



ESTUDO IN VIVO DO EFEITO ANTI-OBESOGÊNICO DE UM LIPÍDIO ESTRUTURADO NANOEMULSIFICADO RICO EM ÁCIDO BEHÊNICO

M. L. T. Scarponi¹*, J. C. Zuin¹, G. A. Macedo¹

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 13083-000, Campinas, Brasil.
m183617@dac.unicamp.br, juzuin@hotmail.com, macedoga@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: obesidade, ácido behênico, interesterificação e lipídio nanoemulsionado

RESUMO: Pesquisas indicam que a obesidade no Brasil cresceu 60% em dez anos e o aumento da incidência está associado principalmente a hábitos alimentares incorretos, com uma dieta com alto teor de carboidratos simples e gorduras. Em razão de seu alto valor calórico, é de extrema importância pesquisar e desenvolver lipídios com propriedades nutricionais benéficas, de menor valor calórico e fonte de compostos funcionais. A nanotecnologia tem se mostrado um importante foco da atenção pública em todo o mundo e as nanoemulsões, dentre outros benefícios, apresentam melhor funcionalidade para aplicação e maior estabilidade. Nesse contexto, associar o uso dos lipídios estruturados com a nanotecnologia pode trazer um potencial inovador e favorável para obtenção de lipídios de baixo valor calórico para aplicação em alimentos. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos antiobesidade de um lipídio estruturado rico em ácido behênico nanoemulsionado, adicionado à dieta de camundongos, visando à prevenção da obesidade por um sistema ainda não elucidado pela literatura atual.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras apresentam um papel fundamental na dieta do ser humano, devido aos seus efeitos fisiológicos, metabólicos e nutritivos, fornecendo ácidos graxos essenciais. No entanto, uma ingestão em excesso pode acarretar em malefícios à saúde, aumentando a propensão a doenças cardiovasculares e obesidade (RODRIGUES, *et al.* 2019). Contudo, existem diversos tipos de lipídios que figuram como estratégias nutricionais no controle e tratamento de diversas doenças (MOREIRA, 2017). O ácido behênico vem sendo utilizado por ser parcialmente absorvido pelo corpo humano, devido a possivelmente inibir a ação da lipase pancreática, apresentando potencial para reduzir calorias em óleos e gorduras.

Unindo a empregabilidade de um lipídio capaz de prevenir a obesidade com processos de interesterificação e nanoemulsão lipídica, surge a expectativa de introduzir um produto com um maior apelo de saudabilidade e que se adeque a uma determinada aplicação industrial (RODRIGUES, *et al.* 2019; V. G. BATISTA, *et al.* 2019). Os lipídios estruturados apresentam propriedades nutraceuticas básicas capazes de suprirem as necessidades nutricionais e fornecerem efeitos metabólicos e fisiológicos interessantes para a prevenção e tratamento de

doenças. Estes podem ser definidos como triacilgliceróis modificados por meio de catalisadores químicos ou enzimáticos capazes de alterar a composição dos ácidos graxos e/ou sua distribuição na molécula de glicerol. A estrutura molecular final do triacilglicerol irá influenciar no seu destino metabólico no organismo, bem como nas suas propriedades físico químicas (RIBEIRO, 2016).

As nanoemulsões apresentam uma relação de área para volume muito elevada, o que acelera qualquer reação química que ocorra na interface óleo-água, incluindo a digestão de lipídios (MCCLEMENTS, LI, 2010). Por conta de seu tamanho muito reduzido, as nanoemulsões podem ter sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção por vias diferentes das já elucidadas.

Em face ao exposto, é de extrema importância avaliar os efeitos metabólicos que as bases lipídicas (como azeite de oliva, óleo de soja e ácido behênico) podem acarretar em um sistema nanoemulsionado *in vivo*.

2. METODOLOGIA

2.1 Caracterização das matérias primas e produção dos lipídios estruturados e nanoemulsão

Foram utilizados como matérias-primas óleo de soja (43%), azeite de oliva (43%) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (14%), como fonte de ácido behênico.

