

RENATA TIENE DE CARVALHO YOKOTA

**VALIDAÇÃO DO QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE
CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS COM O USO DE
BIOMARCADORES E APLICAÇÃO DO MÉTODO DAS TRÍADES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Brasília

2008

RENATA TIENE DE CARVALHO YOKOTA

**VALIDAÇÃO DO QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE
CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS COM O USO DE
BIOMARCADORES E APLICAÇÃO DO MÉTODO DAS TRÍADES**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de mestre em
Nutrição Humana, Curso de Pós-graduação
em Nutrição Humana, Departamento de
Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília.**

Orientadora: Prof.^a Dra. Marina Kiyomi Ito

Brasília

2008

BANCA EXAMINADORA

Presidente da Banca: Prof.^a Dra. Marina Kiyomi Ito

Departamento de Nutrição – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

2º Membro: Dr. Marcelo Buzzi

Laboratório de Bioquímica Analítica – Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação

3º Membro: Prof.^a Dra. Céphora Maria Sabarense

Departamento de Nutrição e Saúde - Universidade de Viçosa

4º Membro: Prof.^a Dra. Sandra Fernandes Arruda

Departamento de Nutrição – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

**A Deus,
grande responsável
por mais esta etapa
da minha vida.**

**Aos meus pais,
pelo esforço e
investimento na minha
educação e pela
dedicação na minha
formação como pessoa.**

AGRADECIMENTOS

À professora Marina, minha orientadora, pelo exemplo em determinação, pelo incentivo em dar continuidade aos estudos e à área de pesquisa e pela confiança.

À Priscila Coelho, ex-bolsista de PIBIC, pela grande dedicação ao projeto, pelas análises laboratoriais, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Dr. Marcelo Buzzi, pela paciência em me ensinar as técnicas de análise de lipídios, pelo incentivo e pela valiosa contribuição neste trabalho.

À Dra. Céphora Maria Sabarense e à Dra. Sandra, por terem aceitado o convite em participar da banca.

Aos professores envolvidos no estudo piloto do Projeto Viva-DF, Eliane, Kênia e Edgar.

À estatística Édina Shizue Miazaki, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À minha grande amiga e companheira de projeto Tatiana, pela força, apoio e companheirismo do início até a conclusão deste trabalho e pelos importantes momentos de distração.

À minha grande amiga Márcia, por acreditar em mim e pelo estímulo ao estudo na área de epidemiologia.

A todos os meus amigos, em especial à Xu, Thaís, Biba e Tatiana. Apesar da distância, pela torcida e pelos momentos de descontração.

Aos meus irmãos Ives e Natalia, pela maneira como lidaram com os meus momentos de difícil convivência, pelo apoio e pelos momentos de diversão.

Ao Rafael, pelo carinho, pela companhia, pelo suporte, pelas brincadeiras e por entender meus momentos de estresse e cansaço. Muito obrigada por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
APRESENTAÇÃO.....	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS E O CONSUMO ALIMENTAR.....	6
1.1.1. Doenças crônicas não transmissíveis: conceito e epidemiologia	6
1.1.2. Consumo alimentar e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.....	6
1.1.3. Ácidos graxos dietéticos e doenças crônicas não transmissíveis	8
1.2. VALIDAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	10
1.2.1. Métodos de avaliação do consumo alimentar.....	10
1.2.1.1. Recordatório de 24 horas (R24)	10
1.2.1.2. Questionário de frequência alimentar (Q).....	12
1.2.1.3. Biomarcadores do consumo de nutrientes.....	13
1.2.2. Processo de validação do consumo alimentar	15
1.2.2.1. Ajuste por energia.....	16
1.3. VALIDAÇÃO DO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	17
1.3.1. Dificuldades inerentes à estimativa de ingestão de gorduras e ácidos graxos.....	17
1.3.2. Biomarcadores do consumo de ácidos graxos dietéticos.....	18
1.3.3. Estudos de validação do consumo de ácidos graxos dietéticos.....	19

1.4. MÉTODO DAS TRIÁDES	25
1.4.1. Métodos das tríades em estudos de validação do consumo alimentar.....	25
1.4.1.1. Introdução.....	25
1.4.1.2. Tipos de biomarcadores da ingestão de nutrientes	26
1.4.1.3. Método das tríades: conceito (Kaaks, 1997)	27
1.4.1.4. Técnica “ <i>bootstrap</i> ” para o cálculo do intervalo de confiança de 95% do coeficiente de validade.....	30
1.4.1.5. Aplicação do método das tríades em estudos de validação do consumo alimentar.	31
1.4.1.6. Limitações do método das tríades	38
1.4.1.7. Considerações Finais.....	38
1.4.2. Método das tríades na validação do consumo de ácidos graxos dietéticos	39
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Delineamento do estudo	44
3.1.1. Projeto Piloto VIVA-DF.....	44
3.1.2. Estudo de validação do consumo de ácidos graxos dietéticos.....	46
3.2. Recordatório de 24 horas (R24).....	47
3.3. Questionário de frequência alimentar (Q).....	47
3.3.1. Lista de alimentos.....	47
3.3.2. Frequência de consumo e porções do questionário de frequência alimentar	49
3.4. Cálculo de nutrientes	49
3.5. Análise de ácidos graxos	50
3.5.1. Extração de lipídios	50

3.5.2. Separação de fosfolípidios séricos por cromatografia de camada delgada (CCD).....	51
3.5.3. Esterificação de ácidos graxos dos fosfolípidios plasmáticos	52
3.5.4. Análise dos ácidos graxos esterificados por cromatografia gasosa	52
3.6. Análise estatística	53
4. APPLICATION OF THE METHOD OF TRIADS IN THE VALIDATION OF A FATTY ACID FOOD FREQUENCY QUESTIONNAIRE FOR A BRAZILIAN ADULT POPULATION	55
Abstract.....	56
INTRODUCTION	57
METHODS.....	58
Study Population and Design	58
Food Frequency Questionnaire and 24 Hour Records.....	59
Serum Phospholipids Fatty Acids	60
Statistical Analyses.....	61
RESULTS.....	62
DISCUSSION.....	67
ACKNOWLEDGMENTS	73
References	74
5. CONCLUSÕES GERAIS	80
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	82
7. ANEXOS	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

OMS – Organização Mundial da Saúde

AG – ácido graxo

AGS – ácidos graxos saturados

AGT – ácidos graxos trans

AG *n*-3 – ácidos graxos *n*-3

AG *n*-6 – ácidos graxos *n*-6

AGM – ácidos graxos monoinsaturados

DC – doenças coronarianas

AGP – ácidos graxos poliinsaturados

HDL – *high density lipoprotein* – lipoproteína de alta densidade

LDL – *low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade

R24 – recordatório de 24 horas

Q – questionário de freqüência alimentar

R – método de referência

RA – registro alimentar

TA – tecido adiposo

ER – eritrócitos

EC – éster de colesterol

FL – fosfolipídios

TG – triglicerídios

USDA – *United States Department of Agriculture*

r – coeficiente de correlação

I – ingestão real

B – biomarcador

ρ - coeficiente de validade

r_{QB} – coeficiente de correlação entre o questionário de frequência alimentar e o biomarcador

r_{QR} – coeficiente de correlação entre o questionário de frequência alimentar e o método de referência

r_{BR} – coeficiente de correlação entre o biomarcador e o método de referência

ρ_{QI} – coeficiente de validade do questionário de frequência alimentar

ρ_{RI} – coeficiente de validade do método de referência

ρ_{BI} – coeficiente de validade do biomarcador

IC 95% - intervalo de confiança de 95%

n – tamanho amostral

EPIC – *European Prospective Investigation into Cancer*

EPA – *eicosapentaenoic acid* – ácido eicosapentaenóico

DHA – *docosahexaenoic acid* – ácido docosahexaenóico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

UPAs – unidades probabilísticas de amostragem

N₂ – nitrogênio

CCD – cromatografia de camada delgada

v – volume

KCl – cloreto de potássio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

BHT – *Butylated hydroxytoluene* – hidroxitolueno butilado

KHCO₃ – bicarbonato de potássio

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Ácidos graxos que possuem biomarcadores e suas principais fontes alimentares 19

Tabela 2. Estudos que utilizaram o método das tríades para o cálculo do coeficiente de validade do questionário de frequência alimentar, método de referência e biomarcador 35

Capítulo 3

Tabela 1. Cronograma de aplicação dos instrumentos de avaliação do consumo alimentar 46

Tabela 2. Percentual de contribuição de consumo dos alimentos fontes de ácidos graxos trans citados no 1º R24..... 48

Capítulo 4

Table 1. Distribution of fatty acids in serum phospholipids (g/100g of fatty acids) and diet (% of total fatty acids) 64

Table 2. Comparison of fatty acid intake (g/100g fat) assessed by the food frequency questionnaire (Q) and multiple 24 hour recalls (24hR) with phospholipids (PL) fatty acids (g/100g fatty acids)..... 65

Table 3. Validity coefficients of the food frequency questionnaire (Q), multiple 24 hour recalls (24hR) and the biomarkers (B) of fatty acid intake as calculated for the method of triads and the 95% CI (n=81) 66

Table 4. Agreement of quartile assignment (%) between food frequency questionnaire (Q), reference method (R) and biomarker (B), n=81 67

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Método das tríades – comparação triangular entre questionário de frequência alimentar (Q), método de referência (R) e biomarcador (B)	28
---	----

APRESENTAÇÃO

Este trabalho fez parte do Projeto piloto VIVA-DF, desenvolvido numa parceria entre o Departamento de Nutrição (UnB), Departamento de Saúde Coletiva (UnB), Secretaria de Saúde do Distrito Federal e Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS).

Esta dissertação, que abrange a validação do consumo de ácidos graxos com o uso de biomarcadores e aplicação do método das tríades, está estruturada em tópicos da seguinte maneira:

- No capítulo 1, apresenta-se a revisão bibliográfica, contemplando os principais temas abordados na pesquisa. O item 1.4.1 é referente ao texto do artigo “Método das tríades em estudos de validação do consumo alimentar”, submetido à Revista de Saúde Pública, para possível publicação. O conteúdo do artigo abrange alguns assuntos previamente discutidos em outros itens da revisão bibliográfica. As referências deste artigo se encontram ao final da dissertação (capítulo 6), com as demais referências utilizadas nesta dissertação.
- Nos capítulos 2 e 3, encontram-se os objetivos e materiais e métodos, respectivamente, de forma detalhada, abrangendo todo o trabalho.
- No capítulo 4, encontra-se o artigo “*Application of the method of triads in the validation of a fatty acid food frequency questionnaire for a Brazilian adult population*”. O artigo encontra-se em inglês, pois foi encaminhado para avaliação pela a Revista *Annals of Nutrition and Metabolism*. As referências bibliográficas são apresentadas de acordo com as normas da revista e encontram-se no final do artigo.

- No capítulo 5, encontram-se as conclusões gerais, considerando os objetivos do estudo.
- O capítulo 6 apresenta as referências bibliográficas gerais de abrangência de toda a dissertação.
- Finalmente, no capítulo 7, encontram-se os anexos.

RESUMO

Objetivo: Validar o consumo de ácidos graxos dietéticos obtido por meio de um questionário de frequência alimentar (Q) em relação a múltiplos recordatórios de 24 horas (R) e um biomarcador sanguíneo, em uma população acima de 17 anos do Distrito Federal.

Método: O estudo foi realizado com 81 indivíduos selecionados aleatoriamente em duas regiões administrativas do Distrito Federal. Foram realizadas visitas domiciliares para aplicação de 4 R e 2 Q, além da coleta sanguínea para análise de ácidos graxos dos fosfolípidios séricos dos participantes. O método das tríades foi utilizado para verificar a relação entre as 3 variáveis e a ingestão real (I) utilizando o cálculo do coeficiente de validade (ρ). **Resultados:** Os coeficientes de correlação (r) encontrados entre o Q e o R variaram de 0,16 a 0,60. Os ácidos graxos 18:1t ($r_{QR}=0,54$ $p<0,01$; $r_{QB}=0,32$ $p<0,05$; $r_{BR}= 0,38$ $p<0,05$) e 18:2t ($r_{QR}=0,55$ $p<0,01$; $r_{QB}=0,61$ $p<0,05$; $r_{BR}= 0,79$ $p<0,05$) apresentaram correlações moderadas a elevadas para as três variáveis. Os ácidos graxos saturados e monoinsaturados apresentaram os menores coeficientes de correlação ($r=-0,11$ a 0,41). O Q apresentou maiores coeficientes de validade para os ácidos graxos 15:0, 18:2n-6 e 22:6 n-3. Para o 18:1t e 18:2t, coeficientes de validade moderados a elevados foram observados, variando de 0,47 ($\rho_{BI18:1t}$) a 0,93 ($\rho_{BI18:2t}$). **Conclusões:** O questionário de frequência alimentar foi capaz de classificar indivíduos de acordo com a ingestão de ácidos graxos, particularmente para o 15:0, total de ácidos graxos saturados, 18:2 n-6, 18:1t, 18:2t, 22:6 n-3 e total de ácidos graxos n-3. Este Q pode ser considerado um instrumento útil para avaliar a ingestão de ácidos graxos nesta população.

