulin resistance without affecting dopamine release or gene expression patterns in the hypothalamus of C57Bl6 mice. **Brain Research**, v. 1250, p. 141-148, 2009. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899308027340> >. Acesso em: 20/11/2014.

DIENER, J. R. C. Calorimetria indireta. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 245-253, 1997. ISSN 0104-4230. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000300013&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000300013&nrm=iso) >. Acesso em: 02/06/2015.

ECKERSLEY, R. M. Losing the battle of the bulge: causes and consequences of increasing obesity. **Med J Aust**, v. 174, n. 11, p. 590-2, Jun 4 2001. ISSN 0025-729x.

ESCRIVÁ, M. V. G. **Caracterização e seleção de gorduras de sementes do gênero theobroma para aplicação tecnológica**. 2002. 197 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF, O. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1388-1402, 2016. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827815007345> >.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, p. 497 - 509, 1957.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/content/18/6/499.abstract> >. Acesso em: 23/07/2015.

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M.-S.; RABÈS, J.-P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; TOMÉ, D.; JAIS, J.-P.; JUNIEN, C. C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat Diet Delineate Components of Metabolic Syndrome. **Obesity**, v. 15, n. 8, p. 1996-2005, 2007. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2007.238> >. Acesso em: 12/10/2014.

GILMORE, L. A.; WALZEM, R. L.; CROUSE, S. F.; SMITH, D. R.; ADAMS, T. H.; VAIDYANATHAN, V.; CAO, X.; SMITH, S. B. Consumption of High-Oleic Acid Ground Beef Increases HDL-Cholesterol Concentration but Both High- and Low-Oleic Acid Ground Beef Decrease HDL Particle Diameter in Normocholesterolemic Men. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1188-1194, 2011. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/141/6/1188.abstract> >. Acesso em: 05/04/2016.

HAN, L. K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. **International Journal of Obesity**, v. 23, n. 2, p. 174-179, 1999. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032938437&partnerID=40&md5=9f67f75efdf4f1715f1c04eab0b1f0> >. Acesso em: 12/10/2014.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Pract**, v. 22, n. 6, p. 475-6 passim, Jul 1973. ISSN 0023-6853.

JEBB, S. A.; PRENTICE, A. M. Assessment of human energy balance. **J Endocrinol**, v. 155, n. 2, p. 183-5, Nov 1997. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/155/2/183.short> >. Acesso em: 12/10/2014.

KANJILAL, S.; KAKI, S. S.; RAO, B. V. S. K.; SUGASINI, D.; RAO, Y. P.; PRASAD, R. B. N.; LOKESH, B. R. Hypocholesterolemic effects of low calorie structured lipids on rats and rabbits fed on normal and atherogenic diet. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 259-265, 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612012319> >. Acesso em: 05/04/2014.

KANJILAL, S.; PRASAD, R. B.; KAIMAL, T. N.; GHAFLOORUNISSA; RAO, S. H. **Synthesis and estimation of calorific value of a structured lipid-potential reduced calorie fat**. 1999. 1045-55 ISBN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.biomedsearch.com/nih/Synthesis-estimation-calorific-value-structured/10580332.html> >.

KHOSLA, P.; SUNDRAM, K. Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. **Progress in Lipid Research**, v. 35, n. 2, p. 93-132, 1996. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163782795000143> >. Acesso em: 12/10/2014.

KLEIN, S.; BURKE, L. E.; BRAY, G. A.; BLAIR, S.; ALLISON, D. B.; PI-SUNYER, X.; HONG, Y.; ECKEL, R. H. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: Endorsed by the American College of Cardiology Foundation. **Circulation**, v. 110, n. 18, p. 2952-2967, 2004. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/110/18/2952.long> >. Acesso em: 12/10/2014.

KOJIMA, M.; ARISHIMA, T.; SHIMIZU, R.; KOHNO, M.; KIDA, H.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. The consumption of a structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids increases fecal fat excretion in humans. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 12, p. 997-1001, 2013. ISSN 13458957. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84888633646&partnerID=40&md5=0aae616c88e0277b0179a5effda6be37> >. Acesso em: 10/04/2014.

KOJIMA, M.; TACHIBANA, N.; YAMAHIRA, T.; SEINO, S.; IZUMISAWA, A.; SAGI, N.; ARISHIMA, T.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. Structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids suppresses triacylglycerol

absorption and prevents obesity in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 1, p. 77, 2010. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.lipidworld.com/content/9/1/77> >. Acesso em: 10/04/2014.

KUBOW, S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 10, p. 530-541, 1996. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286396001064> >. Acesso em: 12/10/2014.

LOPES, T. I. B. **Avaliação do perfil de ácidos graxos em pacientes com sobrepeso tratados com orlistate usando CG-EM e avaliação do perfil metabólico de plasma por RMN de 1H**. 2012. Dissertação (Mestrado). Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 595-607, 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500012&nrm=iso) >. Acesso em: 20/11/2014.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; BIANCHI, G.; TOMASSETTI, S.; BUGIANESI, E.; LENZI, M.; MCCULLOUGH, A. J.; NATALE, S.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1844-50, Aug 2001. ISSN 0012-1797. Acesso em: 12/10/2014.

MCCLAVE, S.; LOWEN, C.; KLEBER, M.; MCCONNELL, J.; JUNG, L.; GOLDSMITH, L. Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 21-26, January 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://pen.sagepub.com/content/27/1/21.abstract> >. Acesso em: 12/10/2014.

MOREIRA, G. V. **Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteínas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmea**. 2011. 58 Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

MULS, E.; KOLANOWSKI, J.; SCHEEN, A.; VAN GAAL, L. The effects of orlistat on weight and on serum lipids in obese patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 11, p. 1713-21, Nov 2001. Acesso em: 12/10/2015.

PEREZ-JIMENEZ, F.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G.; BADIMON, L.; BARJA, G.; BATTINO, M.; BLANCO, A.; BONANOME, A.; COLOMER, R.; CORELLA-PIQUER, D.; COVAS, I.; CHAMORRO-QUIROS, J.; ESCRICH, E.; GAFORIO, J. J.; GARCIA LUNA, P. P.; HIDALGO, L.; KAFATOS, A.; KRIS-ETHERTON, P. M.; LAIRON, D.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; LOPEZ-MIRANDA, J.; LOPEZ-SEGURA, F.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; MATA, P.; MATAIX, J.; ORDOVAS, J.; OSADA, J.; PACHECO-REYES, R.; PERUCHO, M.; PINEDA-PRIEGO, M.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; SOLFRIZZI, V.; SORIGUER-ESCOFET, F.; DE LA TORRE-FORNELL, R.; TRICHOPOULOS, A.; VILLALBA-MONTORO, J. M.;

VILLAR-ORTIZ, J. R.; VISIOLI, F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 7, p. 421-424, 2005. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-22244490340&partnerID=40&md5=1c022080bc565465462f83ddf141b2e1> >. Acesso em: 20/06/2016.

PETRAUSKAITE, V.; DE GREYT, W.; KELLENS, M.; HUYGHEBAERT, A. Physical and chemical properties of trans-free fats produced by chemical interesterification of vegetable oil blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 489-493, 1998. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-998-0252-z> >. Acesso em: 05/08/2013.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937-946, 3/15/ 2009. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295208007776> >. Acesso em: 12/10/2015.

SALES-CAMPOS, H.; SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; SILVA, J. S. D.; CARDOSO, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013. ISSN 1389-5575. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/234029752\\_An\\_Overview\\_of\\_the\\_Modulatory\\_Effects\\_of\\_Oleic\\_Acid\\_in\\_Health\\_and\\_Disease](https://www.researchgate.net/publication/234029752_An_Overview_of_the_Modulatory_Effects_of_Oleic_Acid_in_Health_and_Disease) >. Acesso em: 15/05/2016.