A mistura simples foi confeccionada a partir da junção das três matérias primas fundidas a 80°C utilizando chapa de aquecimento e agitação magnética. A reação de interesterificação enzimática foi realizada em reator. A reação ocorreu a 60°C por 4 horas a 180 rpm, utilizando a lipase Lipozyme TL IM, posteriormente as amostras foram armazenadas a -20°C. A preparação da dispersão aquosa da nanoemulsão foi desenvolvida com 30% (m/m) de fase lipídica total. A fase aquosa foi composta por 3% (m/m) de emulsificante *Tween* 80 em água ultrapura, de acordo com Helgason *et al.* (2009), Qian *et al.* (2013). A nanoemulsão foi produzida utilizando-se a técnica de HAP a quente, em homogeneizador de alta pressão.

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) e comportamento térmico (perfil de cristalização) (AOCS Cj 1-94 -2009). A nanoemulsão foi caracterizada quanto ao Tamanho de partícula, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta, parâmetros determinados através da técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS) utilizando equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) e Difratometro a Laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments). As determinações analíticas desta etapa foram realizadas 48 horas após a obtenção das nanoestruturas lipídicas, e após 30 dias de estabilização sob manutenção a 25 °C com umidade relativa fixa igual a 60%, em incubadora tipo BOD.

Para a caracterização da consistência foi utilizado a metodologia descrita por Haighton (1959), utilizando o equipamento analisador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems).

2.2 Experimentação *in vivo*

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/Unicamp) de Campinas – SP – Brasil, sob protocolo número 5175-1/2019. Foram utilizados 20 camundongos C57BL6 machos com 6 semanas de idade adquiridos do CEMIB/UNICAMP. Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais contendo 5 animais cada. Cada grupo recebeu uma formulação distinta de dieta, conforme apresentado na Tabela 1, sendo estas a Dieta Padrão Controle (DPC) normocalórica AIN-93M; Dieta Hiperlipídica Controle (DHC) constituída de óleo de soja e oliva; Dieta Hiperlipídica com Lipídios Estruturados (DHLE) e Dieta Hiperlipídica com Lipídios Estruturados Nanoemulsionados (DHLEN).

Os animais se serviram *ad libitum* de água e ração, foram pesados semanalmente durante as 6 semanas de indução da obesidade e tiveram a ingestão de ração monitorada durante todo período do experimento. O controle da ingestão de alimentos foi feito pela pesagem da dieta fornecida e da sobra a cada dia.

A glicemia basal e os triglicerídeos sanguíneos foram coletados posteriormente 6 horas de jejum através de uma pequena incisão na cauda de cada animal.

Para a realização da eutanásia, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas para

Tabela 1. Composição das dietas para experimentação em camundongos

Composição	DPC ¹		DHC ²		DHLE ³	DHLEN ⁴
	(g/kg)	(kcal/kg)	(g/kg)	(kcal/kg)	(g/kg)	(g/kg)
Amido de milho	397,5	1590,0	169,8	679,2	169,8	169,8
Caseína	200,0	800,0	200,0	800	200,0	200,0
Sacarose	100,0	400,0	100,0	400	100,0	100,0
Maltodextrina	132,0	528,0	132,0	528	132,0	132,0
Óleo de soja	70,0	630,0	148,8	1339,2	-	-
Azeite de oliva	-	-	148,8	1339,2	-	-
Lipídio Estruturado	-	-	-	-	297,7	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	5086,5	1000	1000

¹ Dieta padrão controle; ² Dieta hiperlipídica controle; ³ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado; ⁴ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado nanoemulsionado.

posterior anestesia com uma mistura 1:1 v/v de cetamina na dose de 360 mg/kg e cloridrato de xilazina 2% na dose de 30 mg/kg. As biópsias dos tecidos coletados estão adequadamente armazenadas a -80°C para posterior utilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizar o processo de interesterificação enzimática foi observado que não houve variação na composição lipídica, corroborando com dados da literatura, que afirmam que ocorre somente uma redistribuição dos ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis. Os principais ácidos graxos encontrados após a interesterificação foram C18:1 (36%), C 18:2 (27%) e C 16:0 (13%), determinados pela composição total em ácidos graxos das matérias-primas iniciais.

