

# GRASA RECALENTADA: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUERO Y EN HOMOGENADOS DE TEJIDO HEPÁTICO EN RATAS

X. Pau, S. Jiménez, A. Rodríguez, R. Gómez y J. L. Morán

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 7 de abril de 1986

Recibido: 16 de diciembre de 1986

**ABSTRACT.** The aim of this work was to evaluate the activity of some enzymes in serum and liver from rats fed during 11 d with the following diets: fresh lard, overheated during 165 min at 180 °C lard overheated during 265 min at 190 °C and fat free diet. Dampened cotton balls in groups of 10 were fried during 10 min in heated lards. The activities of alanin-aminotransferase, ALAT (EC: 2.6.1.2) and aspartat-aminotransferase, ASAT (EC: 2.6.1.1) were assayed in serum. The gamma-glutamyltranspeptidase, GGT (EC: 2.3.2.2) alkaline phosphatase, aP (EC: 3.1.3.1) and leucin-aminopeptidase, LAP (EC: 3.4.11.1) were assayed in homogenate of liver tissue. No significant differences were found in the activities of ALAT, ASAT and LAP. The highest activity of GGT was found when the rats were fed fresh lard diet and the lowest activity with diets heated to 165 and 265 min. However the activity of aP was greater when the fat was heated 265 min. The results show that although saturated fat were used, the length of time that the fat was heated was able to produce changes in the composition of the fat which affected the activity the some of enzymes at a molecular level.

**RESUMEN.** El objetivo del trabajo fue valorar la actividad de algunas enzimas en suero y en hígado de ratas alimentadas durante 11 d con dietas que contenían manteca fresca, manteca recalentada a 180 °C durante 165 min, manteca recalentada a 190 °C durante 265 min y dieta libre de grasa. El recalentamiento se llevó a cabo friendo bolas de algodón humedecidas durante 10 min y divididas en grupos de 10. Se determinaron en suero las actividades de la alanin-aminotransferasa, ALAT (EC: 2.6.1.2) y la aspartato-aminotransferasa, ASAT (EC: 2.6.1.1). En homogenados de tejido hepático de la gamma-glutamyltranspeptidasa, GGT (EC: 2.3.2.2), la fosfatasa alcalina, FA (EC: 3.1.3.1) y la leucinaminopeptidasa, LAP (EC: 3.4.11.1). No hubo diferencias significativas entre los grupos en las actividades de la ALAT, ASAT y LAP. La mayor actividad de la GGT se encontró cuando las ratas se alimentaron con la dieta que contenía grasa fresca y la menor cuando la grasa se recalentó a 165 y 265 min. La FA mostró su máxima actividad cuando la grasa se recalentó a 265 min. Los resultados obtenidos muestran que a pesar de tratarse de grasas saturadas, el tiempo de recalentamiento fue capaz de producir cambios en la composición de la grasa, los cuales afectaron la actividad de algunas de las enzimas estudiadas.

## INTRODUCCIÓN

El calentamiento y recalentamiento de las grasas, principalmente de los aceites, cambia su composición, lo que da lugar a la formación de nuevos compuestos, cuya posible toxicidad se cuestiona en muchos casos. La cantidad de los productos de descomposición depende del tiempo de calentamiento de la grasa utilizada (grado de insaturación, temperatura, grado de humedad e inclusive, tipo de recipiente que se utiliza) <sup>1,7</sup>.

La temperatura y el tiempo de calentamiento son las variables que más influyen en la termo-oxidación de las grasas. Asimismo, el proceso de calentamiento intermitente resulta más perjudicial que el continuo. Las alteraciones producidas en estos casos son directamente proporcionales al grado de insatu-

ración de la grasa, aumentando a medida que crece el número de insaturaciones presentes en sus moléculas.