SCHEEN, A. J.; LUYCKX, F. H. Obesity and liver disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 703-716, 2002. ISSN 1521-690X.

SNIDERMAN, A. D.; FURBERG, C. D.; KEECH, A.; VAN LENNEP, J. E. R.; FROHLICH, J.; JUNGNER, I.; WALLDIUS, G. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. **The Lancet**, v. 361, n. 9359, p. 777-780, 2003. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603126633> >. Acesso em: 02/10/2015.

TURLIN, B.; MENDLER, M. H.; MOIRAND, R.; GUYADER, D.; GUILLYGOMARC'H, A.; DEUGNIER, Y. Histologic Features of the Liver in Insulin Resistance-Associated Iron Overload. **A Study of 139 Patients**, v. 116, n. 2, p. 263-270, 2001. Disponível em: < <http://ajcp.oxfordjournals.org/content/ajcpath/116/2/263.full.pdf> >. Acesso em: 12/10/2015.

VALENZUELA, B. R.; TAPIA, O. G.; GONZÁLEZ, E. M.; VALENZUELA, B. A. Ácidos grasos omega-3 (epa y dha) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. **Revista chilena de nutrición**, v. 38, p. 356-367, 2011. ISSN 0717-7518. Disponível em: < [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182011000300011&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182011000300011&nrm=iso) >. Acesso em: 12/10/2015.

WEBB, D. R.; PETERS, J. C.; JAMDACEK, R. J.; FORTIER, N. E. Caprenin 2 - Short-term safety and metabolism in rat and hamsters. **International Journal of Toxicology**, v. 10, p. 341 - 356, 1991.

WEBB, D. R.; WOOD, F. E.; BERTRAM, T. A.; FORTIER, N. E. A 91-day feeding study in rats with caprenin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 935-946, 1993. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027741218&partnerID=40&md5=9d93f8670c4e691345f06766a5d48d8b> >. Acesso em: 10/04/2015.

WHO - World Health Organization. Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev*; 53(7):202-5, 1995.

YOSHIDA, R.; AOYAMA, T.; YAMAMOTO, T. Absorption of mono-saturated long-chain di-middle-chain triglyceride. **Digest Absorpt**, v. 14, p. 27 - 30, 1991.

## 6. ANEXO

### Anexo 1. Aprovação do comitê de ética



**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA**



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** Síntese enzimática de lipídios de baixo valor calórico enriquecidos com óleo de crambe hidrogenado: "ensaio in vivo"

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Profa. Dra. Alessandra Gambero

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 001.02.2015

**IP. CIUCA:** 200.225.122.34

**CIAEP/CONCEA N°:** 01.0226.2014

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

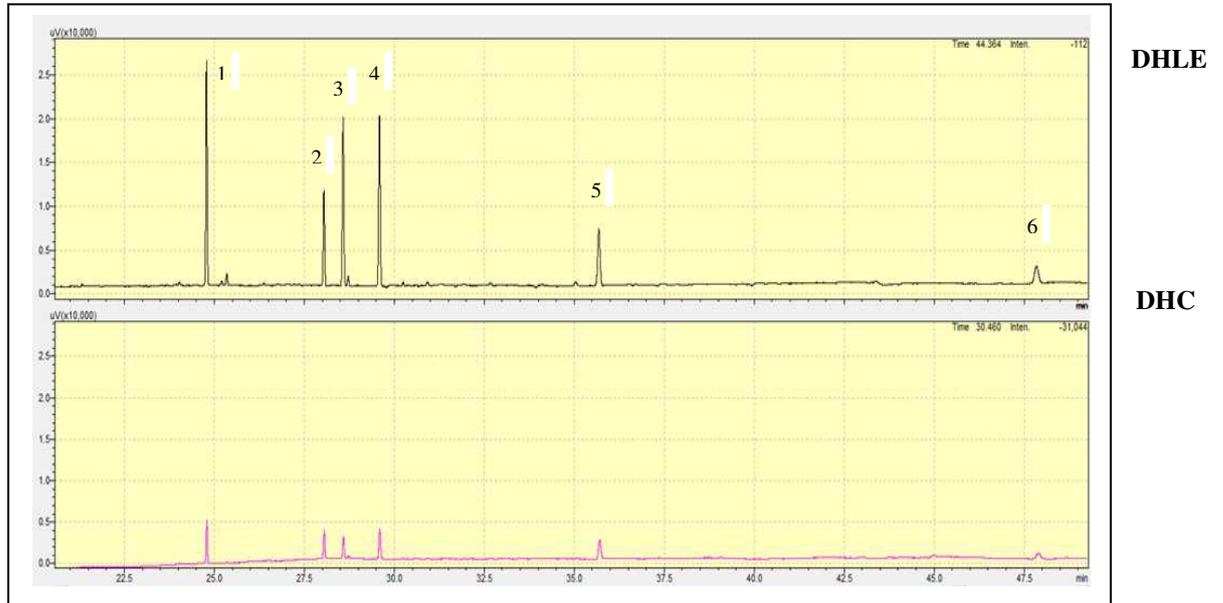
O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa- CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 26/02/2015 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

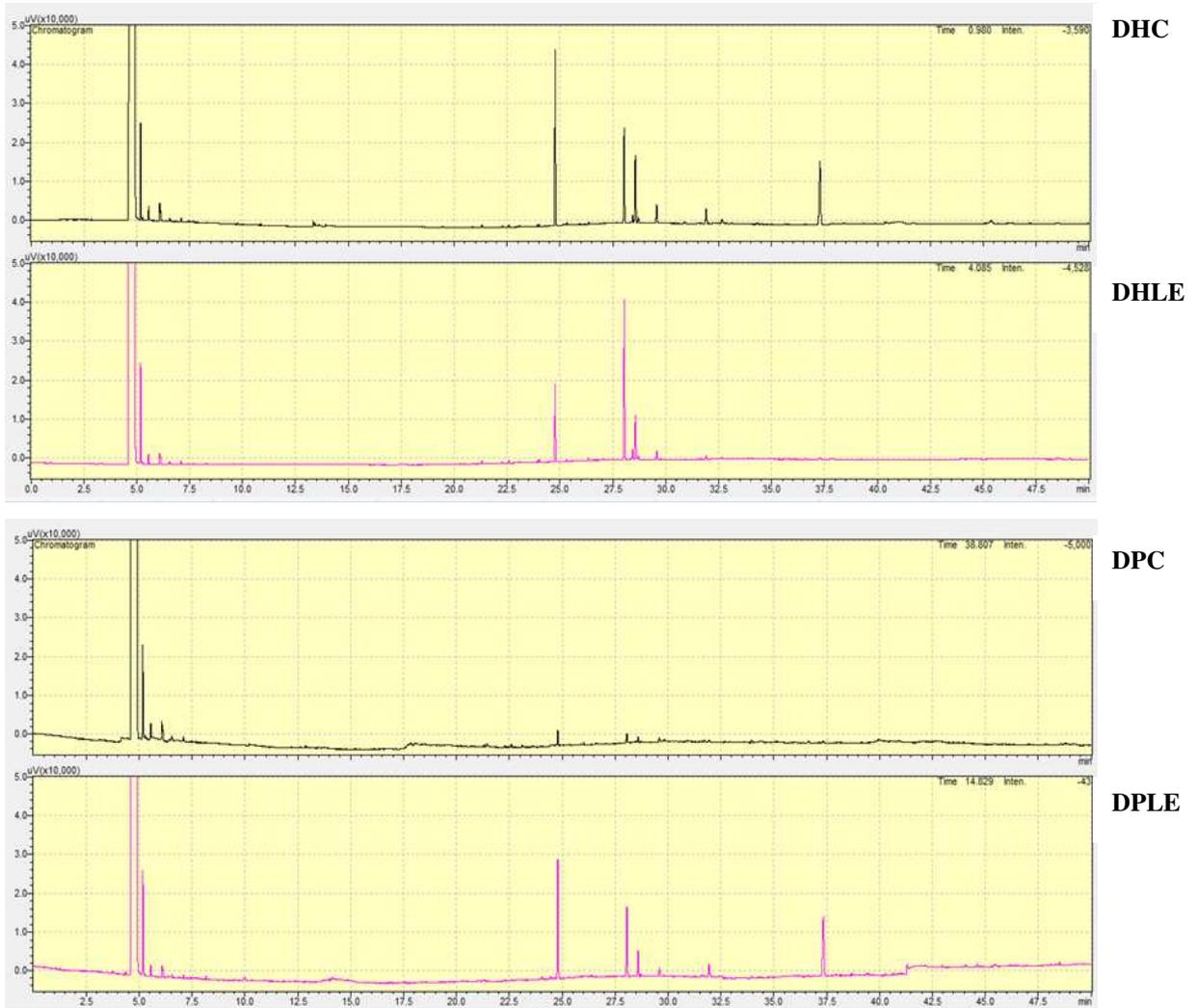
**Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini**  
**Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa**  
**Universidade São Francisco**