O comportamento térmico- perfil de cristalização pelo DSC foi traçado e representado na Figura 1. Sabe-se que os triacilgliceróis trissaturados por apresentarem ponto de fusão mais alto, cristalizam-se primeiro, justificando o fato do *hardfat* de crambe, composto de ácidos graxos saturados, iniciar sua cristalização em torno de 65°C, apresentando somente um pico.

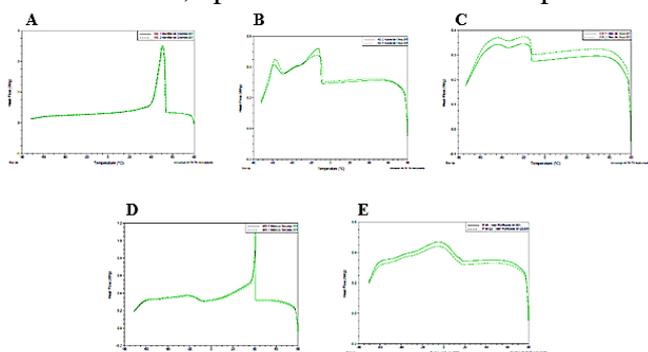


Figura 1: Termogramas de cristalização (Temperatura °C x Heat Flow W/g) do *hardfat* de crambe (A); azeite de oliva (B); óleo de soja (C); mistura simples (D) e após a interesterificação (E).

Em contrapartida, o pico de cristalização do azeite de oliva e do óleo de soja começa por volta de -15°C, em virtude de possuírem em sua composição maior quantidade de ácidos graxos insaturados. Após a interesterificação, observa-se uma grande mudança no perfil de cristalização, pois os triacilgliceróis tri e dissaturados foram redistribuídos para monoinsaturados e tri insaturados.

Haighton (1959) classificou a consistência das gorduras em relação ao seu *Yield Value*, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Classificação das gorduras (Haighton, 1959).

<i>Yield Value</i> (g/cm ²)	Consistência
<50	Muito macia, quase fluida
50-100	Muito macia, não espalhável
100-200	Macia, já espalhável
200-800	Plástica e espalhável
800-1000	Dura, satisfatoriamente espalhável
1000-1500	Muito dura, no limite de espalhabilidade
>1500	Muito dura

A mistura simples apresentou um *Yield Value* de 137,88 g/cm², enquanto que o lipídio estruturado apresentou 384,99 g/cm², sendo este o resultado esperado uma vez que a literatura científica indica que o processo de interesterificação altera a plasticidade e a consistência da gordura.

Segundo a classificação de Haighton (1959), o lipídio estruturado obtido pela interesterificação apresenta consistência plástica e espalhável, podendo ser aplicado em margarinas. Já a mistura simples, apesar de visivelmente mais consistente, à medida que o probe infiltra na amostra, a mesma não apresenta resistência, sendo classificada como macia.

Em relação a nanoemulsão, a Tabela 3 apresenta os valores obtidos para tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta durante diferentes períodos de experimentação.

Tabela 3. Valores obtidos para tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta.

Período	Tamanho da partícula	PDI	Potencial Zeta
48h	198,33	0,264	-31,5
15 dias	194,96	0,284	-35,9
30 dias	176,6	0,446	-31,1

Com relação ao tamanho de partícula, Kumar e Singh (2012) relatam que a nanoemulsão deve ter tamanho inferior a 200 nm com o objetivo de manter a estabilidade física das emulsões (MARTINI & HERRERA, 2008). O índice de polidispersividade (PDI) se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade, ou seja, ela está relacionada com homogeneidade das partículas (ALBERNAZ, V., 2014). Variações nos valores obtidos de PDI durante a experimentação é um indicativo de quebra ou aglomeração de partículas (SOUZA P. *et al.* 2012). Para monitorar o comportamento e estabilização destas nanoemulsões é verificado seu potencial Zeta (ALMEIDA C. *et al.* 2017). O potencial Zeta com um valor de ± 30 mV é geralmente escolhido para

inferir a estabilidade das partículas, através do qual o valor absoluto superior a 30 mV indica uma condição estável, enquanto que um valor de potencial Zeta inferior a 30 mV indica uma condição para a instabilidade, a agregação, coagulação ou floculação (ALMEIDA C. *et al.* 2017).