En estudios realizados con ratas, se destaca que el grado de toxicidad puede llegar a ser tal que produzca retardo en el crecimiento, aumento de la temperatura corporal, problemas en fertilidad y reproducción y aumento de la mortalidad. Algunos autores plantean que la causa primaria de estas alteraciones es la destrucción de proteínas, vitaminas y ácidos grasos esenciales, así como interferencias en la actividad y síntesis enzimática <sup>4,8-16</sup>.

El hígado, órgano central del metabolismo, ha sido objeto de estudio bajo condiciones de estrés dietario o bajo condiciones patológicas. Su función es en parte medible por la actividad de algunas enzimas

en suero o directamente al valorar el comportamiento enzimático en el tejido, pudiendo estar comprometida dicha función en presencia de productos tóxicos resultantes de la oxidación de las grasas.

El objetivo de este trabajo, fue valorar la actividad de algunas enzimas séricas y de otras de localización celular diferente en homogenados de tejido hepático cuando en lugar de aceite se introduce manteca en la alimentación y se calienta un número de veces tal que recuerda al método de freidura en la alimentación social y al casero, en algunos casos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó manteca de cerdo producida en una planta industrial. Se prepararon bolas de algodón con peso de 2 g, las cuales fueron humedecidas y exprimidas hasta alcanzar un peso de 6 g. Posteriormente, eran freidas en la manteca durante 3 min, sustituyéndose al cabo de este período por otras bolas nuevas sin interrumpir el proceso de calentamiento hasta alcanzar tiempos de freidura de 165 y 265 min respectivamente.

De acuerdo con la grasa utilizada en la dieta los animales se dividieron en cuatro grupos:

Grasa fresca (no calentada); grasa recalentada a 180 °C durante 165 min; grasa recalentada a 190 °C durante 265 min y dieta libre de grasa.

La temperatura de freidura se controló con un termómetro especial para estos fines.

### Procedimiento biológico

Se utilizaron 8 ratas macho Wistar con peso promedio entre 80 y 90 g, las cuales se colocaron en jaulas metabólicas mediante el diseño de cuadrado latino. Los animales se sometieron a un período de adaptación de 5 d con un ritmo de iluminación de 12 h diarias y una temperatura ambiental de 24 °C.

De acuerdo con la grasa recibida, los animales se dividieron en cuatro grupos: el primer grupo recibió una dieta basal con manteca fresca, en el segundo y tercero se sustituyó la manteca fresca de la dieta basal por la grasa recalentada y el cuarto recibió una dieta libre de grasa. Las dietas fueron isocalóricas y la composición de éstas se muestra en la Tabla I.

TABLA I

Composición de la dieta en base seca

| Composición         | Basal      | Libre de grasa |
|---------------------|------------|----------------|
|                     | (g/100 mL) |                |
| Caseína             | 13,5       | 13,5           |
| Grasa               | 9,0        | —              |
| Celulosa            | 2,6        | 2,6            |
| Almidón             | 69,0       | 78,0           |
| Mezcla de vitaminas | 1,1        | 1,1            |
| Mezcla de minerales | 4,8        | 4,8            |

Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*. El alimento fue conservado a 5 °C. La ingestión de alimentos se controló diariamente mediante pesada. El peso corporal se controló al comienzo y al final del experimento. Los animales fueron alimentados durante 11 d al cabo de los cuales se obtuvo sangre de la vena femoral y fueron sacrificados por decapitación. El hígado fue extraído inmediatamente, siendo lavado con solución salina fisiológica helada y pesado y conservado a -20 °C hasta el día de su procesamiento. La sangre se dejó en reposo durante 1 h y se centrifugó a 3 000 r/min durante 20 min para obtener el suero. El hígado fue fraccionado y homogeneizado con una solución de sacarosa 0,25 mo/L a pH 7, según una relación masa/volumen de 1:10. El homogenado se centrifugó a 5 000 r/min durante 10 min determinándose en el sobrenadante la actividad de la gamma-glutamiltanspectidasa (GGT) y de la fosfatasa alcalina (FA). Se utilizaron juegos de reactivos para todas las determinaciones de las firmas Chemapol (GGT), Finlay (FA) y Bøehringer leucinaminopeptidasa (LAP). En el suero se determinó la actividad de la aspartatoaminotransferasa (ASAT) y la alaninaaminotransferasa (ALAT) con juegos de reactivos de la firma Roche.