**Anexo 2.** Cromatograma do perfil lipídico do fígado dos animais que consumiram as dietas hiperlipídica controle (DHC) e hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE).



1- Ac. Palmítico; 2- Ac. Estearico; 3- Ac. Oléico; 4- Ac. Linoléico; 5- Ac. Araquidônico; 6- Ac. Docosahexaenoico (DHA)

**Anexo 3.** Cromatograma do perfil lipídico das fezes dos animais que consumiram as dietas padrão controle (DPC), padrão adicionada de lipídio estruturado (DPLE), Dieta hiperlipídica controle (DHC) e dieta Hiperlipídica de lipídio estruturado (DHLE).



## DISCUSSÃO GERAL

A mistura de azeite de oliva com óleo de crambe totalmente hidrogenado (OC) apresentou mais ácidos graxos monoinsaturados e saturados, provenientes dos ácidos oléico e behênico, respectivamente. A mistura óleo de soja com óleo de crambe totalmente hidrogenado (SC) apresentou quantidades semelhantes de monoinsaturados e saturados e uma quantidade elevada de poli-insaturados, principalmente linoléico. Já a mistura das três matérias-primas (OSC) apresentou uma quantidade intermediária das 3 classes de ácidos graxos quando comparada com as misturas OC e SC, sobressaindo os ácidos graxos monoinsaturados (oléico).

Após a reação de interesterificação verificou-se que a quantidade de triacilgliceróis permaneceu maior do que as de mono- e diacilgliceróis, indicando que houve a hidrólise seguida de esterificação tanto para a reação catalisada com a lipase Lipozyme TL IM como com *Rhizopus* sp. Quanto ao comportamento térmico, todas as misturas antes e após a interesterificação com Lipozyme TL IM apresentaram dois picos de cristalização, caracterizados por seu retorno à linha base. As misturas simples foram caracterizadas pela presença de TAGs trissaturados e dissaturados com ácidos graxos de cadeia longa no primeiro pico, e TAGs de ponto de fusão intermediários no segundo. Já as misturas interesterificadas não apresentaram o primeiro pico referente aos TAGs tri e dissaturados, devido à redistribuição dos ácidos graxos, entretanto apresentaram também dois picos referentes aos novos TAGs formados. Essa modificação levou a diminuição no teor de sólidos e aumento no tempo de indução, ou seja, as misturas ficaram mais líquidas, precisando de mais tempo para a formação de um núcleo estável de tamanho crítico, devido à redução do conteúdo de TAG di e trissaturados (saturado-saturado-insaturado; saturado-saturado-saturado).

As duas enzimas, Lipozyme TL IM e *Rhizopus* sp., provocaram modificações nas três misturas simples (OC, SC e OSC). No entanto, escolheu-se a combinação de azeite de oliva, óleo de soja e crambe totalmente hidrogenado, por conter um perfil de ácidos graxos equilibrado entre saturados (Ac. Behênico), monoinsaturados e poli-insaturados, para determinar a especificidade das enzimas.

A lipase de Lipozyme TL IM atuou de modo aleatório nas três posições (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) tentando randomizar as quantidades dos 3 grupos, perdendo sua especificidade nas condições testadas neste trabalho. No entanto, a lipase de *Rhizopus* sp. apresentou especificidade na posição *sn*-1,3, porém mais nos TAGs provindos do óleo de soja e do azeite de oliva, do que no de óleo de crambe totalmente hidrogenado, produzindo mais

monoacilgliceróis contendo ácidos graxos insaturados e nenhum saturado na posição *sn-2*, indicando baixa especificidade desta enzima para esta posição. A ausência de ácidos graxos saturados na posição *sn-2*, pode ser explicada pela instabilidade química das moléculas 1,2(2,3) diacilglicerol e 2 monoacilglicerol, durante a atuação da lipase *sn-1,3*, que provocou a isomerização espontânea, ocorrendo hidrólise de acordo com Macrae e Hammond (1985). A não especificidade da lipase Lipozyme TL IM pode ter sido provocada pela migração acil da posição *sn-2* para as posições *sn-1* ou *sn-3*, ou o oposto, ocorrendo do mesmo modo e até que o equilíbrio dinâmico fosse alcançado. A razão para esta migração é a existência de acilgliceróis parciais, especialmente diacilgliceróis, que são intermediários necessários e inevitáveis.

Analisando a atuação das enzimas, verifica-se que a lipase de *Rhizopus sp.* atuou inserindo o ácido behênico nas posições *sn-1* e *sn-3*, e os ácidos insaturados na posição *sn-2*. A Lipozyme TL IM atuou posicionando o ácido behênico e os ácidos graxos insaturados na mesma proporção nas três posições do TAG. O que também é interessante, pois a inibição da lipase é parcial e não total, ou seja, uma parte do lipídio será absorvida e outra parte não, e de qualquer forma a Lipozyme TL IM adicionou ácido behênico nas posições *sn-1* e *sn-3* e insaturados na posição *sn-2*. Além disso, o ácido behênico na posição *sn-2*, pode aumentar a capacidade de inibição, uma vez que a não absorção do monoacilglicerol impede a absorção de outros ácidos graxos, pela não formação dos quilomícrons (BERRY, 2009). Assim, podemos notar que os dois LEs possuem capacidade tanto de inibição da lipase pancreática, como para a absorção dos lipídios insaturados. Entretanto, para a continuação do estudo, a lipase escolhida foi a Lipozyme TL IM por ser um produto comercial, produzido pela empresa Novozymes na forma imobilizada.

Em relação à composição de triacilgliceróis, a interesterificação da mistura OSC com Lipozyme TL IM formou novos TAGs monossaturados pela dissociação dos TAGs tri e dissaturados e sua redistribuição com outros ácidos graxos, principalmente o oléico provindo do azeite de oliva e o linoléico do óleo de soja. Isso explica os eventos de cristalização por DSC, pois o desaparecimento do primeiro pico da mistura simples após a interesterificação coincide com o desaparecimento dos TAGs 62 e 66; e o aumento da extensão do primeiro novo pico se dá pelo aumento dos grupos 58 e 56 e o segundo novo pico continua com o grupo 54, o qual sofreu pequenas modificações. Esses resultados também justificam as mudanças nas características físico-químicas tais como o baixo ponto de fusão, baixo teor de sólidos e o surgimento de uma consistência semissólida à temperatura ambiente observada a

olho nu no laboratório durante as análises, bem diferente da mistura simples, e de suas matérias-primas individuais.