Palavras-chave: método das tríades, consumo de ácidos graxos, questionário de frequência alimentar, fosfolípidios séricos, biomarcadores, lipídios, ácidos graxos trans.

ABSTRACT

Objective: In order to investigate the relationship between fatty acid (FA) intake and chronic diseases in an adult population from Brazil, a FA food frequency questionnaire (Q) validation study was conducted applying the method of triads, using multiple 24 hour recalls as the reference method (R) and serum phospholipids as the biomarker (B).

Methods: Eighty-one randomly selected individuals were home-interviewed for the application of two 60-item Q and four 24hR and collection of blood samples to analyze FA composition of serum phospholipids. The method of triads, using the validity coefficient (ρ), was applied to analyze the relation between the 3 measurements and the true intake (T).

Results: The correlations (r) between the Q and 24hR ranged from 0.16 to 0.60. The *trans* FA 18:1*t* ($r_{QR}=0.54$ $p<0.01$; $r_{QB}=0.32$ $p<0.05$; $r_{BR}=0.38$ $p<0.05$) and 18:2*t* ($r_{QR}=0.55$ $p<0.01$; $r_{QB}=0.61$ $p<0.05$; $r_{BR}=0.79$ $p<0.05$) showed moderate to strong correlations for all three measurements. Saturated and monounsaturated FA showed the weakest correlations ($r=-0.11$ to 0.41). In general, the Q presented the highest validity coefficients for the FA 15:0, 18:2 *n*-6 and 22:6 *n*-3. For 18:1*t* and 18:2*t*, moderate to strong ρ were observed, ranging from 0.47 ($\rho_{BT18:1t}$) to 0.93 ($\rho_{BT18:2t}$). **Conclusions:** The Q was able to rank individuals according to their FA intake, particularly for the 15:0, total saturated FA, 18:2 *n*-6, 18:1*t*, 18:2*t*, 22:6 *n*-3 and total *n*-3 FA. This Q could be a valuable instrument to measure the FA intake in the study population.

Key words: method of triads, fatty acid intake, food frequency questionnaire, serum phospholipids, biomarker, dietary fats, trans fatty acids.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS E O CONSUMO ALIMENTAR

1.1.1. Doenças crônicas não transmissíveis: conceito e epidemiologia

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) se caracterizam por ter uma etiologia incerta, múltiplos fatores de risco, longos períodos de latência, curso prolongado, origem não infecciosa e por estarem associadas a deficiências e incapacidades funcionais. Entre as DCNT mais importantes destacam-se o diabetes, as neoplasias, as doenças cardiovasculares e as respiratórias crônicas (OPAS, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que as DCNT foram responsáveis por aproximadamente 60% das mortes no mundo em 2001 (WHO/FAO, 2002). No Brasil, naquele mesmo ano, as DCNT responderam por 62% das mortes e 39% de internações no Sistema Único de Saúde (Achutti e Azmbuja, 2004).

1.1.2. Consumo alimentar e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis

O aumento na prevalência das DCNT é consequência de múltiplos fatores dentre eles os genéticos. Entretanto, atualmente aceitam-se como fatores de risco principais as mudanças do estilo de vida, associados a avanços tecnológicos nos últimos 50 anos (WHO/FAO, 2003). A industrialização, a urbanização e a globalização da economia ocasionaram melhoria na qualidade de vida, particularmente nos países em desenvolvimento, com impactos significativos no estado de saúde da sua população. Como consequência, ocorreram mudanças no padrão alimentar, com aumento no consumo de alimentos com alta densidade energética, ricos em gordura, principalmente a saturada, e

ricos em carboidratos refinados (WHO/FAO, 2003). Os novos padrões de consumo associados ao sedentarismo da vida moderna contribuíram para o quadro atual de alta prevalência de DCNT. Além do consumo alimentar e inatividade física, tabagismo, consumo excessivo de álcool, excesso de peso, hipertensão arterial e dislipidemias também são considerados fatores de risco para as DCNT (INCA, 2004).

No Brasil, em 2007 foi divulgado o resultado da pesquisa VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Neste estudo, foi verificada a prevalência auto-referida para os principais fatores de risco para DCNT em 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. No DF, a prevalência dos fatores de risco para DCNT foi: tabagismo – 17%, excesso de peso (IMC > 25kg/m²) – 40%, consumo irregular de frutas e hortaliças – 49%, inatividade física – 32%, consumo excessivo de álcool – 16% (VIGITEL, 2007).

Considerando o consumo alimentar um fator de risco modificável para o desenvolvimento de DCNT, tem-se aumentado o interesse em se avaliar a ingestão de alimentos em estudos epidemiológicos. Atualmente, sabe-se que alguns nutrientes, como ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos trans (AGT), colesterol e carboidratos refinados, possuem efeito promotor, enquanto outros, como fibras, fitoesteróis, ácidos graxos *n*-3 (AG *n*-3) e ácidos graxos monoinsaturados (AGM), apresentam efeito protetor no desenvolvimento das DCNT (WHO/FAO, 2002).

No entanto, a avaliação do consumo alimentar é considerada mais complexa do que a maioria dos fatores de risco para as DCNT. Um dos motivos é o fato da dieta estar relacionada a várias exposições fortemente correlacionadas entre si (ex.: todos os indivíduos consomem gorduras, fibras e vitamina A). Além disso, os indivíduos desconhecem a composição dos alimentos que consomem, sendo esta estimativa feita de maneira indireta pelo relato do consumo de alimentos ou por medidas bioquímicas, estando,

portanto, sujeita a erros (Willett, 1998a).

1.1.3. Ácidos graxos dietéticos e doenças crônicas não transmissíveis

O interesse em conhecer o consumo de diferentes ácidos graxos teve início na década de 60, quando foi realizado o “*Seven Countries Study*” (Finlândia, Grécia, Itália, Japão, Estados Unidos, Iugoslávia e Holanda), devido a baixa prevalência de doenças coronarianas (DC) no sudeste europeu (Keys, 1984). Neste estudo foi observado que os ácidos graxos saturados apresentavam forte correlação com a incidência e mortalidade por DC ($r=0,84$). Além disso, foi observado que o consumo total de gordura não estava relacionado com o desenvolvimento de DC, pois tanto os países com baixa, quanto os com elevada prevalência de DC apresentaram semelhante percentual de consumo do total de energia proveniente de lipídios (Willett, 2005).

A partir do estudo de Hegsted (1986) foi possível observar que os níveis de colesterol sanguíneo estavam diretamente relacionados com o consumo de AGS e inversamente relacionados com a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados (AGP). Estes trabalhos serviram como base para as recomendações dietéticas dos anos 60 e 70 em vários países desenvolvidos, como Estados Unidos, Reino Unido e Austrália, onde os AGS deveriam ser substituídos pelos AGP (Willett, 2005). Com isso, nos 25 anos seguintes, o consumo de AGP em vários países praticamente dobrou e as taxas de DC reduziram em aproximadamente 50% (Willett, 1998b). No entanto, os pesquisadores notaram que essa redução provavelmente não era reflexo apenas da alteração no tipo de gordura consumida, mas de um conjunto de fatores (Willett, 2005).

Na década de 80, considerando que a maioria da população provavelmente teria dificuldades em entender as diferenças entre os tipos de gordura, os países ocidentais

passaram a recomendar uma redução no consumo total de lipídios, apesar do objetivo ser a redução do consumo de AGS. Com isso, foi disseminada a idéia de que o consumo de gorduras fazia mal à saúde, influenciando vários guias de recomendação dietética no mundo inteiro, como o proposto pela Organização Mundial de Saúde. A produção de produtos livres de gordura cresceu, sendo a gordura substituída, muitas vezes, por carboidratos refinados. Nesta mesma época a obesidade teve grande aumento nos Estados Unidos e países do nordeste europeu. No final da década de 80, houve uma redução do declínio da mortalidade por DC, atingindo um platô (Willett, 2005).

Meninsk e Katan foram um dos pioneiros a estudar a relação entre o consumo dos ácidos graxos monoinsaturados (Meninsk e Katan, 1987) e de configuração trans (Meninsk e Katan, 1990) no desenvolvimento das DCNT. Em um de seus estudos, os autores compararam o efeito da substituição de AGS por AGM e carboidratos complexos. Observou-se uma redução nos níveis de colesterol total sanguíneo em ambos os grupos. No entanto, na dieta rica em carboidrato, houve aumento dos triglicerídios e redução da lipoproteína de alta densidade (HDL) (Meninsk e Katan, 1987). Em estudo subsequente, os autores compararam o efeito da substituição de 10% de AGS por AGT, proveniente de óleos parcialmente hidrogenados. Apesar da lipoproteína de baixa densidade (LDL) ter sido semelhante entre os grupos, o grupo que recebeu a dieta rica em AGT apresentou redução nos níveis de HDL, alterando a razão LDL/HDL (Meninsk e Katan, 1990).

Atualmente, sabe-se que o tipo de ácido graxo (AG) consumido tem grande influência no desenvolvimento das DCNT. Existe consenso de que os AG láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) elevam os níveis de LDL. No entanto, o ácido esteárico (18:0), que também é um AGS, tem um efeito neutro ou um pequeno efeito de redução nos níveis de LDL. Além disso, o ácido oleico (18:1 n -9) reduz o LDL e aumenta o HDL, enquanto o seu isômero *trans* – o ácido elaídico (18:1 t 9) – aumenta o LDL e reduz os

níveis de HDL. Os ácidos graxos poliinsaturados de origem marinha, como o eicosapentaenóico (20:5n-3) e docosahexaenóico (22:6n-3) reduzem os níveis de triglicerídios plasmáticos. Por isso, torna-se importante avaliar a ingestão de cada ácido graxo individualmente (Cantwell, 2000).

1.2. VALIDAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

1.2.1. Métodos de avaliação do consumo alimentar

1.2.1.1. Recordatório de 24 horas (R24)

O R24 é um instrumento de avaliação do consumo alimentar onde o entrevistador solicita ao participante informações detalhadas sobre o consumo das 24 horas anteriores ou do dia anterior (Buzzard, 1998). Trata-se de um método que avalia o consumo atual por meio da ingestão absoluta dos nutrientes. Esta técnica apresenta como vantagens o fato de poder ser aplicada em populações com baixa escolaridade e não alterar o hábito alimentar do entrevistado (Fisberg, Martini e Slater, 2005).

Os erros de medidas dos recordatórios de 24 horas estão relacionados com a memória do entrevistado, que varia de acordo com sexo e idade e com dificuldades na estimativa da porção consumida de cada alimento relatado (Pereira e Sichieri, 2007). Além disso, o entrevistador deve ser bem treinado para que a entrevista seja conduzida de maneira a auxiliar o participante a recordar os alimentos consumidos sem influenciá-lo na resposta. Outra desvantagem deste método é que a aplicação de um R24 não representa o hábito alimentar do indivíduo. Por isso, quando o objetivo é conhecer o consumo habitual de uma população, há a necessidade de se utilizar múltiplos R24 (Freedman et al, 2004).

Ao utilizar múltiplos R24, recomenda-se que os dias de aplicação não sejam consecutivos, pois além de reduzir a motivação do indivíduo, o consumo entre dias consecutivos é correlacionado, aumentando as fontes de erro na estimativa da ingestão alimentar (Buzzard, 1998).

O número de dias necessários para a aplicação do R24 vai depender do nível de precisão desejado e do nutriente de interesse. Por exemplo, se o interesse for conhecer o consumo de vitamina A (nutriente com elevada variação intrapessoal) em uma população, faz-se necessária a aplicação de 20 a 50 R24 para se conhecer o consumo habitual do indivíduo. Entretanto, para os macronutrientes, recomenda-se que sejam utilizados de 3 a 10 recordatórios (Gibson, 2005).

Para que este instrumento seja utilizado em estudos de validação do consumo alimentar, é necessário que ele forneça informações acuradas, principalmente em relação ao tamanho das porções ingeridas. O R24 tende a superestimar a ingestão de nutrientes em aproximadamente 10%. Além disso, o programa para o cálculo dos nutrientes deve ser confiável. Ao se comparar o teor de nutrientes dos alimentos estimados por meio de tabelas de composição com a análise dos alimentos, observou-se uma subestimação de 5 a 10% pelas tabelas de alimentos, provavelmente por estas não apresentarem informações completas do teor de nutrientes para todos os alimentos. Finalmente, o R24 deve estimar a ingestão habitual de maneira precisa. Para avaliar a precisão desta estimativa, o R24 pode ser comparado com outros instrumentos, como registro alimentar ou biomarcadores (Buzzard, 1998).