Com relação aos resultados obtidos na caracterização da nanoemulsão, observa-se que os valores encontrados para tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta correspondem aos valores citados como ideais na literatura.

Através dos resultados apresentados na Tabela 4, é possível verificar que o ganho de peso dos animais teve uma variação entre os grupos de 5,4 g e 11,6 g durante 6 semanas de experimentação.

Tabela 4. Peso corpóreo dos camundongos.

	DPC ¹	DHC ²	DHLE ³	DHLEN ⁴
Peso inicial (g)	19,4	20,0	19,4	18,8
Peso final (g)	24,8	29,2	31,0	26,6
Ganho (g)	5,4 ^b	9,2 ^a	11,6 ^d	7,8 ^c

¹ Dieta padrão controle; ² Dieta hiperlipídica controle; ³ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado; ⁴ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado nanoemulsionado.

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

O grupo cujo ganho de peso foi menor (DPC), ingeriu uma dieta controle normocalórica enquanto que o grupo DHC ingeriu uma dieta controle hiperlipídica composta de óleo de soja e azeite de oliva estimulando o desenvolvimento de obesidade.

A dieta hiperlipídica com lipídio estruturado (DHLE) não apresentou um resultado efetivo no combate ao ganho de peso, sendo verificado que dentre as dietas hiperlipídicas, a DHLEN demonstrou a resposta mais satisfatória. O grupo DHLEN, apresentou um ganho de peso de 15,21% menor em relação ao grupo DHC. Mesmo constatando um ganho de peso de 0,4 vezes mais em comparação ao grupo com dieta padrão controle (DPC), os resultados obtidos a partir da experimentação com o grupo DHLEN ainda expressam o potencial da empregabilidade de uma dieta nanoemulsionada rica em ácido behênico na prevenção do ganho de peso e obesidade.

O ácido behênico atua de forma a impedir a deposição da gordura visceral e do triacilglicerol hepático, devido redução na absorção dos lipídios consumidos na dieta, bem como pela maior

excreção de ácidos graxos nas fezes. Nesse sentido, ao utilizar o ácido behênico na composição da dieta dos camundongos, há uma baixa absorção pelo organismo, por ser um ácido graxo saturado de cadeia longa, como também, possui propriedades de inibição da lipase pancreática, diminuindo ainda mais a sua absorção e a de outros ácidos graxos (DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA. 2010). Em razão disso, os camundongos submetidos a DHLEN apresentaram uma maior ingestão alimentar por dia, como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Ingestão alimentar média em gramas durante 24h/grupo.

DPC ¹	DHC ²	DHLE ³	DHLEN ⁴
13,03	14,72	14,54	17,89

¹ Dieta padrão controle; ² Dieta hiperlipídica controle; ³ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado; ⁴ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado nanoemulsionado.

O resultado da glicemia basal dos grupos de animais foi analisado segundo o teste estatístico de Tukey - ANOVA e demonstrado na Tabela 6. Nota-se que o grupo submetido a dieta padrão controle (DPC) e o grupo que consumiu a dieta hiperlipídica com lipídio estruturado nanoparticulado (DHLEN) não apresentaram diferenças estatísticas significativas, sendo constatado que a ingestão de uma dieta hiperlipídica nanoemulsionada não contribui para o aumento da glicemia basal, corroborando com a literatura científica.

Tabela 6. Glicemia basal em mg/dL.