A rede microestrutural da mistura OSC também sofreu modificações com a reação de interesterificação catalisada pela Lipozyme TL IM. A quantidade de matriz líquida composta pelo óleo de soja e pelo azeite de oliva diminui as barreiras físicas que impedem o crescimento dos cristais (RODRIGUES-RACT *et al.*, 2010), e após a reação de interesterificação se torna mais acentuada, ocasionando a diminuição do número, com correspondente aumento do diâmetro dos cristais. Isto pode ser explicado pela redistribuição do ácido behênico do óleo de crambe totalmente hidrogenado com outros ácidos, principalmente oléico e linoléico, dos óleos de oliva e soja, respectivamente. Os esferulitos observados foram caracterizados por cristais com núcleo compacto, cercado de agulhas longas e finas distribuídas radialmente, na mistura simples; e esferulitos de pequenos núcleos cercados de cristais orientados aleatoriamente, nos lipídios estruturados (BERGER, JEWELL e POLLITT, 1979).

Com a caracterização do LE concluída, fez-se um estudo da cinética de produção catalisada pela Lipozyme TL IM em diferentes proporções. Observou que para produzir o LE o melhor tempo foi oito horas de reação utilizando 5% de Lipozyme TL IM, pois foi o menor tempo com a menor quantidade de enzima que foi capaz de hidrolisar os TAGs tri e dissaturados e redistribuí-los para obter uma reação completa.

Após a produção, fez-se um estudo *in vivo* para avaliar as propriedades antiobesidade do LE de OSC. Os animais consumiram as seguintes dietas: padrão controle (DPC), padrão contendo lipídio estruturado (DPLE), hiperlipídica controle (DHC) e hiperlipídica contendo LE (DHLE).

A adição do LE teve efeito tanto na dieta padrão como na dieta hiperlipídica, fazendo com que os animais não engordassem, mesmo consumindo uma quantidade igual ou superior de ração e conseqüentemente de lipídios, do que os demais. Podemos observar que na oitava semana os animais que consumiram a DHC apresentaram ganho significativo de peso, enquanto os que consumiram DHLE apresentaram pesos semelhantes aos animais que receberam a DPC e a DPLE. Entretanto, não apresentaram diferença significativa em relação à avaliação da homeostase glicêmica, provavelmente pelo tempo que os animais foram submetidos à DHC (8 semanas).

O gasto energético, o consumo de O<sub>2</sub> e a produção de CO<sub>2</sub> foram semelhantes para todas as dietas, implicando que o LE não aumenta ou altera o metabolismo energético dos animais. Também foi verificado que os animais que consumiram LE em valores normais ou em excesso, em relação ao controle, mantiveram a mesma adiposidade observada para os

animais que consumiram a DPC, não apresentando diferença significativa no acúmulo de gordura no fígado e no músculo gastrocnêmio. Isto pode ser explicado pelo aumento da excreção dos lipídios totais nas fezes dos animais, onde os que consumiram DHLE, excretaram quatro vezes mais lipídios do que o controle, e os que consumiram DPLE, excretaram três vezes mais lipídios nas fezes do que os controles, sendo que os ácidos graxos foram excretados de forma geral, conforme o perfil da dieta. Os ácidos graxos que predominaram nas fezes dos animais foram o ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico, com diferença do ácido behênico para os animais que consumiram a dieta contendo LE e ácidos graxos traços para os que se alimentaram com a dieta hiperlipídica. Os animais eliminaram nas fezes mais ácidos graxos saturados do que insaturados, independente do tipo de ração consumida. No entanto, durante o experimento, os animais não apresentaram diarreia, inferindo que não houve toxicidade na quantidade consumida.

A adição do LE na dieta não promoveu acúmulo de gordura nos hepatócitos dos animais, portanto não causou injúrias e nem perturbações metabólicas no fígado, apesar do peso do fígado não diferir entre os grupos experimentais. Todavia, os animais que ingeriram DHC apresentaram esteatose macro e microvesicular (Grau 2 =  $41,8\% \pm 2,7$ ) no fígado.

A diminuição da absorção dos lipídios ingeridos na dieta pelo LE, não afetou de forma negativa o metabolismo dos lipídios no fígado dos animais, pelo contrário, aumentou os níveis de ácidos graxos necessários (Ac. Araquidônico e Ac. Docohexaenóico) para um melhor funcionamento do organismo. Além disso, a proporção de ácido graxo  $\omega 6/\omega 3$  no lipídio estruturado foi de  $27,8\%:3,0\%$  ou  $9,3:1$ , o qual está dentro da recomendação da WHO/FAO, onde a razão recomendada é de 5 a 10 unidades de  $\omega 6$  para 1 unidade de  $\omega 3$ . Assim, a quantidade de ácidos graxos insaturados, tanto PUFA como MUFA, melhoraram o perfil lipoproteico no sangue dos animais que consumiram LE, aumentando os níveis de HDL-c e diminuindo os níveis de colesterol total e de LDL-c, e conseqüentemente o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Dessa forma, o lipídio estruturado, contendo ácidos graxos saturados e insaturados de forma randomizada na cadeia do glicerol, provenientes das misturas do azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado e sintetizado pela lipase Lipozyme TL IM, apresentou efeitos antiobesidade, provenientes da eliminação parcial dos lipídios totais nas fezes e a absorção da quantidade necessária de ácidos graxos essenciais para o funcionamento normal do organismo dos animais.

## CONCLUSÃO GERAL

Foi possível obter um lipídio estruturado de baixo valor calórico a base de azeite de oliva, óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado, com características físico-químicas diferenciadas da mistura simples dos óleos e que apresentasse efeitos antiobesidade sem comprometer a absorção dos ácidos graxos essenciais.

## SUGESTÕES

Para projetos futuros sugere-se:

- ✓ Testes com camundongos obesos para saber se o LE consegue reverter à obesidade e se reverter, em quanto tempo e qual a quantidade.
- ✓ Fazer um estudo com humanos, adicionando o LE na forma de capsulas ou de azeite na dieta, para saber se o resultado condiz com o experimento.
- ✓ Estudar se existe correlação entre aumento de excreção fecal e um melhor funcionamento do transito intestinal.
- ✓ Verificar se o efeito do LE no organismo é acumulativo ou temporário.
- ✓ Verificar se o LE modifica a microbiota do intestino de animais obesos e/ou eutróficos e se isso contribui na melhora no quadro da síndrome metabólica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO – Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. Quase 60% dos brasileiros estão acima do peso, revela IBGE. (2015). Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/noticia/quase-60-dos-brasileiros-estao-acima-do-peso-revela-pesquisa-do-ibge>> Acessado em: 06/05/2016

ACEDO, S. C.; CARIA, C. R.; GOTARDO, E. M.; PEREIRA, J. A.; PEDRAZZOLI, J.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A. Role of pentoxifylline in non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obesity in mice. **World J Hepatol**, v. 7, n. 24, p. 2551-8, Oct 28 2015.

AKOH, C. C. New Developments in low calorie fats and oils substitutes **Journal of Food Lipids**, v. 3, n. 4, p. 223-232, 1996. ISSN 1745-4522. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.1996.tb00070.x>>. Acesso em: 06/03/2016.

ALMEIDA, M. E. F. D.; QUEIROZ, J. H. D.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. Lipídeos séricos e morfologia hepática de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas (óleo de soja, gordura de peixe e porco, margarina e manteiga). **Revista de Nutrição**, v. 24, p. 143-152, 2011. ISSN 1415-5273. Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732011000100014&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732011000100014&nrm=iso) >. Acesso em: 11/10/2014.