1.2.1.2. Questionário de frequência alimentar (Q)

Atualmente o Q é considerado o melhor instrumento para avaliar o consumo alimentar a longo prazo em estudos epidemiológicos que relacionam a alimentação com a ocorrência de DCNT (Slater et al, 2003). Neste método, o entrevistado relata a frequência habitual de consumo de cada item de uma lista pré-definida de alimentos em relação a um determinado período de tempo (Subar et al, 2001). As principais vantagens deste instrumento são a rapidez e a eficiência na prática epidemiológica para identificar o consumo habitual de alimentos (Lopes et al, 2003). O Q é composto basicamente por uma lista de alimentos e a frequência de consumo, podendo ou não incluir o tamanho das porções consumidas dos alimentos (Cade, 2002). Geralmente, o tempo de referência do Q é o ano precedente, podendo variar de acordo com o objetivo do estudo e nutrientes de interesse (Slater et al, 2003)

Para compor a lista de alimentos de um Q, um alimento é considerado informativo quando é consumido com certa frequência por um número razoável de indivíduos, quando contém uma quantidade significativa do nutriente de interesse ou quando seu consumo varia entre os indivíduos. Se existir na lista dois alimentos com consumo fortemente correlacionado, não é necessário incluir estes dois alimentos no Q (Willett, 1998c).

Várias técnicas foram propostas para elaboração da lista de alimentos do Q. Dentre elas destaca-se a proposta por Willett (1998c) e outra proposta por Block (1986). Willett (1998c) recomenda o cálculo da contribuição de cada alimento para variação interpessoal de cada nutriente de interesse por meio de análise de regressão *stepwise*, onde a variável dependente seria a ingestão total do nutriente de interesse e as variáveis independentes o teor do nutriente de interesse em cada alimento consumido. Esta técnica permite identificar os alimentos que mais discriminam os indivíduos de acordo com sua ingestão. O método

proposto por Block et al (1986) permite conhecer quais os alimentos que mais contribuem para ingestão total do nutriente de interesse, a partir da aplicação de um R24. Os alimentos relatados no R24 devem ser ordenados de acordo com o seu percentual de contribuição para cada nutriente de interesse. Os alimentos que contribuem com até 90% da ingestão total devem fazer parte da lista de alimentos (Block et al, 1986).

A frequência de consumo pode ser registrada em várias unidades de tempo, como dias, semana ou anos. Geralmente, são utilizadas perguntas simples e respostas fechadas, que variam de 5 a 10 opções (Slater et al, 2003).

Outro aspecto importante do Q é a descrição das porções consumidas de cada alimento. O uso de porções pré-definidas em pequena, média e grande tem apresentado vantagem, por facilitar o entendimento pelo entrevistado (Willett, 1998c).

1.2.1.3. Biomarcadores do consumo de nutrientes

Os marcadores biológicos são medidas ou dosagens de nutrientes em fluidos, tecidos e excreções corporais que indicam o *status* nutricional em relação à ingestão ou metabolismo de nutrientes (Potischman e Freudenheim, 2003). Estudos epidemiológicos têm utilizado biomarcadores com o objetivo de substituir a estimativa de ingestão dietética atual; avaliar a quantidade de nutriente disponível nos tecidos após absorção e metabolismo; ou como medidas complementares em estudos de validação da ingestão alimentar (Hunter, 1998; Potischman e Freudenheim, 2003). Para que os biomarcadores sejam utilizados em estudos de validação, é necessário que eles apresentem relação direta com os nutrientes ingeridos (sensibilidade à ingestão) (Blanck et al, 2003).

A principal vantagem do uso de biomarcadores em estudos de validação é a existência de erros independentes dos métodos tradicionais de avaliação do consumo alimentar (Bingham, 2002). Por exemplo, a concentração dos marcadores biológicos é

independente da memória do indivíduo, da biodisponibilidade do nutriente no alimento e das tabelas de composição nutricional – fatores relacionados ao Q e R24 – sendo considerados medidas mais objetivas da ingestão dietética (Hunter, 1998; Marshall, 2003).

No entanto, os biomarcadores sofrem influência de fatores além da ingestão alimentar, como metabolismo, absorção e excreção de nutrientes e, apesar de se conhecer biomarcadores para vários nutrientes, ainda existem nutrientes que não possuem marcadores biológicos (Potischman, 2003). Estes marcadores também estão sujeitos a erros inerentes à análise laboratorial e, por isso, é necessária a utilização de técnicas de controle de qualidade durante a coleta, armazenamento e análise das amostras biológicas (Hunter, 1998). Outra limitação é o tempo de referência, pois muitos biomarcadores refletem a ingestão a curto prazo, o que não é interessante para estudos epidemiológicos que estudam a relação entre dieta e doenças crônicas. Para tentar reduzir esta fonte de erros, recomenda-se a coleta de amostras repetidas durante um longo período de tempo (Van't Veer et al, 1993).

Segundo Kaaks et al (2002) os biomarcadores podem ser classificados em:

- Marcadores de recuperação:

Referem-se a medidas precisas e quantitativas do balanço fisiológico entre a ingestão e excreção de um composto. Exemplos: nitrogênio urinário de 24 horas (marcador da ingestão de proteínas), excreção urinária de potássio e sódio (ingestão de potássio e sódio) e água duplamente marcada (marcador do consumo energético) (Kaaks et al, 2002).

Os marcadores de recuperação apresentam relação quantitativa direta com a ingestão alimentar, sendo considerados medidas de referência válidas. Por exemplo, sabe-se que para qualquer indivíduo em balanço energético e protéico, o nitrogênio urinário de 24 horas corresponde a aproximadamente 80% da ingestão de proteínas. Considerando que a concentração de nitrogênio em diferentes tipos de proteína é relativamente constante, é

possível estimar o consumo protéico absoluto de um indivíduo a partir da quantidade de nitrogênio excretada na amostra urinária de 24 horas (Kaaks et al, 2002).

- Marcadores de concentração:

São marcadores baseados na concentração de um composto específico, em um determinado período de tempo. A concentração pode ser avaliada em diferentes tecidos como plasma sanguíneo (vitamina C, carotenóides), frações lipídicas (perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios), tecido adiposo (ácidos graxos, tocoferóis) (Potischman, 2003).

Os biomarcadores de concentração não podem ser transformados em níveis de ingestão absoluta, mas apenas fornecer uma correlação com o consumo alimentar obtido por inquéritos (Q, R24, etc). Além disso, seus níveis são expressos sem nenhuma unidade de tempo, diferente dos biomarcadores de recuperação (ex.: água duplamente marcada – permite o cálculo do gasto energético diário) (Kaaks et al, 2002).

1.2.2. Processo de validação do consumo alimentar

Em estudos epidemiológicos, o Q é considerado o instrumento mais apropriado para avaliar o consumo alimentar, devendo ser validado para cada população específica. Entretanto, a inexistência de um método padrão-ouro de avaliação do consumo alimentar dificulta a estimativa da ingestão nutricional real em estudos populacionais (Willett e Lenart, 1998). Por isso, o Q muitas vezes, é comparado a um método de referência (R), como múltiplos R24 ou registro alimentar (RA) de vários dias.

Uma das limitações de se utilizar inquéritos alimentares como método de referência (múltiplos R24 ou RA) nos estudos de validação é que os erros de medidas de ambos os instrumentos estão correlacionados, ou seja, tanto o instrumento que está sendo testado (Q) quanto o de referência (R) estão sujeitos aos mesmos tipos de erros aleatórios e

sistemáticos, como vieses de memória, do entrevistador e erro na estimativa da ingestão alimentar. Esta limitação pode superestimar a correlação entre o R e o Q (Beydoun et al, 2007).

Neste contexto, o uso de marcadores biológicos do consumo alimentar pode ser vantajoso, uma vez que os erros aleatórios dos biomarcadores são considerados independentes dos erros inerentes aos inquéritos nutricionais. No entanto, para incluir as estimativas de ingestão do biomarcador no modelo de erros de medida, os erros aleatórios não devem ser correlacionados ao longo do tempo, o que é observado apenas com o uso de biomarcadores de recuperação. Entretanto, foram identificados biomarcadores de recuperação para poucos nutrientes até o momento. Pelo fato deste tipo de marcador biológico fornecer medidas absolutas da ingestão dietética, os mesmos podem substituir os métodos de referência nos estudos de validação, pois estes biomarcadores possuem erros não correlacionados com o Q (Kaaks et al, 2002).

Uma das soluções propostas para os nutrientes que não possuem biomarcadores de recuperação é o ajuste por energia, uma vez que o consumo energético total está relacionado com outros fatores além da ingestão alimentar. Este ajuste também pode ser realizado quando uma das fontes de erro do Q for devido ao sub-relato dos indivíduos, pois o ajuste por energia parece reduzir as correlações entre os erros aleatórios do Q e R (Kaaks et al, 2002).

1.2.2.1. Ajuste por energia

Willett e Stampfer (1986) recomendam o ajuste dos nutrientes pela energia consumida em estudos epidemiológicos, pois o consumo de energia pode ser um determinante primário do desenvolvimento de doenças; as diferenças individuais da ingestão calórica produzem variação na ingestão de nutrientes específicos, uma vez que o consumo da maioria dos nutrientes apresenta correlação positiva com o total de energia; e o consumo de energia, mesmo quando não é considerado causa direta de doença, pode confundir os

efeitos de nutrientes específicos no desenvolvimento de doenças (Willett e Stampfer, 1986).

Na prática, o ajuste por energia pode ser comparado aos estudos realizados com animais, onde são fornecidas dietas isocalóricas para se verificar o efeito do consumo de diferentes quantidades de nutrientes entre os diferentes grupos (Willett e Stampfer, 1986).

A variação interpessoal da ingestão energética é influenciada pelo tamanho corporal, nível de atividade física e eficiência metabólica de cada indivíduo. Todos esses fatores podem confundir as relações da ingestão absoluta de um nutriente e o risco de desenvolvimento de doenças. Além disso, as medidas absolutas de ingestão contêm, geralmente, grau de medida de erros substancial, que pode ser reduzido com o ajuste por energia (Plummer e Kaaks, 2003).

1.3 VALIDAÇÃO DO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS

1.3.1. Dificuldades inerentes à estimativa de ingestão de gorduras e ácidos graxos

O interesse em se utilizar biomarcadores do consumo de ácidos graxos dietéticos surgiu com o papel controverso do consumo de ácidos graxos e as doenças crônicas. Entre as dificuldades inerentes à avaliação do consumo de gorduras pelos inquéritos nutricionais, destacam-se (Cantwell, 2000; Arab, 2003):

- tendência ao sub-relato dos indivíduos, em especial dos obesos, devido às implicações sociais do consumo de gorduras;
- deficiência dos bancos de dados em relação à composição de ácidos graxos dos alimentos;

- dificuldade de se reconhecer e quantificar todos os alimentos fontes de gorduras consumidos, como quantidade de óleo adicionada em cada preparação, que muitas vezes foi feita por outra pessoa que não o entrevistado;
- variação do teor de ácidos graxos, em especial dos AGT, nas diferentes marcas de um determinado alimento ou produto fonte de gordura.

1.3.2. Biomarcadores do consumo de ácidos graxos dietéticos

Para avaliar o consumo de AG ainda inexistem biomarcadores de recuperação. Os biomarcadores de concentração mais utilizados nos estudos de validação da ingestão de AGs são: o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo (TA), da membrana dos eritrócitos (ER), do plasma e soro total e das frações éster de colesterol (EC), fosfolipídios (FL) e triglicerídios (TG) séricas e plasmáticas (Cantwell, 2000). A composição de ácidos graxos do TA parece refletir o consumo a longo prazo, devido ao seu lento *turnover* (1 a 2 anos) (Cantwell et al, 2004). Os demais métodos são considerados menos invasivos podendo refletir o consumo do dia anterior (TG), o consumo de semanas (EC) ou meses anteriores (FL, ER) (Arab e Akbar, 2002).

A análise da concentração dos AG em amostras biológicas deve considerar os processos de síntese, alongação e dessaturação que ocorrem endogenamente (Arab e Akbar, 2002). Os AG marcadores que melhor refletem a sua ingestão são aqueles que não apresentam síntese endógena ou são sintetizados em pequenas quantidades (tabela 1). Por isso, espera-se que o AGS e AGM de tecidos biológicos apresentem baixa correlação com sua ingestão. No entanto, apesar dos AGS apresentarem síntese endógena, isso raramente ocorre quando o consumo de energia é adequado e o consumo de gorduras é superior a 25% (Arab e Akbar, 2002). A interpretação destes marcadores deve ser feita de maneira

cuidadosa, pois muitas vezes são expressos como percentual relativo do total de ácidos graxos, ou seja, o aumento na ingestão de um AG resulta na redução relativa de outro AG (Hunter, 1998).

Tabela 1. Ácidos graxos que possuem biomarcadores e suas principais fontes alimentares.