La determinación de proteína se hizo por el método de Lowry<sup>17</sup>. La valoración para las posibles diferencias estadísticas se hizo por el análisis de varianza y el test de Duncan para una  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en el peso de las ratas ni de los hígados, al final del experimento (Tabla II).

TABLA II

Peso de las ratas y de los hígados después de 11 d de dieta

| Producto                                   | Peso corporal | Peso hígado (g) |
|--|---------------|-----------------|
| Grasa fresca                               | 105,4 ± 11,0  | 4,8 ± 0,7       |
| Grasa recalentada a 180 °C durante 165 min | 107,0 ± 3,5   | 5,1 ± 0,2       |
| Grasa recalentada a 190 °C durante 265 min | 99,9 ± 9,5    | 4,7 ± 0,2       |
| Dieta libre de grasa                       | 99,8 ± 5,2    | 4,9 ± 0,6       |

La concentración de proteínas en el hígado no mostró diferencias significativas y la media alcanzada por grupo fue respectivamente: 21,7 ± 2,6; 21,7 ± 3,8; 23,2 ± 3,2 y 21,3 ± 3,2 mg/mL. La actividad enzimática determinada en los homogenados, se expresa como actividad enzimática específica y el resultado de las enzimas determinadas se muestra en la Tabla III. La actividad enzimática determinada en suero aparece expresada en la Tabla IV.

En el homogenado de hígado la mayor actividad de la GGT se observó cuando las ratas se alimentaron con una dieta que contenía grasa fresca, mientras que la menor actividad se encontró cuando la grasa se recalentó, no habiendo diferencias entre un tiempo u otro de recalentamiento.

TABLA III

Actividad enzimática específica en homogenados de hígado de ratas alimentadas con diferentes dietas

| Enzima                         | Grasa fresca              | Grasa recalentada<br>180 °C 165 min | Grasa recalentada<br>190 °C 265 min | Libre de grasa           |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| GGT<br>pmol/s · mg de proteína | 6,11 ± 2,6 <sup>a</sup>   | 3,7 ± 1,0 <sup>bc</sup>             | 4,2 ± 0,7 <sup>cd</sup>             | 4,8 ± 1,6 <sup>de</sup>  |
| FA<br>pmol/s · mg de proteína  | 120,1 ± 26,6 <sup>a</sup> | 128,9 ± 32,1 <sup>a</sup>           | 211,6 ± 40,1 <sup>b</sup>           | 93,3 ± 29,3 <sup>a</sup> |
| LAP<br>pmol/s · mg de proteína | 16,81 ± 3,1 <sup>a</sup>  | 17,8 ± 5,2 <sup>a</sup>             | 18,5 ± 11,9 <sup>a</sup>            | 18,4 ± 4,6 <sup>a</sup>  |

Letras iguales no hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

TABLA IV

Actividad enzimática en suero de ratas alimentadas con diferentes dietas

| Enzimas             | Grasa fresca | Grasa recalentada<br>180 °C 165 min | Grasa recalentada<br>190 °C 265 min | Libre de grasa |
|---------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| (nmol/s.L)          | 252,5 ± 49,8 | 278,5 ± 89,3                        | 308,9 ± 65,0                        | 295,9 ± 56,7   |
| ASAT<br>(nmol/s.mL) | 552,1 ± 63,8 | 542,9 ± 79,9                        | 577,2 ± 85,3                        | 566,6 ± 69,0   |

Se halló actividad intermedia cuando se suministró dieta libre de grasa. La FA mostró por el contrario, mayor actividad cuando la grasa se recalentó mayor tiempo, mientras que la menor actividad se presentó en las ratas que fueron alimentadas con grasa fresca, en la recalentada por menos tiempo y en la dieta libre de grasa. No se encontraron diferencias entre estas tres últimas, así como en la actividad de la LAP. La actividad de la ALAT y la ASAT en suero no mostraron diferencias significativas, encontrándose una ligera tendencia al aumento cuando la grasa fue recalentada por más tiempo. No se determinó el peso relativo del hígado por carecer de interés, ya que los pesos corporal y absoluto del hígado no arrojaron diferencias significativas al final del experimento.