AMBIEL, H. C. I. **Desenvolvimento de hardfat à base de óleo de algodão e óleo de crambe totalmente hidrogenado pra aplicação em spread de chocolate**. 2013. 84 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

ANTONIOSI FILHO, N. R.; MENDES, O. L.; LANÇAS, F. M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, v. 40, n. 9, p. 557-562, 1995. ISSN 1612-1112. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02290268> >. Acesso em: 10/04/2014.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Society, 2009.

ARISHIMA, T.; TACHIBANA, N.; KOJIMA, M.; TAKAMATSU, K.; IMAIZUMI, K. Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. **Journal of Food Lipids**, v. 16, n. 1, p. 72-88, 2009. ISSN 1745-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2009.01133.x> >. Acesso em: 06/05/2015.

ARISHIMA, T.; TSUJII, S.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; SAGI, N.; IMAIZUMI, K.; OKUDA, H. Suppressive effect of 1-behenoyl-2,3-dioleoyl-rac-glycerol (BOO) on postprandial serum triacylglycerol elevation. **Japanese Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 1069 - 1075, 2007. ISSN 03863603. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-36849074143&partnerID=40&md5=59280e10d88cb151252ceaf034284cc0> >. Acesso em: 06/05/2015.

BANDARRA, N. M.; LOPES, P. A.; MARTINS, S. V.; FERREIRA, J.; ALFAIA, C. M.; ROLO, E. A.; CORREIA, J. J.; PINTO, R. M. A.; RAMOS-BUENO, R. P.; BATISTA, I.; PRATES, J. A. M.; GUIL-GUERRERO, J. L. Docosahexaenoic acid at the sn-2 position of structured triacylglycerols improved n-3 polyunsaturated fatty acid assimilation in tissues of hamsters. **Nutrition Research**, v. 36, n. 5, p. 452-463, 5// 2016. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027153171500322X> >.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 646-656, 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500017&nrm=iso) >. Acesso em: 04/04/2016.

BEBARTA, B.; M, J.; KOTASTHANE, P.; SUNKIREDDY, Y. R. Medium chain and behenic acid incorporated structured lipids from sal, mango and kokum fats by lipase acidolysis. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 889-894, 1/15/ 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612013350> >.

BERGER, K. G.; JEWELL, G. G.; POLLITT, R. J. M. **Em Food microscopy**; Vaughan, JG, ed: Academic Press: London 1979.

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 01, p. 3-17, 2009. ISSN 1475-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0954422409369267> >. Acesso em: 12/05/2015.

BONORA, E.; MANICARDI, V.; ZAVARONI, I.; COSCELLI, C.; BUTTURINI, U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. **Diabete Metab**, v. 13, n. 2, p. 116-21, Apr 1987. ISSN 0338-1684.

BRASIL. **Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** SAÚDE, S. D. V. E. e SAÚDE, M. D. Brasília: 120 p. 2014.

BUSNELLO, F. M.; SANTOS, Z. E. D. A.; PONTIN, B. Chapter 20 - Lipids and Metabolic Syndrome A2 - Watson, Ronald Ross. In: MEESTER, F. D. (Ed.). **Handbook of Lipids in Human Function**: AOCs Press, 2016. p.543-556. ISBN 978-1-63067-036-8.

CAMARGO, A. C. D.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MANSI, D. N.; DOMINGUES, M. A. C.; ARTHUR, V. Efeitos da radiação gama na cor, capacidade antioxidante e perfil de ácidos graxos em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, p. 11-15, 2011. ISSN 0101-2061. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612011000100002&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000100002&nrm=iso) >. Acesso em: 02/06/2016.

CAO, H.; GERHOLD, K.; MAYERS, J. R.; WIEST, M. M.; WATKINS, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 933-944, 9/19/ 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408010143> >. Acesso em: 04/06/2016.

CAO, Y.; QI, S.; ZHANG, Y.; WANG, X.; YANG, B.; WANG, Y. Synthesis of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification of triacetin with camellia oil methyl esters and preliminary evaluation of their plasma lipid-lowering effect in mice. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3733-44, 2013. ISSN 1420-3049.

CHAN, H. L. Y.; DE SILVA, H. J.; LEUNG, N. W. Y.; LIM, S. G.; FARRELL, G. C. How should we manage patients with non-alcoholic fatty liver disease in 2007? **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 22, n. 6, p. 801-808, 2007. ISSN 1440-1746.

CHIURCHIÙ, V.; MACCARRONE, M. Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 29, p. 54-62, 2016. ISSN 1471-4892.

CINTRA, D.; ROPOLLE, E.; PAULI, J. Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular. **São Paulo: Sarvier**, 2011.

CLAUSS, J. Interesterificação de óleo de palma. **Óleos & Grãos**, v. 5, p. 31-37, 1996.

CODEX. **Codex Standard for olive oils and olive pomace oils - CODEX STAN 33, 1981.** Codex Alimentarius - FAO/WHO 2003.

\_\_\_\_\_. **Codex Standards for named vegetable oils - CODEX STAN 210, 1999.** FAO/WHO, C. A.-. 2005.

COSTA, V. D. S. R. D. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de lipase de uma nova linhagem de Rhizopus Sp.** 1997. 78 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 345-354, 2002. ISSN 1516-9332. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322002000300010&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000300010&nrm=iso) >.

DA SILVA, R. C.; SOARES, F. A. S. D. M.; FERNANDES, T. G.; CASTELLS, A. L. D.; DA SILVA, K. C. G.; GONÇALVES, M. I. A.; MING, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; GIOIELLI, L. A. Interesterification of Lard and Soybean Oil Blends Catalyzed by Immobilized Lipase in a Continuous Packed Bed Reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 12, p. 1925-1933, 2011. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-011-1869-x> >.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema.** 4<sup>o</sup> edição. Porto Alegre/RS: Artmed Editora, 2010. ISBN 8536323345.

DE LEEUW VAN WEENEN, J. E.; HU, L.; JANSEN-VAN ZELM, K.; DE VRIES, M. G.; TAMSMA, J. T.; ROMIJN, J. A.; PIJL, H. Four weeks high fat feeding induces insulin resistance without affecting dopamine release or gene expression patterns in the hypothalamus of C57Bl6 mice. **Brain Research**, v. 1250, p. 141-148, 2009. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899308027340> >. Acesso em: 20/11/2014.

DE MARTINI SOARES, F. A. S.; OSORIO, N. M.; DA SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA-DIAS, S. Batch and continuous lipase-catalyzed interesterification of blends containing olive oil for trans-free margarines. **European journal of lipid science and technology**, v. 115, n. 4, p. 413-428, 2013. ISSN 1438-9312.

DECKER, E. A. The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 4 I, p. 108-110, 1996. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030035305&partnerID=40&md5=a8283b2e708d15e43bb901c110e65588> >.

DEL RE, A. C.; FRAYNE, S. M.; HARRIS, A. H. S. Antiobesity medication use across the veterans health administration: Patient-level predictors of receipt. **Obesity**, v. 22, n. 9, p. 1968-1972, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906940229&partnerID=40&md5=f7f1a16375a66cccab96dcd863b5d5b5> >. Acesso em: 04/06/2016.

DIENER, J. R. C. Calorimetria indireta. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 245-253, 1997. ISSN 0104-4230. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000300013&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000300013&nrm=iso) >. Acesso em: 02/06/2015.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, 2000.

DOS SANTOS COSTA, M. N. F.; MUNIZ, M. A. P.; NEGRÃO, C. A. B.; DA COSTA, C. E. F.; LAMARÃO, M. L. N.; MORAIS, L.; SILVA JÚNIOR, J. O. C.; RIBEIRO COSTA, R. M. Characterization of Pentaclethra macroloba oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2269-2275, 2014. ISSN 1588-2926. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-012-2896-z> >.