Ácido Graxo	Principais fontes alimentares	Referência
15:0 e 17:0	Produtos lácteos	Smedman et al, 1999
18:2 n -6	Óleos vegetais (ex.: milho, soja e canola)	Martin et al, 2006
18:3 n -3	Óleo de linhaça	Martin et al, 2006
20:4 n -6	Peixes de água doce (ex.: tilápia)	Martin et al, 2006
20:5 n -3 e 22:6 n -3	Peixes de origem marinha (ex.: sardinha e salmão)	Katan, Zock, Meninsk, 1994
18:1-9 t ; 18:2-9 t 12	Produtos que contêm óleos parcialmente hidrogenados em sua composição	Gebauer, Psota, Kris-Etherton, 2007
16:1 t ; 18:1-11 t ; 18:2-9 t 11 e 18:2-10 c 12	Carne de ruminantes e produtos lácteos	Gebauer, Psota, Kris-Etherton, 2007

1.3.3. Estudos de validação do consumo de ácidos graxos dietéticos

Devido às dificuldades inerentes à avaliação do consumo de gorduras pelos inquéritos nutricionais, a maioria dos estudos de validação do consumo de AG dietéticos tem utilizado biomarcadores (Arab, 2003). Entre os biomarcadores mais utilizados, destaca-se o perfil de AG do tecido adiposo, pois o seu período de referência (1 a 2 anos) se aproxima do tempo de referência do Q, principalmente quando o objetivo é relacionar o consumo de determinados AG com as DCNT (Hunter, 1998). No entanto, a análise de AG do tecido adiposo é considerada invasiva e dispendiosa (Arab, 2003) e, alguns estudos, ao comparar o perfil de AG do TA com o de outras amostras biológicas, mostraram resultados

semelhantes ao tecido adiposo (Kabagambe et al, 2001; Baylin et al, 2005; Brevik et al, 2005). É importante ressaltar que, mesmos os estudos pioneiros de validação do consumo de AG já analisavam o consumo e perfil de ácidos graxos trans em diferentes amostras biológicas (London et al, 1991; Nikkari et al, 1995; Garland et al, 1998).

Um dos primeiros estudos de validação do consumo de AG foi realizado com 115 mulheres americanas no período pós-menopausa, em 1987 (London et al, 1991). As voluntárias responderam um Q previamente validado em relação ao registro alimentar de 28 dias, que continha 116 itens. Os dados do Q foram comparados ao perfil de AG do tecido adiposo, onde foram encontradas correlações moderadas para os AGP ($r=0,37$), AG $n-3$ de origem marinha ($r=0,48$) e AGT ($r=0,51$). Entretanto, foram encontradas correlações baixas para os AGS ($r= 0,16$) e AGM ($r=0,07$). Posteriormente, em estudo realizado com uma sub-amostra do “*The Nurses’ Health Study*”, onde o perfil de AG do tecido adiposo também foi utilizado como biomarcador, porém comparado com dados de registro alimentar de 2 semanas e 2 Q, foi encontrada correlação mais baixa para os AGT ($r=0,40$) e correlação moderada para o 18:2 $n-6$ ($r=0,37$). Neste estudo, foi feita a análise de 84 alimentos para se estimar o consumo de AGT (Garland et al, 1998).

O estudo de Nikkari et al (1995) foi um dos pioneiros a utilizar o perfil de ácidos graxos de frações lipídicas do soro sangüíneo como marcadores do consumo de AG dietéticos. Neste estudo, o consumo alimentar foi estimado pelo registro alimentar de 7 dias em 84 indivíduos finlandeses, no ano de 1983. Os autores encontraram correlações moderadas a altas para os ácidos graxos $n-6$ (AG $n-6$) e 20:5 $n-3$ ($r=0,36$ a 0,73) nos triglicerídios, fosfolipídios e éster de colesterol séricos. Diferente dos estudos anteriores, foram encontradas correlações moderadas para os AGS no TG ($r=0,57$) e EC ($r=0,54$). Entretanto, não foram encontradas correlações positivas entre o consumo de AGM e seu perfil nas três frações séricas analisadas (Nikkari et al, 1995).

Em 1989, foi realizado um estudo para avaliar o risco de aterosclerose em comunidades americanas (ARIC – “*Atherosclerosis Risk in Communities*”), onde os perfis de AG das frações EC e do FL foram comparados com o consumo de AG estimado por um Q de 66 itens previamente validado. Novamente, as menores correlações foram encontradas para AGS ($r_{EC}=0,23$ e $r_{FL}= 0,15$) e AGM ($r_{EC}=0,01$ e $r_{FL}= 0,05$). As maiores correlações foram encontradas para o 22:6n-3 ($r_{EC}=0,58$ e $r_{FL}= 0,55$) (Ma et al, 1995).

Estudos do tipo caso-controle também são considerados úteis na validação do consumo alimentar. Os resultados de 4 estudos caso-controle realizados no período de 1987 a 1992 foram publicados por Zock et al (1997), utilizando o perfil de AG da fração EC como biomarcador do consumo de AG. Os autores observaram que cada 10% de energia consumida como ácido linoleico (18:2n-6) correspondia a um aumento de 9,3g/100g de AG de 18:2n-6 no EC. Para o ácido oléico, o aumento foi de 6,5g/100 de AG no EC; e para os AGT, este aumento foi de 1,1g/100g de AG no EC. Este tipo de análise é particularmente interessante para estudos experimentais, pois é possível estimar o grau de adesão dos indivíduos às modificações dietéticas propostas (Zock et al, 1997). Um estudo randomizado de intervenção realizado com mulheres no período pós-menopausa (n=66) comparou a alteração no perfil de AG dos ER e frações EC e FL plasmáticas em resposta a uma dieta com baixo (17%) e moderado (34%) teor de lipídios (% de energia). Os autores concluíram que os AGS, AGM, AG n-6 e os AG que não apresentam síntese endógena foram sensíveis às dietas consumidas e que, o perfil de AG dos três biomarcadores atuou de forma semelhante (King, Lemaitre e Kestin, 2005).

No estudo realizado em uma amostra da Costa Rica (n=503) com o objetivo de verificar quais os AG do tecido adiposo poderiam ser considerados biomarcadores adequados do seu consumo em relação a um Q previamente validado, os melhores indicadores do consumo de AGT foram $tc18:2n-6$ ($r=0,58$) e $ct18:2n-6$ ($r=0,58$). Os AG

15:0 e 17:0 apresentaram as melhores correlações com o consumo de produtos lácteos ($r_{15:0}=0,31$; $r_{17:0}=0,31$) e o 22:6n-3 para a ingestão de peixes ($r=0,15$) (Baylin et al, 2002).

O estudo realizado com 105 adultos irlandeses analisou 225 alimentos em relação ao teor de AG para utilizá-los na estimativa do consumo de AG. Os autores compararam o perfil de AG do tecido adiposo com o seu consumo por meio de um Q e história dietética. Ao comparar o Q e biomarcador (B), foram encontradas correlações moderadas para o 18:2n-6 ($r=0,49$) e baixa para o AGT ($r=0,17$) (Cantwell et al, 2004).

Em estudo recente com o objetivo comparar o perfil de AG plasmático e o eritrocitário em relação ao consumo de AG, estimado por meio de um Q previamente validado, foram observadas maiores correlações para o 20:5n-3 ($r=0,38$), 22:6n-3 ($r=0,56$) e AGT ($r=0,43$) dos eritrócitos. Os autores concluíram que os AG de origem marinha e os de configuração *trans* dos ER podem ser considerados biomarcadores adequados do consumo destes AG (Sun et al, 2007).

Alguns estudos têm avaliado alimentos marcadores da ingestão de determinados ácidos graxos em relação ao perfil de AG em diferentes amostras biológicas. Em 1995, foi realizado um estudo com 234 mulheres da Noruega, com o objetivo de verificar a relação entre o consumo de peixes e produtos marinhos e perfil de AG no FL. Os autores encontraram correlações moderadas para o 20:5n-3 ($r=0,58$) e 22:6n-3 ($r=0,53$) (Hjartaker, Lund, Bjerve, 1997).

A validação de questionários de frequência alimentar com enfoque no consumo de AGT se tornou mais precisa a partir a década de 90, quando os bancos de dados começaram a informar o conteúdo de AGT nos alimentos, como mostra o estudo de Lemaitre et al (1998), que utilizou como banco de dados as informações do *United States Department of Agriculture* (USDA). Este estudo foi realizado com 51 indivíduos residentes em

Washington. Para estimar o consumo de gorduras foi utilizado um Q previamente validado em relação a 16 R24 ($r=0,74$ para energia proveniente da gordura). Ao comparar ingestão total de AGT (2,24g – 5% do total de gorduras da dieta) com o seu perfil no tecido adiposo, foi encontrada correlação de 0,67 para homens e 0,58 para mulheres (Lemaitre et al, 1998).

O perfil de AGT nos FL plasmáticos foi testado como biomarcador do consumo de margarina e manteiga, em estudo realizado na Nova Zelândia. Os autores encontraram correlações moderadas a elevadas para os isômeros *trans* ($r= 0,57$ a $0,63$), com exceção do 18:1*n-7t* ($r=0,30$) ao comparar o perfil destes AG com o consumo do total de lipídios das margarinas (Skeaff e Gowans, 2006).

Ao avaliar o uso do ácido linoleico conjugado (18:2-*c9t11*) nas frações FL e TG plasmáticas como biomarcadores do seu consumo, o estudo realizado na Alemanha encontrou correlações moderadas ($r= 0,36$), quando o consumo foi estimado em relação ao registro de dois dias anteriores à coleta de sangue (Fremann, Liseisen e Wolfram, 2001).

Alguns estudos têm sido realizados com objetivo de validar o consumo de AG *n-3* em relação a biomarcadores, especialmente devido ao seu efeito protetor em relação as DCNT. O estudo de Kuriki et al (2003), realizado com 94 nutricionistas japoneses, encontrou correlações moderadas a elevadas ($r= 0,30$ a $0,60$), ao comparar o perfil dos AG *n-3* de cadeia longa (20:5*n-3* e 22:6*n-3*) plasmáticos com seu consumo, estimado pelo registro alimentar de 7 dias (Kuriki et al, 2003).

Em estudo realizado com uma sub-amostra do “*European Prospective Investigation into Cancer*” (EPIC) do Reino Unido foi analisada a relação do consumo de peixes por diferentes instrumentos (Q, registro alimentar de 7 dias, 1 R24 e questionário de fatores de saúde e estilo de vida) e o perfil de AG *n-3* nos FL plasmáticos. Foram observadas correlações baixas para o EPA e DHA dos fosfolipídios plasmáticos em homens ($r_{EPA}=0,20$ a $0,27$; e $r_{DHA}= 0,12$ a $0,25$) e mulheres ($r_{EPA}=0,19$ a $0,22$; e $r_{DHA}= 0,12$ a

0,24). Além disso, os autores verificaram que o consumo de peixe e óleo de peixe explicou apenas 20 e 25% da variação do perfil AG *n*-3 no FL plasmático em homens e mulheres, respectivamente. Estes resultados sugerem a existência de outros fatores, além da ingestão destes alimentos, que afetam a concentração destes AG na circulação sanguínea (Welch et al, 2006).

O estudo realizado com 53 adultos residentes na Austrália verificou a validade de um Q de 28 itens com enfoque em AG *n*-3 de cadeia longa em relação ao perfil destes AG nos ER e plasma sanguíneo. Os autores encontraram correlações moderadas para o EPA, DHA e total de AG *n*-3 de cadeia longa eritrocitários ($r= 0,39$ a $0,50$) e plasmáticos ($r= 0,48$ a $0,54$) (Sullivan, Williams e Meyer, 2006).

A relação entre o consumo de gorduras provenientes de leite e derivados e o perfil de 14:0, 15:0 e 17:0 em diferentes amostras biológicas (tecido adiposo, FL e EC plasmáticos) têm sido estudada por um grupo de pesquisadores da Suécia (Wolk et al, 1998; Smedman et al, 1999; Wolk, Furuheim, Vessby, 2001) e da Noruega (Brevik et al, 2005). Estes AG com número ímpar de carbonos não são sintetizados por humanos, mas por bactérias presentes no rúmen de ruminantes. Em estudo realizado para comparar o perfil de destes AGs em diferentes tecidos – TA, EC e FL séricos – em relação ao consumo de produtos lácteos (14 R24), foram observadas correlações positivas para 14:0 ($r_{TA}=0,64$; $r_{CE}= 0,34$; $r_{FL}= 0,30$), 15:0 ($r_{TA}=0,74$; $r_{CE}= 0,45$; $r_{FL}= 0,50$) e 17:0 ($r_{TA}=0,23$; $r_{CE}= 0,47$; $r_{FL}= 0,39$) e o consumo destes alimentos (Wolk, Furuheim, Vessby, 2001). O 15:0 parece refletir melhor a ingestão de produtos lácteos do que o 17:0 (Brevik et al, 2005) ou 14:0 (Wolk, Furuheim, Vessby, 2001).