## DISCUSIÓN

Numerosos estudios realizados en animales de experimentación señalan la posible toxicidad de las grasas recalentadas<sup>1,7</sup>. Múltiples son los efectos tóxicos provocados en ratas por los productos oxidados que se forman en el calentamiento de las grasas entre los cuales los indicadores más sencillos de medir son los pesos corporal y de los órganos. Se ha encontrado que el peso corporal disminuye mientras que el del hígado y de los riñones aumenta<sup>18</sup>. Dicho efecto ha sido medido en estos casos después de tratar los animales durante un período que ha llegado a extenderse hasta 18 meses. En el estudio realizado por los autores no se observaron diferencias en el peso corporal del hígado, lo cual pudiera corresponder con el tipo de grasa utilizada que al ser saturada, el calentamiento no provoca

tanta formación de productos oxidados, principalmente grupos carbonilo de cadenas cortas<sup>19</sup> o porque el tiempo a que fueron sometidos los animales a la dieta fue relativamente corto. Se ha informado al mismo tiempo que los productos de la peroxidación de las grasas insaturadas causan destrucción de proteínas, interfieren a las biomembranas y a la actividad de algunas enzimas unidas a membrana<sup>15,20</sup>.

Según los resultados obtenidos, no parece haber habido interferencia en la síntesis, ni destrucción proteica, ya que no hubo diferencias significativas en la concentración de proteína en el hígado cuando se compararon los cuatro grupos estudiados. La actividad enzimática sí parece haber variado de acuerdo a la localización y la función de las enzimas, encontrándose que la GGT que es una enzima unida a membrana, mostró mayor actividad cuando se alimentaron las ratas con grasa fresca, una actividad comparativamente menor con la dieta libre de grasa y un valor menor aún cuando la grasa se recalentó a ambos tiempos.

Es conocido que la peroxidación lipídica y las biomembranas están íntimamente relacionadas.

La composición de fosfolípidos de la doble capa lipídica de las biomembranas es rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y el ataque oxidativo de los grupos carbonilo formados en el calentamiento de las grasas resulta en formación de radicales en los (AGPI) de las membranas con la consiguiente formación de más radicales de peróxido. Los peróxidos lipídicos generados en las biomembranas pueden unirse a las proteínas de las membranas, entre ellas a las enzimas y alterar de este modo la actividad de las mismas. Por pequeña que haya sido en este caso la producción de peróxidos al tratarse de grasas

saturadas, podría explicarse la disminución de la GGT para los casos en que la grasa fue recalentada. Al mismo tiempo, esta enzima es constitucionalmente una lipoproteína, cuya actividad depende en gran medida de los lípidos de la membrana. Correspondientemente a esto, se encontró una disminución en su actividad comparando los grupos primero y cuarto.

La FA que es también una enzima unida a membrana, tuvo un comportamiento diferente, quizás, debido no solamente a su localización celular, sino también, a la función que ésta desempeña. Se ha señalado que esta enzima interviene en el transporte de aminoácidos y de péptidos en el hígado y que cambios en la membrana donde se ha visto comprometido el transporte proteico ha provocado un aumento en la síntesis de la enzima sin cambio en la síntesis proteica general, lo cual se explica como un mecanismo de compensación que posibilita el transporte a través de las membranas cuando una noxa a un agente externo comprometa esta función<sup>21</sup>. Estas observaciones concuerdan con la mayor actividad encontrada cuando la grasa se recalentó más tiempo y donde por ende, debieron formarse más peróxidos que interfirieron con los lípidos de las membranas.