DRENT, M. L.; VAN DER VEEN, E. A. First clinical studies with orlistat: a short review. **Obesity research**, v. 3 Suppl 4, p. 623S-625S, 1995. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029398377&partnerID=40&md5=01412cc65a18fa3c321d52e772f10150> >.

ECKERSLEY, R. M. Losing the battle of the bulge: causes and consequences of increasing obesity. **Med J Aust**, v. 174, n. 11, p. 590-2, Jun 4 2001. ISSN 0025-729x.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF, O. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1388-1402, 2016. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827815007345> >.

FARMANI, J.; SAFARI, M.; HAMED, M. Application of palm olein in the production of zero-trans Iranian vanaspati through enzymatic interesterification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 8, p. 636-643, 2006. ISSN 1438-9312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200600025> >.

FEDDERN, V. **Produção de lipídios funcionais por ação de lipase fúngica**. 2010. 205 Tese (Doutorado). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/content/18/6/499.abstract> >. Acesso em: 23/07/2015.

GAMBOA, O. W. D.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 646, 2006. ISSN 0100-4042.

GILABERT-ESCRIVÁ, M. V.; GONÇALVES, L. A. G.; SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of

Brazilian Amazonian Theobroma species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 13, p. 1425-1431, 2002. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1107> >. Acesso em: 03/10/2016.

GILMORE, L. A.; WALZEM, R. L.; CROUSE, S. F.; SMITH, D. R.; ADAMS, T. H.; VAIDYANATHAN, V.; CAO, X.; SMITH, S. B. Consumption of High-Oleic Acid Ground Beef Increases HDL-Cholesterol Concentration but Both High- and Low-Oleic Acid Ground Beef Decrease HDL Particle Diameter in Normocholesterolemic Men. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1188-1194, 2011. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/141/6/1188.abstract> >. Acesso em: 05/04/2016.

GOLDBERG, I. **Functional foods - designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: 1994.

GUEDES, A. M. M. **Gordura plástica obtida a partir de óleo de soja e óleo de Crambe abyssinica (Hochst)** 2011. 125 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

GUEDES, A. M. M.; MING, C. C.; RIBEIRO, A. P. B.; DA SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Physicochemical Properties of Interesterified Blends of Fully Hydrogenated Crambe abyssinica Oil and Soybean Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 111-123, 2014. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2360-7> >. Acesso em: 05/04/2016.

HAN, L.; XU, Z.; HUANG, J.; MENG, Z.; LIU, Y.; WANG, X. Enzymatically catalyzed synthesis of low-calorie structured lipid in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12635-12642, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-83055179044&partnerID=40&md5=ab64f56074180bbb83fc1712e187ab48> >. Acesso em: 05/04/2016.

HAN, L. K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. **International Journal of Obesity**, v. 23, n. 2, p. 174-179, 1999. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032938437&partnerID=40&md5=9f67f75efdf4f1715f1c04eab0b1f0> >. Acesso em: 12/10/2014.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Pract**, v. 22, n. 6, p. 475-6 passim, Jul 1973. ISSN 0023-6853.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 129-140, 10/4/ 2000. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S13811177000120X> >. Acesso em: 05/04/2016.

JANDACEK, R. J.; HOLLENBACH, E. J.; KUEHLTHAU, C. M.; STEIMLE, A. R. Effects of dietary behenate and a caprenin-like fat on lipids in the hamster. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 243-249, 4// 1993. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0955286393900596> >. Acesso em: 10/04/2015.

JEBB, S. A.; PRENTICE, A. M. Assessment of human energy balance. **J Endocrinol**, v. 155, n. 2, p. 183-5, Nov 1997. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/155/2/183.short> >. Acesso em: 12/10/2014.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 273-278, 2001. ISSN 0308-8146.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380258/> >. Acesso em: 06/03/2016.

KANJILAL, S.; KAKI, S. S.; RAO, B. V. S. K.; SUGASINI, D.; RAO, Y. P.; PRASAD, R. B. N.; LOKESH, B. R. Hypocholesterolemic effects of low calorie structured lipids on rats and rabbits fed on normal and atherogenic diet. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 259-265, 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612012319> >. Acesso em: 05/04/2014.

KANJILAL, S.; PRASAD, R. B.; KAIMAL, T. N.; GHAFORUNISSA; RAO, S. H. **Synthesis and estimation of calorific value of a structured lipid-potential reduced calorie fat**. 1999. 1045-55 ISBN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.biomedsearch.com/nih/Synthesis-estimation-calorific-value-structured/10580332.html> >.

KANJILAL, S.; SHANKER, K. S.; RAO, B. V. S. K.; INDRANI, D.; REDDY, S. R. Y.; PRASAD, R. B. N.; LOKESH, B. R. Application of low calorie hypocholesterolemic structured lipid as potential bakery fat. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 854-859, 2016. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84960896071&partnerID=40&md5=71f1696bd803bd8377d02cf82b36c456> >. Acesso em: 10/04/2014.

KHOSLA, P.; SUNDRAM, K. Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. **Progress in Lipid Research**, v. 35, n. 2, p. 93-132, 1996. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163782795000143> >. Acesso em: 12/10/2014.

KLEIN, S.; BURKE, L. E.; BRAY, G. A.; BLAIR, S.; ALLISON, D. B.; PI-SUNYER, X.; HONG, Y.; ECKEL, R. H. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: Endorsed by the American College of Cardiology Foundation. **Circulation**, v. 110, n. 18, p. 2952-2967, 2004. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/110/18/2952.long> >. Acesso em: 12/10/2014.

KOJIMA, M.; ARISHIMA, T.; SHIMIZU, R.; KOHNO, M.; KIDA, H.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. The consumption of a structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids increases fecal fat excretion in humans. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 12, p. 997-1001, 2013. ISSN 13458957. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84888633646&partnerID=40&md5=0aae616c88e0277b0179a5effda6be37> >. Acesso em: 10/04/2014.

KOJIMA, M.; TACHIBANA, N.; YAMAHIRA, T.; SEINO, S.; IZUMISAWA, A.; SAGI, N.; ARISHIMA, T.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. Structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids suppresses triacylglycerol absorption and prevents obesity in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 1, p. 77, 2010. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.lipidworld.com/content/9/1/77> >. Acesso em: 10/04/2014.

KUBOW, S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 10, p. 530-541, 1996. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286396001064> >. Acesso em: 12/10/2014.

LIAO, F.-H.; LIOU, T.-H.; SHIEH, M.-J.; CHIEN, Y.-W. Effects of different ratios of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids on regulating body fat deposition in hamsters. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 811-817, 2010. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900709004018> >. Acesso em: 10/08/2015.

LIVESEY, G. The absorption of stearic acid from triacylglycerols: an inquiry and analysis. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 02, p. 185-214, 2000. ISSN 1475-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1079/095442200108729061> >. Acesso em: 04/05/2016.

LOPES, T. I. B. **Avaliação do perfil de ácidos graxos em pacientes com sobrepeso tratados com orlistate usando CG-EM e avaliação do perfil metabólico de plasma por RMN de 1H**. 2012. Dissertação (Mestrado). Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

LÓPEZ FARRÉ, A.; MACAYA, C. Utilidad terapéutica de los ácidos grasos omega-3 Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. **Revista Española de Cardiología Suplementos**, v. 6, n. 4, p. 31D-37D, 2006/01/01 2006. ISSN 1131-3587. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1131358706748245> >. Acesso em: 20/03/2016.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 595-607, 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500012&nrm=iso) >. Acesso em: 20/11/2014.

LOVEJOY, J. C.; BRAY, G. A.; LEFEVRE, M.; SMITH, S. R.; MOST, M. M.; DENKINS, Y. M.; VOLAUFOVA, J.; ROOD, J. C.; ELDRIDGE, A. L.; PETERS, J. C. Consumption of a controlled low-fat diet containing olestra for 9 months improves health risk factors in conjunction with weight loss in obese men: the Ole' Study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 27, n. 10, p. 1242-1249, //print 2003. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0802373> >. Acesso em: 10/08/2015.