1.4. MÉTODO DAS TRÍADES

1.4.1. Métodos das tríades em estudos de validação do consumo alimentar

1.4.1.1. Introdução

A Organização Mundial de Saúde têm enfatizado a importância do consumo alimentar no desenvolvimento e prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis (WHO/FAO, 2002). Entretanto, a inexistência de um método padrão-ouro de avaliação do consumo da maioria de nutrientes ainda é um fator limitante na estimativa da ingestão nutricional real em estudos epidemiológicos (Lopes et al, 2003).

O instrumento comumente utilizado na avaliação do consumo alimentar é o questionário de frequência alimentar (Q), que deve ser validado para a população específica a que se destina. No processo de validação de um Q, muitas vezes, utiliza-se como método de referência múltiplos recordatórios de 24 horas (R24) ou registro alimentar (RA) de vários dias. A aplicação de múltiplos R24 ou RA é usada para a reduzir a variação intra e interpessoal (Willett, 1998c).

Uma das limitações de se utilizar inquéritos alimentares como método de referência (múltiplos R24 ou RA) nos estudos de validação é que tanto o instrumento que está sendo testado (Q), quanto o de referência estão sujeitos aos mesmos tipos de erros aleatórios e sistemáticos, como vieses de memória, do entrevistador e erro na estimativa da ingestão alimentar (Vaz et al, 2006).

Neste contexto, o uso de marcadores biológicos pode oferecer vantagens, uma vez que os erros aleatórios dos biomarcadores são independentes dos erros inerentes aos inquéritos nutricionais (Potischman e Freudenheim, 2003). Contudo, os biomarcadores não substituem os métodos de avaliação do consumo alimentar tradicionais. Eles devem ser utilizados como medidas adicionais, devido à inexistência de marcadores biológicos para

determinados nutrientes e pelo fato de muitos biomarcadores serem influenciados por fatores além da ingestão alimentar, como absorção, metabolismo, fatores genéticos e biodisponibilidade (Dixon et al, 2006). Além disso, as técnicas de análise de alguns biomarcadores são dispendiosas, nem sempre sendo realizadas em estudos epidemiológicos (Kabagambe et al, 2001).

Quando as três variáveis são avaliadas em um estudo, Kaaks (1997) recomenda o uso da técnica de triangulação ou método das tríades. Este método permite a comparação do consumo alimentar estimado pelo Q, R e B com a ingestão real (mas desconhecida) por meio do coeficiente de validade (ρ) (Kaaks, 1997).

1.4.1.2. Tipos de biomarcadores da ingestão de nutrientes

De acordo com Kaaks (1997), os biomarcadores da ingestão alimentar podem ser classificados em:

Marcadores de recuperação:

Medidas precisas e quantitativas do balanço fisiológico entre a ingestão e excreção de um composto. Exemplos: nitrogênio urinário de 24 horas (marcador da ingestão de proteínas), excreção urinária de potássio (ingestão de potássio) e água duplamente marcada (marcador do consumo energético) (Kaaks et al, 2002).

Os marcadores de recuperação apresentam relação quantitativa direta com a ingestão alimentar. Por exemplo, sabe-se que, para qualquer indivíduo em balanço energético e protéico, o nitrogênio urinário de 24 horas corresponde a aproximadamente 80% da ingestão de proteínas. Considerando que a concentração de nitrogênio em diferentes tipos de proteína é relativamente constante, é possível estimar o consumo protéico absoluto de um indivíduo a partir da quantidade de nitrogênio excretada na amostra urinária de 24 horas (Kaaks et al, 2002).

Marcadores de concentração:

São marcadores baseados na concentração de um composto específico, em um determinado período de tempo. A concentração pode ser avaliada em diferentes tecidos como plasma sanguíneo (vitamina C, carotenóides), frações lipídicas (perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios), tecido adiposo (ácidos graxos, tocoferóis) e fluidos corporais (saliva) (Potischman, 2003).

Os biomarcadores de concentração não podem ser transformados em níveis de ingestão absoluta, mas apenas fornecer uma correlação com o consumo alimentar obtido por inquéritos (Q, R, etc). Além disso, seus níveis são expressos sem nenhuma unidade de tempo, diferente dos biomarcadores de recuperação (ex.: água duplamente marcada – permite o cálculo do gasto energético diário) (Kaaks et al, 2002). O método das tríades vem sendo aplicado em estudos que utilizaram biomarcadores de concentração (Kabagambe, 2001; Fowke, Hebert e Fahey, 2002; Brevik et al, 2005; McNaughton, Hughes e Marks, 2007).

1.4.1.3. Método das tríades: conceito (Kaaks, 1997)

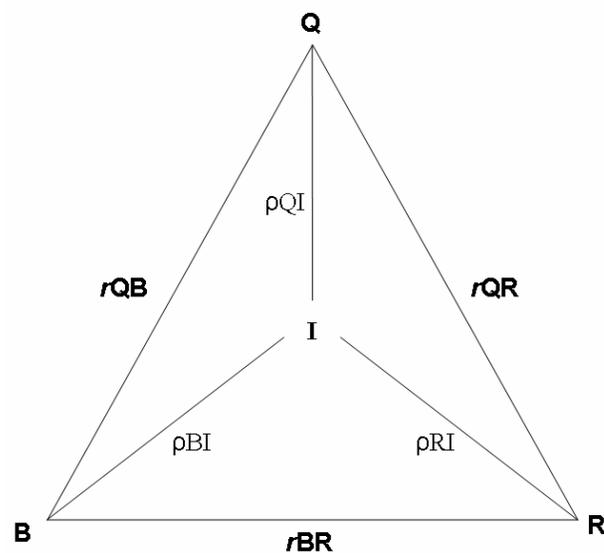
Este método foi proposto em 1997 por Kaaks, para avaliar o consumo alimentar real, quando a ingestão de determinado nutriente é estimada por três métodos: Q, R e B. Por meio desta técnica se calcula o coeficiente de validade (ρ) para cada variável, ou seja, a correlação entre cada uma das três medidas e a ingestão real, denominada variável latente.

Os pressupostos para a utilização desta técnica são: linearidade das correlações entre as três variáveis e a ingestão real (I) e independência dos erros aleatórios das três variáveis (Kaaks e Ferrari, 2006). O pressuposto de independência de erros aleatórios implica que as correlações entre qualquer par de variáveis ocorrem devido à relação entre cada variável e a

ingestão real, e não devido aos erros inerentes a cada instrumento de avaliação do consumo alimentar (Q, R e B) (Kaaks e Ferrari, 2006).

As equações desta técnica foram geradas pelo modelo de análise fatorial, apesar de também poderem ser calculadas pela técnica de equação estrutural. A Figura 1 ilustra o conceito do método das tríades (Kaaks, 1997; Ocké e Kaaks, 1997).

Figura 1. Método das tríades – comparação triangular entre questionário de frequência alimentar (Q), método de referência (R) e biomarcador (B).



Q: questionário de frequência alimentar; R: método de referência; B: biomarcador; I: ingestão real; r_{QB} : correlação bivariada entre questionário de frequência alimentar e biomarcador; r_{QR} : correlação bivariada entre questionário de frequência alimentar e método de referência; r_{BR} : correlação bivariada entre biomarcador e método de referência; ρ_{QI} : coeficiente de validade do questionário de frequência alimentar; ρ_{RI} : coeficiente de validade do método de referência; ρ_{BI} : coeficiente de validade do biomarcador.

Os coeficientes de validade (ρ) podem ser calculados pelas fórmulas:

$$(1) \rho_{QI} = \sqrt{r_{QR} \times r_{QB} / r_{BR}}$$

$$(2) \rho_{RI} = \sqrt{r_{QR} \times r_{BR} / r_{QB}}$$

$$(3) \rho_{BI} = \sqrt{r_{BR} \times r_{QB} / r_{QR}}$$

A partir destas fórmulas, os coeficientes de correlação entre as variáveis podem ser calculados:

$$(4) r_{QR} = \rho_{QI} \times \rho_{RI}$$

$$(5) r_{QB} = \rho_{QI} \times \rho_{BI}$$

$$(6) r_{BR} = \rho_{RI} \times \rho_{BI}$$

Onde: ρ_{QI} é o coeficiente de validade do questionário de frequência alimentar em relação à ingestão real; ρ_{RI} é o coeficiente de validade do método de referência em relação à ingestão real; ρ_{BI} é o coeficiente de validade do biomarcador em relação à ingestão real; r_{QR} é o coeficiente de correlação entre a ingestão estimada pelo questionário de frequência alimentar e o método de referência; r_{QB} é o coeficiente de correlação entre a ingestão estimada pelo questionário de frequência alimentar e o biomarcador; e r_{BR} é o coeficiente de correlação entre a ingestão estimada pelo biomarcador e o método de referência (Kaaks, 1997; Pufulete et al, 2002).

O valor dos coeficientes de validade podem variar de 0 a 1, diferente das correlações bivariadas, que variam de -1 a 1. Não existem coeficientes de validade negativos, pois este cálculo inclui a raiz quadrada. Os coeficientes de validade são considerados elevados quando $\rho > 0,6$, moderados quando $0,2 < \rho < 0,6$ e fracos quando $\rho < 0,2$ (Mcnaughton, Hughes e Marks, 2007). Geralmente, o coeficiente de validade estimado para cada variável (ρ_{QI} , ρ_{RI} e ρ_{BI}) é igual ou maior do que as correlações entre a variável e as outras duas variáveis (r_{QR} , r_{QB} e r_{BR}) (Kaaks, 1997).

Quando ρ_{QI} , ρ_{RI} e ρ_{BI} são elevados, espera-se que as correlações bivariadas (r_{QR} , r_{QB} e r_{BR}) também sejam relativamente elevadas. A existência de um dos três coeficientes de validade fraco geralmente ocorre quando duas das três correlações bivariadas são fracas. A existência de três correlações bivariadas fracas podem gerar pelo menos dois coeficientes

de validade fracos. Além disso, correlações bivariadas elevadas entre as três variáveis produzem coeficientes de validade também elevados, próximos a um (Kaaks, 1997).

1.4.1.4. Técnica “*bootstrap*” para o cálculo do intervalo de confiança de 95% do coeficiente de validade

Em estudos de validação, além do cálculo dos coeficientes de validade, é necessário avaliar o nível de precisão destes coeficientes, que geralmente é expresso pelo intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

O método mais utilizado para calcular o IC 95% dos coeficientes de validade em estudos de validação do consumo alimentar é a técnica *bootstrap* (Kabagambe et al, 2001; Bhakta et al, 2005; McNaughton et al, 2005; Verkleij-Hagoort, 2007), proposta inicialmente por Efron e Gong (1983). Trata-se de um método de reamostragem não-paramétrica, no qual, a partir da amostra original, são geradas centenas ou milhares de amostras *bootstrap* (Hair et al, 2005). Para se obter resultados confiáveis cada amostra *bootstrap* é composta de um mesmo “n” da amostra original. Estas amostras são geradas de forma aleatória e por substituição, de maneira que as medidas de cada caso possam aparecer mais de uma vez nas amostras calculadas. Esta técnica não necessita de conhecimento prévio sobre a probabilidade de distribuição teórica do coeficiente de validade estimado (Kaaks, 1997).

O método *bootstrap* fornece distribuições empíricas dos coeficientes de validade das três variáveis. Quanto menor as correlações bivariadas entre as três variáveis, maiores os IC 95% (Kaaks, 1997).

A existência de correlações negativas (r_{QR} , r_{QB} e r_{BR}) é considerada uma limitação, pois não permitem o cálculo dos coeficientes de validade (ρ_{QI} , ρ_{RI} e ρ_{BI}) nas

amostras *bootstrap* geradas. Por exemplo, quando 20% dos coeficientes de correlação destas amostras são negativos, são gerados ICs menor que 95%, pois estes serão baseados em apenas 80% das amostras *bootstrap*. Estas situações ocorrem quando pelo menos uma das três correlações bivariadas do estudo (r_{QR} , r_{QB} e r_{BR}) possuem um IC 95% que inclui zero, geralmente devido ao pequeno tamanho amostral. O aumento do tamanho da amostra e a utilização de métodos de referência e biomarcadores mais precisos reduzem a probabilidade de existirem correlações bivariadas negativas (Kaaks, 1997).

1.4.1.5. Aplicação do método das tríades em estudos de validação do consumo alimentar

Foram encontrados 11 artigos de validação do consumo alimentar que utilizaram o método das tríades. A maioria dos estudos utilizou biomarcadores de concentração, com exceção de 1 estudo, que avaliou o nitrogênio urinário de 24 horas (Shai et al, 2005). Os nutrientes pesquisados foram: carotenóides (4), tocoferóis (4), ácidos graxos (3), ácido fólico (2), proteínas (1), isotiocianatos (1) e fitoestrogênios (1) (tabela 2).