La LAP es una enzima citosólica empleada en el diagnóstico de las hepatopatías y en el diagnóstico diferencial de otras entidades. Las diferencias no significativas observadas en el hígado pueden atribuirse a que esta enzima debe verse poco afectada debido a su localización celular. La ALAT y ASAT que son también indicadores empleados en la clínica para medir función hepática no arrojaron diferencias significativas, lo cual se considera, se deba al corto tiempo del experimento, lo que no permitió contar con el tiempo suficiente para provocar la destrucción celular y con ella, la salida de las enzimas al torrente circulatorio. Algunos autores que alimentaron ratas con la fracción polar del aceite calentado encontraron un aumento en la actividad de la ALAT y la ASAT en suero, pero en estos casos, se han fraccionado los aceites recalentados provocándose una verdadera hepatotoxicidad experimental<sup>22</sup>.

#### CONCLUSIONES

El calentamiento de la manteca provoca alteraciones bioquímicas que se traducen en cambios en la actividad de algunas enzimas hepáticas.

Los productos formados por el recalentamiento no afectan de igual modo a las enzimas citosólicas y a las unidas a membrana.

El breve tiempo del experimento no permitió demostrar por medio del estudio de las enzimas séricas la posible hepatotoxicidad de los productos tóxicos que se forman al calentarse la manteca.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Artman N. R. *Advances in Lipids Research* 7, 245, 1969.
2. Boskou D. and Morton I. D. *J. Sci. Food Agr.* 26, 1 149, 1975.
3. Perkins E. G. *Food Technol.* 14, 508, 1960.

4. Perkins E. G. *Rev. Franc. Corps. Grass.* 23, 257, 313, 1976.
5. Potteau B. and Causeret J. *Rev. Franc. Corp. Grass.* 8, 591, 1971.
6. Potteau B. *Rev. Franc. Corps. Grass.* 20, 471, 1973.
7. Schultz H. W., Day E. A. and Sinnhuber R. O. ed. *Symposium on Foods: Lipids and their oxidation* 442, The AVI Publishing Co. Inc., Westport Connecticut, 1962.
8. Coquet B., Fouillet K. and Rouand J. L. *Rev. Franc. Corps. Gras.* 24, 483, 1977.
9. Govin R., Hermans G. and Perkins E. G. *Lipids* 8, 342, 1973.
10. Hermans G., Kummerow F. and Perkins E. G. *J. Nutr.* 103, 1973.
11. Iwaoka W. T. and Perkins E. G. *Lipids* 1, 349, 1976.
12. Mankel A. *Fette, Seifen, Austrichmittel* 72, 483, 1970.
13. Pohing G. E., Eagle N., Rice E. E., Durand A. A. and Fischer M. *Lipids* 5, 128, 1970.
14. Potteau B., Lhuisier M., Leclarc J., Castot F., Mezonnet R. and Cluzan R. *Rev. Corps Gras.* 17, 235, 1970.
15. Benedetti A., Barbieri L., Ferrali M., Casini A. F., Fulcori R. and Comporti M. *Chem. Biol. Interactions* 35, 331, 1981.
16. Isaki Y., Yoshikawa S. and Uchiyama M. *Lipids* 19, 324, 1984.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Fan A. L. and Randall R. L. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
18. Johnson O. C., Perkins E. and Sugar M. *The Journal of the American Oil Chemical Society* 34, 594, 1957.
19. Esterbauer H., Chesseman K. H., Dianzani M. U., Poli G. and Slater T. F. *Biochem. J.* 208, 129, 1982.
20. Benedetti A., Fulceri R., Ferrali M., Ciccoli L., Esterbauer H. and Comporti M. *BBA* 712, 628, 1982.
21. Hassan H. M. and Fridovich I. *J. Biol. Chem.* 9, 6 445, 1978.
22. Billek G. *Nut. Metab.* 24, 200, 1979.