LUNAGARIYA, N. A.; PATEL, N. K.; JAGTAP, S. C.; BHUTANI, K. K. Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 897-921, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

[84907660761&partnerID=40&md5=6d278cb43ceec4fa60b7dbf5e5933236](http://dx.doi.org/10.1590/S0044-5967201500049) >. Acesso em: 10/04/2015.

MACAMBIRA, L. M. A.; ANDRADE, C. H. S.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. D. A.; BRAZ FILHO, R. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste - *Lippia sidoides* Cham. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 449-452, 1988. ISSN 0044-5967. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59671988000500449&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59671988000500449&nrm=iso) >. Acesso em: 10/04/2015.

MACEDO, G. A.; PARK, Y. K.; PASTORE, G. M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 2, p. 90-95, 1997. ISSN 0001-3714.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 687-693, 2/25/ 2004. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203001535> >. Acesso em: 02/03/2013.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193-218, 1985. ISSN 0264-8725.

MARANGONI, A. G.; MCGAULEY, S. E. Relationship between Crystallization Behavior and Structure in Cocoa Butter. **Crystal Growth & Design**, v. 3, n. 1, p. 95-108, 2003/01/01 2003. ISSN 1528-7483. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cg0255801> >. Acesso em: 04/03/2016.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; BIANCHI, G.; TOMASSETTI, S.; BUGIANESI, E.; LENZI, M.; MCCULLOUGH, A. J.; NATALE, S.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1844-50, Aug 2001. ISSN 0012-1797. Acesso em: 12/10/2014.

MAZZA, G. **Functional foods - biochemical and processing aspects**. Lancaster: 1998.

MCCLAVE, S.; LOWEN, C.; KLEBER, M.; MCCONNELL, J.; JUNG, L.; GOLDSMITH, L. Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 21-26, January 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://pen.sagepub.com/content/27/1/21.abstract> >. Acesso em: 12/10/2014.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 48-67, 2008/10/27 2008. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701764245> >. Acesso em: 05/08/2014.

MOREIRA, G. V. **Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteínas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmea**. 2011. 58 Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

MOUNIKA, C.; YELLA REDDY, S. Specialty Fats Enriched with Behenic and Medium Chain Fatty Acids from Palm Stearin by Lipase Acidolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 9, p. 1691-1697, 2012. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-012-2059-1> >.

MU, H.; XU, X.; HØY, C.-E. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 9, p. 1187-1193, 1998. ISSN 0003-021X.

MULS, E.; KOLANOWSKI, J.; SCHEEN, A.; VAN GAAL, L. The effects of orlistat on weight and on serum lipids in obese patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 11, p. 1713-21, Nov 2001. Acesso em: 12/10/2015.

NO, D. S.; ZHAO, T.; KIM, B. H.; CHOI, H.-D.; KIM, I.-H. Enrichment of erucic acid from crambe oil in a recirculated packed bed reactor via lipase-catalyzed ethanolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, n. 0, p. 6-10, 3// 2013. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111771200269X> >. Acesso em: 18/01/2014.

NUNES, P. A.; PIRES-CABRAL, P.; FERREIRA-DIAS, S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 993-998, 8/1/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611001580> >.

NUNES, P. A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 265-268, 8/15/ 2012. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X1200174X> >.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils : formulating and processing for applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009. ISBN 9781420061666 1420061666.

OLEFSKY, J. M. Fat Talks, Liver and Muscle Listen. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 914-916, 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408011203> >. Acesso em: 10/03/2016.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 110-120, 2002. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00010.x> >.

PEREZ-JIMENEZ, F.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G.; BADIMON, L.; BARJA, G.; BATTINO, M.; BLANCO, A.; BONANOME, A.; COLOMER, R.; CORELLA-PIQUER, D.; COVAS, I.; CHAMORRO-QUIROS, J.; ESCRICH, E.; GAFORIO, J. J.; GARCIA LUNA, P. P.; HIDALGO, L.; KAFATOS, A.; KRIS-ETHERTON, P. M.; LAIRON, D.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; LOPEZ-MIRANDA, J.; LOPEZ-SEGURA, F.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; MATA, P.; MATAIX, J.; ORDOVAS, J.; OSADA, J.; PACHECO-REYES, R.;

PERUCHO, M.; PINEDA-PRIEGO, M.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; SOLFRIZZI, V.; SORIGUER-ESCOFET, F.; DE LA TORRE-FORNELL, R.; TRICHOPOULOS, A.; VILLALBA-MONTORO, J. M.; VILLAR-ORTIZ, J. R.; VISIOLI, F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 7, p. 421-424, 2005. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-22244490340&partnerID=40&md5=1c022080bc565465462f83ddf141b2e1> >. Acesso em: 20/06/2016.

PETERS, J. C.; LAWSON, K. D.; MIDDLETON, S. J.; TRIEBWASSER, K. C. Assessment of the Nutritional Effects of Olestra, a Nonabsorbed Fat Replacement: Introduction and Overview. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 8, p. 1539S-1546S, August 1, 1997 1997. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/127/8/1539S.abstract> >. Acesso em: 10/04/2015.

PETRAUSKAITE, V.; DE GREYT, W.; KELLENS, M.; HUYGHEBAERT, A. Physical and chemical properties of trans-free fats produced by chemical interesterification of vegetable oil blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 489-493, 1998. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-998-0252-z> >. Acesso em: 05/08/2013.

PITOL, C. **Tecnologia e produção: crambe** Fundação MS, 2010.

POLONINI, H. C.; GONÇALVES, K. M.; GOMES, T. B. B.; BRANDÃO, M. A. F.; CHAVES, M.; RAPOSO, N. R. B. Amazon native flora oils: in vitro photoprotective activity and major fatty acids constituents. **Rev Bras Farm**, v. 93, n. 1, p. 102-8, 2012. Acesso em: 18/05/2016.

QUEIROZ, J. C. F. D.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 582-594, 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500011&nrm=iso) >. Acesso em: 20/02/2016.

RIBEIRO, A. P. B.; BASSO, R. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; DOS SANTOS, A. O.; CARDOSO, L. P.; GUARALDO GONÇALVES, L. A. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1153-1162, 2009. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909001653> >. Acesso em: 14/09/2015.

RIBEIRO, A. P. B.; MOURA, J. M. L. N. D.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química Nova**, v. 30, p. 1295-1300, 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000500043&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000500043&nrm=iso) >. Acesso em: 10/05/2016.

RODRIGUES-RACT, J. N.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; SILVA, R. C. D.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de

gordura do leite e óleo de girassol. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 258-267, 2010. ISSN 0101-2061. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000100038&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000100038&nrm=iso) >. Acesso em: 10/04/2016.

RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, L.; MARTÍN, L.; JIMÉNEZ, M. J.; HITTA, E.; CASTILLO, B.; GONZÁLEZ, P. A.; ROBLES, A. Synthesis of 2-monoacylglycerols and structured triacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by enzyme catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 3, p. 148-155, 8/10/ 2012. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022912000750> >.

ROUSSEAU, D.; HILL, A. R.; MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 2. Microstructure and polymorphism. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 8, p. 973-981, 1996. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02523404> >. Acesso em: 14/09/2015.

ROY, H. J.; MOST, M. M.; SPARTI, A.; LOVEJOY, J. C.; VOLAUFOVA, J.; PETERS, J. C.; BRAY, G. A. Effect on body weight of replacing dietary fat with olestra for two or ten weeks in healthy men and women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 259-267, 2002. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036016084&partnerID=40&md5=dc7f34b0fb10d410046e9394063a3041> >. Acesso em: 10/04/2015.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937-946, 3/15/ 2009. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295208007776> >. Acesso em: 12/10/2015.