A partir do coeficiente de validade de cada uma das três variáveis – Q, R e B – é possível conhecer qual dos três métodos se aproxima mais da ingestão real. Nem sempre o uso do biomarcador é melhor que os demais métodos e vice-versa. Como exemplo, pode-se citar o estudo realizado na Costa Rica, com o objetivo de validar um Q específico para esta população. Entre os nutrientes analisados, o α -tocoferol e β -caroteno apresentaram coeficientes de correlação maiores entre o R e Q ($r_{QR_{\alpha\text{-tocoferol}}}= 0,48$; $r_{QR_{\beta\text{-caroteno}}}= 0,54$) do que entre o B (tecido adiposo) e Q ($r_{QB_{\alpha\text{-tocoferol}}}= 0,13$; $r_{QB_{\beta\text{-caroteno}}}= 0,16$). Ao comparar os coeficientes de validade dos nutrientes analisados, observou-se que o Q ($\rho_{QI}= 0,12$ a $0,73$) e o R ($\rho_{RI}= 0,40$ a $1,00$) apresentaram ρ maiores que o biomarcador ($\rho_{BI}= 0,05$ a $0,38$)

sugerindo que, para alguns nutrientes, os métodos tradicionais de avaliação do consumo alimentar são melhores do que o biomarcador e que este deve ser utilizado como medida complementar, não substituindo os inquéritos alimentares (Kabagambe et al, 2001). Entretanto, vale ressaltar que esta comparação deve ser feita de maneira cuidadosa, pois o Q e B possuem diferentes fontes de erro (Shai et al, 2005).

Uma das aplicações mais utilizadas da técnica de triangulação é na validação de um questionário de frequência alimentar (Pufulete et al, 2002; Andersen et al, 2005; Bhakta et al, 2005; McNaughton et al, 2005). Os carotenóides foram os nutrientes mais pesquisados nestes estudos (Shai et al, 2005; McNaughton et al, 2005; Dixon et al, 2006; Brevik et al, 2005). No estudo de McNaughton et al (2005), apesar do pequeno tamanho amostral (n=28), observou-se que o Q apresentou coeficientes de validade elevados para o α -caroteno (ρ QI= 0,85) e licopeno (ρ QI= 0,62), nutrientes considerados marcadores do consumo de frutas e vegetais, mostrando que este Q foi capaz de classificar indivíduos de acordo com a ingestão destes grupos de alimentos (McNaughton et al, 2005).

Uma das limitações dos biomarcadores de concentração é o seu período de referência, ou seja, o período ao qual o biomarcador reflete a ingestão de determinados nutrientes. Bhakta et al (2005) realizaram um estudo com mulheres asiáticas residentes no Reino Unido para validar um Q com enfoque em fitoestrogênios. Os biomarcadores utilizados neste estudo foram os fitoestrogênios plasmáticos, que estão associados à sua ingestão a curto prazo. Com o intuito de reduzir as fontes de erro, foram coletadas 4 amostras de plasma durante o período de 1 ano. Pode-se observar que os coeficientes de validade dos biomarcadores (ρ BI) foram os mais baixos para todos os fitoestrogênios (0,11 a 0,45). Entretanto, o Q teve coeficientes de validade moderados a elevados (ρ QI: 0,46 a 0,91), mostrando que o Q pode ser considerado um instrumento válido para estimar a ingestão deste nutriente (Bhakta et al, 2005).

Existe grande interesse em se conhecer o consumo de AG nos estudos epidemiológicos, devido à sua relação com as doenças crônicas (Arab e Akbar, 2002). Vários biomarcadores deste nutriente já foram testados, como os ácidos graxos séricos ou plasmáticos totais (Brevik et al, 2005), frações plasmáticas ou séricas (King, Lemaitre e Kestin, 2006) da membrana de eritrócitos (King, Lemaitre e Kestin, 2006) ou do tecido adiposo (Cantwell et al, 2004; Kabagambe et al, 2001). McNaughton, Hughes e Marks (2007) utilizaram o método das tríades para validar um Q com enfoque em ácidos graxos poliinsaturados, utilizando o perfil de AGP dos fosfolipídios plasmáticos como biomarcadores do seu consumo. O coeficiente de validade do biomarcador (ρ_{BI} = 0,29 a 0,60) foi menor que o do método de referência (ρ_{RI} = 0,65 a 1,00) e Q (ρ_{QI} = 0,45 a 0,63), mostrando que, apesar da existência de ρ_{BI} fracos a moderados, o Q desenvolvido foi capaz de classificar adequadamente os indivíduos em relação ao consumo de AGP (McNaughton, Hughes e Marks, 2007).

O estudo de Fowke, Hebert e Fahey (2002) avaliou a excreção urinária de ditiocarbamatos como marcador biológico da ingestão de vegetais crucíferos. Apesar da excreção urinária de ditiocarbamatos depender de um consumo razoável de vegetais crucíferos para ser detectado na urina, os autores concluíram que este biomarcador foi capaz de classificar os indivíduos de acordo com sua ingestão por apresentar um coeficiente de validade elevado (ρ =0,65) (Fowke, Hebert e Fahey, 2002).

A técnica de triangulação pode ser utilizada para comparar diferentes biomarcadores para um mesmo nutriente. Em estudo realizado na Noruega com militares do sexo masculino, a avaliação de diferentes tipos de carotenóides – luteína, β -caroteno, zeaxantina, licopeno, α -caroteno – como biomarcadores do consumo de frutas e verduras mostrou que

o α -caroteno apresentou o melhor coeficiente de validade ($\rho_{BI}=0,47$) (Andersen et al, 2005).

Um fator que dificulta a comparação dos coeficientes de validade desses estudos é a diferença nos métodos de referência e no número de aplicações dos instrumentos de avaliação do consumo alimentar utilizados. Além disso, outras questões metodológicas, como tamanho da amostra e estrutura e número de itens do Q também influenciam na comparação dos estudos (Cantwell et al, 2004).

Tabela 2. Estudos que utilizaram o método das tríades para o cálculo do coeficiente de validade do questionário de frequência alimentar, método de referência e biomarcador.

Estudo, ano de publicação	n	Inquéritos alimentares utilizados	Nutriente (s) ou alimento (s) analisado (s)	Biomarcador	Nº de amostras <i>bootstrap</i>	rQR	rQB	rBR	ρQI	ρRI	ρBI
Kabagambe et al, 2001 ^a .	120	7 R24 2 Q	Ácidos graxos, carotenóides e tocoferóis	Ácidos graxos, carotenóides e tocoferóis séricos e do tecido adiposo	1000	18:2n-6= 0,50 α-tocoferol= 0,41 β-caroteno= 0,40	18:2n-6= 0,59 α-tocoferol= 0,13 β-caroteno= 0,16	18:2n-6= 0,37 α-tocoferol= 0,15 β-caroteno= 0,32	18:2n-6= 0,89 α-tocoferol= 0,59 β-caroteno= 0,45	18:2n-6= 0,82 α-tocoferol= 0,81 β-caroteno= 1,0	18:2n-6= 0,67 α-tocoferol= 0,25 β-caroteno= 0,36
Fowke et al, 2002 ^b .	33	3 R24 2 QVF	Vegetais crucíferos	Ditiocarbamato urinário	1000	0,67 ^c	0,49 ^c	0,57 ^c	0,76 ^c	0,82 ^c	0,65 ^c
Pufulete et al, 2002	36	2Q PD 7 dias	Ácido fólico	Ácido fólico sérico e eritrocitário ^d	NC	0,69	Ácido Fólico sérico= 0,55 Ácido Fólico eritr= 0,36	Ácido Fólico sérico= 0,52 Ácido Fólico eritr= 0,52	Ácido Fólico sérico= 0,85 Ácido Fólico eritr= 0,69	Ácido Fólico sérico= 0,80 Ácido Fólico eritr= 0,99	Ácido Fólico sérico= 0,64 Ácido Fólico eritr= 0,52
Brevik et al, 2005	110	1Q PD 14 dias	Gordura do leite e produtos lácteos	Ácidos graxos 15:0 e 17:0 séricos e do tecido adiposo ^e	1000	Não mostrado no estudo	15:0 (TA)= 0,28 17:0 (TA)= 0,03 15:0 (soro)= 0,28 17:0 (soro)= -0,10	15:0 (TA)= 0,52 17:0 (TA)= 0,07 15:0 (soro)= 0,43 17:0 (soro)= 0,05	15:0 (TA)= 0,50 17:0 (TA)= n/a 15:0 (soro)= 0,58 17:0 (soro)= n/a	15:0 (TA)= 0,94 17:0 (TA)= n/a 15:0 (soro)= 0,88 17:0 (soro)= n/a	15:0 (TA)= 0,56 17:0 (TA)= n/a 15:0 (soro)= 0,49 17:0 (soro)= n/a
Andersen et al, 2005.	100	PD 14 dias 1 Q (180 itens) 1 Q (27 itens)	Frutas e vegetais	Carotenóides séricos (α-caroteno) ^f	1000	Q180= 0,42 Q27= 0,55	Q180= 0,25 Q27= 0,26	0,37	Q180= 0,54 Q27= 0,60	0,79	0,47
Shai et al, 2005.	161	6R24 3Q	β-caroteno, α-tocoferol, ácido fólico e proteína	β-caroteno, α-tocoferol, e ácido fólico séricos e nitrogênio urinário	NC	β-caroteno= 0,38 α-tocoferol= 0,55 Ácido fólico = 0,44 Proteína = 0,49	β-caroteno= 0,35 α-tocoferol= 0,19 Ácido fólico = 0,41 NU= 0,33	β-caroteno= 0,38 α-tocoferol= 0,33 Ácido fólico = 0,35 NU= 0,29	β-caroteno= 0,67 α-tocoferol= 0,56 Ácido fólico = 0,72 Proteína = 0,77	β-caroteno= 0,60 α-tocoferol= 0,97 Ácido fólico = 0,39 Proteína = 0,68	β-caroteno= 0,67 α-tocoferol= 0,34 Ácido fólico = 0,65 Proteína = 0,44

Estudo, ano de publicação	n	Inquéritos alimentares utilizados	Nutriente (s) ou alimento (s) analisado (s)	Biomarcador	Nº de amostras Bootstrap	rQR	rQB	rBR	ρQI	ρRI	ρBI
Bhakta et al, 2005.	108	12R24 1Q	Fitoestrogênicos	Fitoestrogênicos plasmáticos	1000	Gn=0,51 Dd=0,59 Lig= 0,66	Gn=0,21 Dd=0,32 Lig= 0,10	Gn=0,43 Dd=0,40 Lig= 0,08	Gn=0,46 Dd=0,67 Lig= 0,91	Gn=0,95 Dd=0,83 Lig= 0,73	Gn=0,45 Dd=0,45 Lig= 0,11
McNaughton et al, 2005.	28	PD de 12 dias 1 Q	Carotenóides e vitamina E	Carotenóides e vitamina E séricos ^f	1000	α-caroteno= 0,38 β-caroteno= 0,36 Luteína= 0,40 Licopeno= 0,14 Vit. E= 0,57	α-caroteno= 0,36 β-caroteno= 0,22 Luteína= 0,03 Licopeno= 0,19 Vit. E= 0,05	α-caroteno= 0,19 β-caroteno= 0,26 Luteína= 0,35 Licopeno= 0,07 Vit. E= -0,11	α-caroteno= 0,85 β-caroteno= 0,55 Luteína= 0,19 Licopeno= 0,62 Vit. E=n/a	α-caroteno= 0,45 β-caroteno= 0,65 Luteína= 1,00 Licopeno= 0,23 Vit. E=n/a	α-caroteno= 0,42 β-caroteno= 0,40 Luteína= 0,16 Licopeno= 0,30 Vit. E=n/a
Dixon et al, 2006	163	1QHD 4 R24	Carotenóides e tocoferóis	Carotenóides e tocoferóis séricos ^g	NC	Mulheres α-caroteno= 0, β- criptoxantina = 0 α- tocoferol= Homens α-caroteno= 0, β- criptoxantina = 0 α- tocoferol=	Mulheres α-caroteno= 0, 44 β- criptoxantina = 0, 44 α- tocoferol= 0, 19 Homens α-caroteno= 0, 52 β- criptoxantina = 0, 62 α- tocoferol= 0,48	Mulheres α-caroteno= 0, 29 β- criptoxantina = 0, 43 α- tocoferol= 0,04 Homens α-caroteno= 0, 49 β- criptoxantina = 0, 44 α- tocoferol= 0,43	Mulheres α-caroteno= 0,61 β- criptoxantina = 0, 52 α- tocoferol= NC Homens α-caroteno= 0,80 β- criptoxantina = 0,84 α- tocoferol= 0,74	Mulheres α-caroteno= 0,42 β- criptoxantina = 0,69 α- tocoferol= NC Homens α-caroteno= 0,63 β- criptoxantina = 0,68 α- tocoferol= 0,76	Mulheres α-caroteno= 0,64 β-criptoxantina = 0,74 α- tocoferol= NC Homens α-caroteno= 0, 71 β-criptoxantina = 0,74 α- tocoferol= 0,14
McNaughton et al, 2007.	43	PD de 12 dias 1 Q	Ácidos graxos poliinsaturados	Ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios plasmáticos	1000	20:4n-6= 0,54 20:5n-3= 0,40 22:6n-3= 0,52 n-3= 0,39 n-3CL= 0,46	20:4n-6= 0,13 20:5n-3=0,21 22:6n-3= 0,32 n-3= 0,21 n-3CL = 0,38	20:4n-6= 0,35 20:5n-3= 0,22 22:6n-3= 0,43 n-3= 0,33 n-3CL = 0,44	20:4n-6= 0,45 20:5n-3= 0,83 22:6n-3= 0,78 n-3CL = 0,73 n-3=0,50 n-3CL = 0,63	20:4n-6= 1,00 20:5n-3= 0,65 22:6n-3= 0,83 n-3= 0,78 n-3CL = 0,73	20:4n-6= 0,29 20:5n-3= 0,35 22:6n-3= 0,52 n-3= 0,43 n-3CL = 0,60