DPC ¹	DHC ²	DHLE ³	DHLEN ⁴
162,66 ^b	220,33 ^a	177,66 ^{ab}	151,66 ^b

¹ Dieta padrão controle; ² Dieta hiperlipídica controle; ³ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado; ⁴ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado nanoemulsionado.

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

O conteúdo de triglicerídeos do sangue dos animais pode ser visualizado na Tabela 7. O teste estatístico mostrou que os grupos não diferem significativamente entre si, mesmo havendo discernimento em termos de peso corpóreo entre os grupos que consomem DHC e DHLEN como já apresentado na Tabela 6. Pode-se atrelar esse fato ao tempo de ensaio insuficiente, uma vez que não foi possível os grupos adquirirem diferença significativa.

Tabela 7. Triglicerídeos

DPC ¹	DHC ²	DHLE ³	DHLEN ⁴
88,33 ^a	108,33 ^a	97,66 ^a	93,33 ^a

¹ Dieta padrão controle; ² Dieta hiperlipídica controle; ³ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado; ⁴ Dieta hiperlipídica com lipídio estruturado nanoemulsionado.

* Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os grupos pelo teste Tukey com 95% de significância.

4. CONCLUSÃO

O lipídio estruturado nanoemulsionado confeccionado em laboratório apresentou características físico-químicas diferenciadas quando comparado com a mistura simples dos óleos de soja, crambe totalmente hidrogenado e azeite de oliva, bem como foi observado um efeito antiobesidade satisfatório em experimentação animal. A inclusão de uma dieta nanoemulsionada contendo ácido behênico, permitiu que os camundongos não engordassem, sendo verificado uma manutenção do peso corpóreo, mesmo submetidos a uma dieta hiperlipídica. Esse resultando indica que o lipídio nanoemulsionado pode ser um aliado na prevenção da obesidade e consequentemente de outras doenças.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6 ed. Champaign, 2009.

ALBERNAZ, V. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. Dissertação de mestrado - Universidade de Bras Ciências Biológicas. 2014.

ALMEIDA C. *et al.* A utilização das nanopartículas no combate à resistência bacteriana. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**. Vl.19, n. 2, p.125-132, Jun./Ago. 2017.

BATISTA V. G., *et al.* Síntese de Lipídios Estruturados Empregando Lipase de *Rhizopus oryzae* Imobilizada em Pó de Sabugo de Milho. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Uberlândia - MG. 2019.

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

HAIGHTON, A. J. The measurement of the hardness of margarine and fats with cone penetrometers. **Journal of the American Oil**

Chemists' Society. Champaign, v.36, n.8, p.345-348, 1959.

HELGASON, T. *et al.* Impact of surfactant properties on oxidative stability of β -carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 8033–8040, 2009.

KUMAR, S. H. & SINGH, V. Nanoemulsification – A Novel Targeted Drug Delivery Tool. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**. v.2, n. 4, p. 40-45. 2012.

MARTINI, S.; HERRERA, M. L. Physical properties of shortenings with low-trans fatty acids as affected by emulsifiers and storage conditions. **European journal of lipid science and technology**, v. 110, n. 2, p. 172-182, 2008.

McCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, p.213–228, 2010.

MOREIRA, D. K. T., Santos, P. S., Gambero, A., Macedo, G. A. Evaluation of structured lipids with behenic acid in the prevention of obesity. **Food research international**, 95, 52-58, 2017

QIAN, C. *et al.* Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: potential limitations of solid lipid nanoparticles. **Food Research International**, v. 52, p. 342–349, 2013.

RIBEIRO M. M. M. Interesterificação Enzimática de Lipídios Estruturados a Partir de Óleo de Girassol Alto Oléico com Triacilgliceróis Saturados de Cadeia Longa. **Dissertação em Doutorado em Tecnologia de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. 2016.

RODRIGUES M. F., *et al.* Síntese de Lipídios Estruturados em Reator de Leito Fixo Empregando Lipozyme RM IM. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Uberlândia - MG. 2019.

SOUZA P. *et al.* Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quím. Nova**. v.35, n.1, São Paulo. 2012.