SALES-CAMPOS, H.; SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; SILVA, J. S. D.; CARDOSO, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013. ISSN 1389-5575. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/234029752\\_An\\_Overview\\_of\\_the\\_Modulatory\\_Effects\\_of\\_Oleic\\_Acid\\_in\\_Health\\_and\\_Disease](https://www.researchgate.net/publication/234029752_An_Overview_of_the_Modulatory_Effects_of_Oleic_Acid_in_Health_and_Disease) >. Acesso em: 15/05/2016.

SCHEEN, A. J.; LUYCKX, F. H. Obesity and liver disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 703-716, 2002. ISSN 1521-690X.

SILVA, R. C. D.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados por interesterificação química de banha e óleo de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 330-335, 2008. ISSN 0100-4042. Acesso em: 14/09/2015.

SILVA, R. C. D.; GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Química Nova**, v. 32, p. 1253-1261, 2009. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000500032&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000500032&nrm=iso) >. Acesso em: 14/09/2015.

SNIDERMAN, A. D.; FURBERG, C. D.; KEECH, A.; VAN LENNEP, J. E. R.; FROHLICH, J.; JUNGNER, I.; WALLDIUS, G. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. **The Lancet**, v. 361, n. 9359, p. 777-780, 2003. ISSN

0140-6736. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603126633>>. Acesso em:  
 02/10/2015.

SORENSEN, L. B.; CUETO, H. T.; ANDERSEN, M. T.; BITZ, C.; HOLST, J. J.; REHFELD, J. F.; ASTRUP, A. The effect of salatrim, a low-calorie modified triacylglycerol, on appetite and energy intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1163-1169, May 1, 2008. Disponível em: <  
<http://ajcn.nutrition.org/content/87/5/1163.abstract>>. Acesso em: 10/04/2015.

SPERANZA, P. **Production of special lipids by enzymatic interesterification of Amazonian oils and influence on the biological activity**. 2014. 156 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas/SP.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13-20, 1/20/ 2016. ISSN 0168-1656. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165615301966>>. Acesso em:  
 03/06/2016.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, CHARLES N. Resolvins, Specialized Proresolving Lipid Mediators, and Their Potential Roles in Metabolic Diseases. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 21-36, 1/7/ 2014. ISSN 1550-4131. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155041311300418X>>. Acesso em:  
 03/02/2016.

STEIN, J. Chemically defined structured lipids: current status and future directions in gastrointestinal diseases. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 14, n. 2, p. 79-85, 1999. ISSN 1432-1262. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s003840050190> >. Acesso em: 08/02/2016.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; LACH, M.; SZŁYK, E. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry studies of  $\beta'$ → $\beta$  transitions in fat mixtures. **Food chemistry**, v. 92, n. 1, p. 133-141, 2005. ISSN 0308-8146.

TIWARI, N. J.; SAWANT, S. B. Behenic acid esters: kinetics and properties. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 1, p. 30-35, 2005. ISSN 1438-9312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200401031> >. Acesso em: 10/04/2015.

TURLIN, B.; MENDLER, M. H.; MOIRAND, R.; GUYADER, D.; GUILLYGOMARC'H, A.; DEUGNIER, Y. Histologic Features of the Liver in Insulin Resistance–Associated Iron Overload. **A Study of 139 Patients**, v. 116, n. 2, p. 263-270, 2001. Disponível em: <  
<http://ajcp.oxfordjournals.org/content/ajcp/116/2/263.full.pdf>>. Acesso em: 12/10/2015.

TYNEK, M.; LEDÓCHOWSKA, E. STRUCTURED TRIACYLGLYCEROLS CONTAINING BEHENIC ACID: PREPARATION AND PROPERTIES. **Journal of Food Lipids**, v. 12, n. 1, p. 77-89, 2005. ISSN 1745-4522. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2005.00007.x>>.

VALENZUELA, B. R.; TAPIA, O. G.; GONZÁLEZ, E. M.; VALENZUELA, B. A. Ácidos grasos omega-3 (epa y dha) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. **Revista chilena de nutrición**, v. 38, p. 356-367, 2011. ISSN 0717-7518. Disponível em: < [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182011000300011&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182011000300011&nrm=iso) >. Acesso em: 12/10/2015.

VERA, R.; SOARES JUNIOR, M. S.; NAVES, R. V.; SOUZA, E. R. B. D.; FERNANDES, E. P.; CALIARI, M.; LEANDRO, W. M. Características químicas de amêndoas de barueiros (*dipteryx alata vog.*) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 112-118, 2009. ISSN 0100-2945. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452009000100017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452009000100017&nrm=iso) >. Acesso em: 11/05/2016.

VISTISEN, B.; MU, H.; HØY, C. E. Lymphatic recovery of exogenous oleic acid in rats on long chain or specific structured triacylglycerol diets. **Lipids**, v. 41, n. 9, p. 827-834, 2006. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33751210319&partnerID=40&md5=2e1d72252e72b07af632d4e4bd48eb19> >. Acesso em: 14/09/2015.

VLAHOV, G. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy to check 1,3-random, 2-random pattern of fatty acid distribution in olive oil triacylglycerols. **Spectroscopy**, v. 19, n. 2, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2005/765236> >. Acesso em: 05/05/2015.

WEBB, D. R.; PETERS, J. C.; JAMDACEK, R. J.; FORTIER, N. E. Caprenin 2 - Short-term safety and metabolism in rat and hamsters. **International Journal of Toxicology**, v. 10, p. 341 - 356, 1991.

WEBB, D. R.; SANDERS, R. A. Caprenin 1 - Digestion, absorption, and rearrangement in thoracic duct-cannulated rats. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 325-340, 1991. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025834588&partnerID=40&md5=15f0786b46549abfd7a4779fb5fb0c04> >. Acesso em: 10/04/2015.

WEBB, D. R.; WOOD, F. E.; BERTRAM, T. A.; FORTIER, N. E. A 91-day feeding study in rats with caprenin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 935-946, 1993. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027741218&partnerID=40&md5=9d93f8670c4e691345f06766a5d48d8b> >. Acesso em: 10/04/2015.

WEN CHANG, N.; TEN WU, C.; NA CHEN, F.; CHAO HUANG, P. High polyunsaturated and monounsaturated fatty acid to saturated fatty acid ratio increases plasma very low density lipoprotein lipids and reduces the hepatic hypertriglyceridemic effect of dietary cholesterol in rats. **Nutrition Research**, v. 24, n. 1, p. 73-83, 1// 2004. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531703002057> >. Acesso em: 03/09/2014.

WHO - World Health Organization. Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev*; 53(7):202-5, 1995.

WILLIS, W. M.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 38, n. 8, p. 639-674, 1998. ISSN 1040-8398. Acesso em: 02/02/2016.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 4, p. 287-303, 2000. ISSN 1438-9312. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200004\)102:4<287::AID-EJLT287>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200004)102:4<287::AID-EJLT287>3.0.CO;2-Q) >. Acesso em: 12/05/2016.

YOSHIDA, R.; AOYAMA, T.; YAMAMOTO, T. Absorption of mono-saturated long-chain di-middle-chain triglyceride. **Digest Absorpt**, v. 14, p. 27 - 30, 1991.

ZHU, X.-M.; HU, J.-N.; XUE, C.-L.; LEE, J.-H.; SHIN, J.-A.; HONG, S.-T.; SUNG, C.-K.; LEE, K.-T. Physicochemical and oxidative stability of interesterified structured lipid for soft margarine fat containing  $\Delta^5$ -UPIFAs. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 533-540, 3/15/ 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611012751> >.