Estudo, ano de publicação	n	Inquéritos alimentares utilizados	Nutriente (s) ou alimento (s) analisado (s)	Biomarcador	Nº de amostras Bootstrap	rQR	rQB	rBR	ρQI	ρRI	ρBI
Verkleij-Hagoort et al, 2007.	53	1 Q 3 R24	Ácido fólico e vitamina B ₁₂	Ácido fólico sérico e eritrocitário e vitamina B ₁₂ sérica	1000	Ácido fólico sérico= 0,98 Ácido fólico eritr= 0,98 Vit _{B12} sérica= 0,66	Ácido fólico sérico= 0,20 Ácido fólico eritr= 0,28 Vit _{B12} sérica= 0,21	Ácido fólico sérico= 0,22 Ácido fólico eritr= 0,49 Vit _{B12} sérica= 0,05	Ácido fólico sérico= 0,94 Ácido fólico eritr= 0,75 Vit _{B12} sérica= 1,00	Ácido fólico sérico= 0,98 Ácido fólico eritr= 1,30 Vit _{B12} sérica= 0,39	Ácido fólico sérico= 0,20 Ácido fólico eritr= 1,32 Vit _{B12} sérica= 0,12

n: tamanho amostral; rQR: coeficiente de correlação entre o questionário de frequência alimentar e método de referência; rQB: coeficiente de correlação entre o questionário de frequência alimentar e biomarcador; rBR: coeficiente de correlação entre o método de referência e o biomarcador; ρQI: coeficiente de validade do questionário de frequência alimentar; ρRI: coeficiente de validade do método de referência; ρBI: coeficiente de validade do biomarcador; R24: recordatório de 24 horas; Q: questionário de frequência alimentar; QVF: Questionário de frutas e vegetais; PD: pesagem direta; NC: não calculado; eritr: eritrocitário; TA: tecido adiposo; n/a: não se aplica devido à existência de correlação negativa; NU: Nitrogênio urinário; Gn: genisteína; Dd: daidizeína; Lig: lignana; Vit.E: Vitamina E; n-3CL: ácidos graxos da série n-3 de cadeia longa; Vit_{B12}: Vitamina B₁₂.

^a: Foram apresentados somente os biomarcadores do tecido adiposo.

^b: Foram apresentados somente os coeficientes pós-intervenção.

^c: O estudo não mostrou o cálculo dos coeficientes ρRI e ρBI. Eles foram calculados neste artigo por meio da fórmula proposta por Kaaks (1997).

^d: Nesta revisão são apresentados coeficientes de correlação apenas para os homens do estudo (n=16). O estudo não mostrou o cálculo dos coeficientes de validade, apenas citou na discussão. Eles foram calculados neste artigo por meio da fórmula proposta por Kaaks (1997).

^e: Os coeficientes de validade e de correlação apresentados são referentes ao consumo de produtos lácteos, apesar do estudo apresentar estes coeficientes para o consumo de leite e queijos.

^f: O estudo analisou outros carotenóides séricos, no entanto são apresentados somente os dados relativos ao α-caroteno.

^g: O estudo analisou outros carotenóides e tocoferóis séricos, no entanto são apresentados somente os dados relativos ao α-caroteno, β-criptoxantina e α-tocoferol.

1.4.1.6. Limitações do método das tríades

Uma das limitações da técnica de triangulação é a ocorrência de coeficientes de validade com valor > 1 , conhecido como *Heywood case*. Considerando os 3 coeficientes de correlação (r_{QR} , r_{QB} e r_{BR}), o *Heywood case* ocorre quando o resultado da multiplicação de dois dos três coeficientes de correlação é maior que o outro coeficiente para um mesmo nutriente (por exemplo: $r_{QR} \times r_{QB} > r_{BR}$). As principais causas da ocorrência de *Heywood cases* são variações amostrais aleatórias ou a violação de um ou mais pressupostos do método das tríades. No primeiro caso, um coeficiente de validade >1 é aceitável. No entanto, no segundo caso, o coeficiente de validade estimado é resultado de erros sistemáticos (McNaughton, Hughes e Marks, 2007). A violação do pressuposto da independência dos erros aleatórios das 3 variáveis é mais comum, pois o Q e o R possuem as mesmas fontes de erro. Por isso, alguns estudos têm considerado o coeficiente de validade do Q (ρ_{QI}) como o limite superior e o coeficiente de correlação entre o Q e o B (r_{QB}) como limite inferior do verdadeiro coeficiente de validade do Q (ρ_{QI}) (Andersen et al, 2005; McNaughton et al, 2005; McNaughton, Hughes e Marks, 2007; Verkleij-Hagoort et al, 2007).

1.4.1.7. Considerações Finais

O método das tríades é uma técnica que vem sendo utilizada em estudos de validação do consumo alimentar. A vantagem desta técnica em relação aos métodos tradicionais é a inserção de uma terceira variável – o biomarcador – que possui erros independentes do Q e R. Esta técnica permite estimar a ingestão real, particularmente para nutrientes que não possuem marcadores biológicos com indicadores diretos do seu consumo.

A técnica de triangulação, apesar das suas limitações, é indicada em estudos de validação, pois aproxima as estimativas de consumo da ingestão real.

1.4.2. Método das tríades na validação do consumo de ácidos graxos dietéticos

Foram encontrados 3 estudos na literatura que utilizaram o método das tríades na validação do consumo de AG dietéticos (Kabagambe et al, 2001; Brevik et al, 2005; McNaughton, Hughes, Marks, 2007).

O estudo de Kabagambe et al (2001) utilizou o método das tríades para validar o consumo de vários nutrientes, como carotenóides, tocoferóis e alguns AG (14:0, 16:0, 18:0, 16:1, 18:1, 18:2 n -6, 18:3 n -3). Foram aplicados dois Q e sete R24 (método de referência) e o perfil de AG do tecido adiposo foi utilizado como biomarcador. Não foi possível calcular os coeficientes de validade para o ácido palmítico, devido à existência de correlações negativas. Para todos os AG analisados, o maior ρ foi o do método de referência (ρ RI = 0,64 a 1,00). Em relação ao Q, os maiores ρ foram observados para os AG essenciais – 18:2 n -6 (ρ QI=0,89) e 18:3 n -3 (ρ QI=0,59). O biomarcador apresentou os coeficientes de validade mais baixos para todos os AG (ρ BI=0,02 a 0,67) sugerindo que, no caso dos ácidos graxos, os biomarcadores devem ser utilizados como medidas adicionais e não como substitutos do Q ou R (Kabagambe et al, 2001).

O estudo realizado com 107 militares do sexo masculino utilizou o método das tríades para verificar a relação entre a ingestão de produtos lácteos e o perfil de 15:0 e 17:0 no soro sanguíneo e tecido adiposo. Diferente do estudo anterior, este estudo comparou a ingestão de alimentos ao invés de nutrientes com os biomarcadores. Os participantes responderam um Q de 180 itens e realizaram o registro alimentar de 14 dias. O ácido heptadecanóico das amostras biológicas não apresentou correlações positivas significantes

em relação ao consumo de produtos lácteos, não sendo calculados, portanto, os coeficientes de validade. O perfil de 15:0 no tecido adiposo ($r_{QB}=0,28$; $r_{BR}=0,52$) e soro ($r_{QB}=0,28$; $r_{BR}=0,43$) apresentaram correlações semelhantes com o consumo de leite e derivados e o método de referência apresentou os maiores coeficientes de validade (TA: $\rho_{RI}=0,94$; Soro: $\rho_{RI}=0,88$). Os autores concluíram que o perfil de 15:0 sérico e no TA podem ser utilizados como biomarcadores do consumo de produtos lácteos, apesar dos métodos tradicionais fornecerem medidas mais precisas (Brevik et al, 2005).

O estudo mais recente utilizou a técnica da triangulação para verificar a validade do Q utilizado no “*Nambour Skin Cancer Study*” com enfoque em AGP em relação ao perfil de AGP no FL plasmático e registro com pesagem direta de 12 dias (McNaughton, Hughes, Marks, 2007). Os autores encontraram baixa correlação entre o consumo de AGT e o biomarcador ($r_{QB}=0,19$ e $r_{BR}=0,16$). Foi possível calcular o ρ apenas para os AG $n-3$ de cadeia longa e o $20:4n-6$. Novamente, os maiores ρ foram observados para o método de referência ($\rho_{RI}=0,65$ a $1,00$) e os menores para o biomarcador ($\rho_{BI}=0,29$ a $0,60$). De acordo com os ρ_{QI} ($0,45$ a $0,62$) encontrados, os autores consideraram o Q uma ferramenta útil para estimar o consumo de AGP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Validar o consumo de ácidos graxos dietéticos avaliado por meio de um questionário de frequência alimentar em relação a múltiplos recordatórios de 24 horas e a biomarcadores sanguíneos, em uma população acima de 17 anos do Distrito Federal.

2.2. Objetivos específicos

- Correlacionar o perfil de ácidos graxos séricos com o consumo de ácidos graxos avaliados pelo recordatório de 24 horas e questionário de frequência alimentar;
- Verificar a concordância entre os dados de consumo de ácidos graxos e o seu perfil no fosfolipídio sérico;
- Correlacionar o consumo de ácidos graxos obtidos pelo recordatório de 24 horas, questionário de frequência alimentar e biomarcador com a ingestão real.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento do estudo

3.1.1. Projeto Piloto VIVA-DF

A amostra deste trabalho faz parte da população selecionada para o estudo piloto do projeto “Prevalência dos fatores de risco para Doenças crônicas não transmissíveis no Distrito Federal: um projeto integrado de vigilância e controle (VIVA-DF)” - estudo epidemiológico transversal, de base populacional realizado no ano de 2007. As entrevistas do estudo piloto foram realizadas no período de outubro de 2005 a janeiro de 2006.

Para compor a amostra do estudo piloto foram selecionadas duas regiões administrativas do Distrito Federal, Sobradinho e São Sebastião. A amostra foi composta por 2 estágios de seleção. A partir do banco de dados domiciliares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2002, foi obtida uma amostra aleatória de duas unidades probabilísticas de amostragem (UPAs) para cada cidade (Sobradinho – Sobradinho 1 e Sobradinho 2; São Sebastião – São José e Residencial do Bosque), que correspondem a setores censitários cujo tamanho foi ajustado para variáveis sócio-econômicas. Posteriormente foram sorteados 60 domicílios também aleatoriamente de cada uma delas, totalizando 240 residências.

Em cada domicílio selecionado aleatoriamente, um adulto foi sorteado para a aplicação de questionário de fatores de risco para doenças crônicas e coleta de sangue. Estavam aptos a participar do estudo indivíduos de ambos os sexos e com idade maior ou igual a 18 anos que aceitassem participar voluntariamente. Nos casos de recusa do sorteado, repetia-se o procedimento, com os adultos restantes da residência sorteada. Na ausência do morador sorteado, repetia-se a visita ao domicílio por mais duas vezes e se não houvesse êxito, substituía-se o domicílio pelo mais próximo à direita nas casas individuais ou pelos barracos de frente ou fundo, quando fosse o caso. Para apartamentos, a substituição foi feita

pelo número seguinte. Considerou-se como domicílio perdido os casos de recusa pelo domicílio sorteado, recusa de 3 moradores sorteados sequencialmente e ausência do morador sorteado após 3 visitas. Os critérios de exclusão foram incapacidade de responder à entrevista e gestação.

O questionário do estudo piloto apresentou 78 perguntas sobre situação socioeconômica, consumo de frutas e hortaliças, atividade física, tabagismo e outras variáveis de risco. O tempo médio de entrevista foi de 1 hora. Durante a aplicação do questionário foi realizada medida única de peso, utilizando balança portátil digital (Marte[®]) com indivíduo descalço, vestindo roupas leves; aferição de altura com utilização de estadiômetro de parede (Gibson, 1990) (Seca[®]); determinação da circunferência abdominal com utilização de fita graduada em 0,1 cm (Gibson, 1990) (TBW[®]). Foram medidas as pressões sistólica e diastólica em duas aferições independentes, no início e final da entrevista, utilizando-se aparelho digital automático (HEM705, OMRON[®]), com manguito adequado para a circunferência do braço e atendendo as especificações técnicas recomendadas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2004). Ao final da entrevista foi marcada a coleta sanguínea, no domicílio do voluntário. Os indivíduos foram orientados a realizar jejum de 12 horas, não praticar atividade física e abster-se do consumo de álcool no dia anterior à coleta. Foram analisados colesterol total, HDL-c, glicemia e triglicerídios. Os entrevistadores foram treinados quanto aos procedimentos do inquérito, antropometria e aferição da pressão arterial. A coleta sanguínea foi feita por técnicos capacitados para a função.

Os resultados bioquímicos, antropométricos e de pressão arterial foram entregues aos participantes e aqueles que apresentaram alterações nos exames foram encaminhados para o centro de saúde mais próximo à sua residência. Ao final deste estudo, foram entrevistados 157 adultos, com perda amostral de 35%. Os resultados socioeconômicos e a

prevalência dos fatores de risco para doenças crônicas desta amostra estão disponíveis na publicação Yokota et al (2007) (anexo).

3.1.2. Estudo de validação do consumo de ácidos graxos dietéticos

Os voluntários do projeto piloto VIVA-DF foram convidados a participar do estudo de validação do consumo de AG dietéticos. A coleta de dados foi realizada no período de fevereiro a dezembro de 2006, por meio de 4 visitas domiciliares para aplicação de 4 recordatórios de 24 horas e 2 questionários de frequência alimentar, com intervalo médio de 2 meses entre as visitas (tabela 1).

Tabela 1. Cronograma de coleta de sangue e aplicação dos instrumentos de avaliação do consumo alimentar.

Instrumento	Mês de aplicação
Coleta de amostras de sangue	2º Semestre/2005
1º R24	Fevereiro/2006
2ºR24	Maiο/2006
3ºR24 + 1ºQ	Agosto/2006
4ºR24 + 2ºQ	Novembro/2006

R24: Recordatório de 24 horas

Q: Questionário de frequência alimentar

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (Anexo) e os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo).

3.2. Recordatório de 24 horas (R24)

Os R24 foram aplicados no domicílio de cada participante, por estudantes de graduação do curso de nutrição da Universidade de Brasília. Os estudantes receberam treinamento em relação às técnicas de aplicação e, durante a aplicação do primeiro R24 as nutricionistas supervisoras responsáveis acompanharam cada aluno individualmente. O tempo de aplicação de cada R24 (Anexo) foi de aproximadamente 15 minutos. Foram avaliados dois dias de semana e dois dias de final de semana.

3.3 Questionário de frequência alimentar (Q)

3.3.1. Lista de alimentos

A lista de alimentos do questionário de frequência alimentar foi elaborada segundo Block et al (1986), a partir dos dados do primeiro R24. Todos os alimentos consumidos (n=184) no primeiro R24 (com exceção daqueles consumidos por apenas um indivíduo) foram agrupados de acordo com sua contribuição percentual relativa por nutriente de interesse – carboidrato, energia, fibras, colesterol, lipídios, AGM, AGT, AGP e AGS. Entraram na lista final do Q os alimentos que contribuíram com 90% da ingestão total de cada nutriente de interesse. A Tabela 2 mostra os alimentos que mais contribuíram para o consumo de ácidos graxos trans, referente aos dados do 1º R24.

Além disso, alguns alimentos foram agrupados de acordo com a semelhança no teor do nutriente de interesse por porção consumida. Por exemplo, o bife e a carne assada foram agrupados devido a semelhança em relação ao teor de lipídios por porção consumida.

Tabela 2. Percentual de contribuição de consumo dos alimentos fontes de ácidos graxos trans citados no 1º R24.

Alimento	Percentual de Contribuição
Biscoito Recheado	33,615
Biscoito Cream Cracker	27,153
Carne Vermelha	15,386
Margarina	14,020
Leite	3,265
Bolo industrializado	2,678
Pão industrializado	2,148
Batata frita	1,104
Salsicha	0,325
Lingüiça	0,200
Requeijão	0,098
Azeite de oliva	0,002

No total, o Q apresentou 60 alimentos, divididos em 8 grupos: leguminosas e ovos; cereais e tubérculos; leite e derivados; hortaliças e frutas; sucos; pães, biscoitos e bolos; carnes e peixes; diversos (Anexo). No final da entrevista, o indivíduo foi questionado em relação à existência de alimentos que não foram previamente citados no Q e com consumo maior ou igual a uma vez por semana.

3.3.2. Frequência de consumo e porções do questionário de frequência alimentar

O questionário de frequência alimentar apresentou 11 opções pré-definidas de frequência de consumo, variando de nunca a dez vezes e as opções em unidade de tempo foram: dia, semana, mês ou ano (Anexo).

O tamanho das porções foi definido em pequeno, médio e grande, de acordo com os percentis 25, 50 e 75 da mediana de consumo obtido no primeiro R24, respectivamente. Durante as aplicações do Q, a quantidade consumida de cada item foi questionada em relação à porção média (porção de referência).

O tempo de referência do questionário de frequência alimentar foi o ano anterior à entrevista. O Q também foi aplicado nos domicílios de cada participante por estudantes de nutrição e nutricionistas previamente treinados. O tempo médio de aplicação do Q foi de 40 minutos.

3.4. Cálculo de nutrientes

Os nutrientes analisados foram: energia, proteína, lipídios, colesterol, fibras e os ácidos graxos: 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, AGS, 16:1c, 18:1n-9c, AGM, 18:2n-6, 20:4n-6, AG n-6, 18:3n-3, 20:5n-3, 22:6n-3, AG n-3, 16:1t, 18:1t, 18:2t e AGT.

Os dados de consumo foram analisados no software NUTWIN, versão 1.5 (São Paulo, Brasil). Os dados relativos ao teor de AGT dos alimentos foram baseados no banco de dados do *United States Department of Agriculture* (USDA, 1999).

3.5. Análise de ácidos graxos

As amostras de sangue para a análise de ácidos graxos foram coletadas juntamente com as amostras de sangue do projeto piloto VIVA-DF. As amostras sanguíneas foram transportadas no período máximo de 4 horas ao laboratório de bioquímica de nutrição sob refrigeração, onde o sangue foi centrifugado a 2200rpm por 10 minutos (min) para separação do soro e congelado a -70°C. A análise das amostras foi realizada no período de um ano após a coleta.

3.5.1. Extração de lipídios

As amostras de soro sanguíneo (1mL) foram descongeladas em temperatura ambiente. A extração de lipídios totais séricos foi feita de acordo com Folch, Lees, Stanley (1957) com 5mL de solução de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v). A mistura foi agitada por 1 min e centrifugada por 5 min (2500rpm) a 5°C, para separação em duas fases. A fase orgânica inferior (clorofórmio), que continha os lipídios, foi filtrada em filtro de papel com 70mm de diâmetro e transferida para um tubo pré-pesado. O solvente foi evaporado sob N₂ e deixado em dessecador a vácuo por 30 min. O total de lipídios/mL de soro foi determinado gravimetricamente e foi adicionada a quantidade de clorofórmio necessária para se atingir a concentração final de 1mg de lipídios/mL. O clorofórmio foi novamente evaporado sob N₂ e foram adicionados 500µL de hexano ao total de lipídio extraído.

3.5.2. Separação de fosfolipídios séricos por cromatografia de camada delgada (CCD)

A partir do total de lipídios extraídos, a fração fosfolipídica sérica foi separada por CCD, com sistema de solventes: hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:2, v/v/v) de acordo com a metodologia proposta por Christie (2003).

Foram utilizadas placas cromatográficas unidimensionais 20 x 20cm, impregnadas com sílica-gel e com indicador fluorescente (Analtech, Inc Newark, Dinamarca). A limpeza prévia das placas foi feita com solução de clorofórmio-metanol (1:1, v/v) em cuba cromatográfica de vidro (27,5 x 27,5 x 7,5cm; Sigma-Aldrich, Alemanha) com fluxo ascendente de solventes até o seu limite superior. As placas foram ativadas em estufa térmica à temperatura de 100°C durante 40 min. Em cada placa ativada foram marcados os pontos e faixas de aplicação e os respectivos limites da corrida cromatográfica com lápis de grafite comum. Cada placa comportou 4 aplicações de faixas de 3cm cada, com distância de 1,5cm entre elas e 1,0cm de limites inferior e laterais da placa. Foi aplicado 160µg de amostra de lipídios por faixa da placa utilizando seringa vítrea de microvolumes de 10µL (J&W[®]). As placas foram secas sob fluxo de N₂ e condicionadas em dessecador a vácuo por 10 min.

As placas foram submetidas à ação capilar do sistema de solventes para lipídios neutros em cuba cromatográfica de vidro até o limite superior de 1,5cm (aproximadamente 1 hora). As bandas de fosfolipídios foram identificadas sob luz ultravioleta de acordo com o R_f proposto por Henderson e Tocher (1992) para este sistema de solventes, removidas das placas e transferidas para tubo de vidro com auxílio de funil de vidro. Os fosfolipídios de cada amostra foram eluídos em solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v), agitados por 1 min e filtrados em filtro de papel. Foram adicionados no filtro 1mL de clorofórmio e 1mL de KCl (0,88%) em solução aquosa. A mistura foi agitada por 1 min e centrifugada por 5

min a 2500rpm a 5°C para separação em duas fases. A fase orgânica inferior, que continha os fosfolipídios, foi transferida para um tubo de vidro e o solvente foi evaporado sob N₂.

3.5.3. Esterificação de ácidos graxos dos fosfolipídios plasmáticos

Os AG dos fosfolipídios foram esterificados por metanólise com ácido sulfúrico (Henderson e Tocher, 1992). Foi adicionado 1mL de tolueno à amostra de fosfolipídio e 3mL de H₂SO₄ em metanol (1%). A mistura foi aquecida em banho-maria a 50°C por 12 horas. A solução foi separada em duas fases após a adição de 1mL de água deionizada e 3mL de solução de hexano-éter (1:1, v/v) com 0,05% de BHT, agitação por 1 min e centrifugação por 5 min a 5°C. A fase sobrenadante foi separada e o procedimento de separação foi repetido com a adição de 3mL de solução de hexano-éter (1:1, v/v). À fase sobrenadante final foram adicionados 2mL de KHCO₃ (2%) em solução aquosa. A mistura foi agitada por 1 min e centrifugada por 5 min a 5°C. A fase superior foi removida e submetida ao N₂. A amostra final contendo os metil-ésteres de ácidos graxos foi re-suspensa em 250µL de hexano para análise por cromatografia gasosa.

3.5.4. Análise dos ácidos graxos esterificados por cromatografia gasosa

Foi injetado 1µL da amostra de metil-ésteres de ácidos graxos em cromatógrafo a gás (modelo GC 17 A - Shimadzu). A separação foi feita em coluna capilar flexível de sílica SP2560 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com dimensão de 100m x 250mm de diâmetro interno x 0,20µm. A coluna de 100m foi utilizada por ser recomendada para a separação de isômeros trans (Ratnayake, 2004). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio.

Foi utilizado o injetor no modo *split* com razão de 1:50 e detector de ionização de chamas, ambos mantidos à temperatura de 250°C. O programa de temperatura utilizado foi 125°C por 3 min, 125-170°C a 10°C/min, 170°C por 5 min, 170-175°C a 5°C/min, 175°C por 1 min, 175-185°C a 2°C/min, 185°C por 1 min, 185-190°C a 1°C/min, 190°C por 1 min, 190-240°C a 5°C/min, 240°C por 8 min. O tempo médio de corrida para cada amostra foi de 1 hora.

A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação com padrões de metil-éster de ácidos graxos (mix de 37 metil-ésteres de ácidos graxos, Supelco, Bellefonte, PA). Os ácidos graxos 18:1*t* e 18:2*t* foram expressos como a soma de todos os seus isômeros trans e a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios séricos como percentual de área de detecção em relação à área total dos AG identificados nos cromatogramas.

3.6. Análise estatística

Todos os dados apresentados neste estudo são relativos aos indivíduos que responderam pelo menos três R24, um Q e tiveram amostra de sangue analisada em relação ao teor de ácidos graxos. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS, versão 9.1.

Para verificar a associação entre os dados do R24, Q e B, foram calculados os coeficientes de correlação parcial brutos e ajustados por energia (Kabagambe et al, 2001; Shai et al, 2004; Andersen et al, 2005), sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância estatística. Para os dados do perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios séricos que não apresentaram distribuição normal realizou-se transformação logarítmica.

Foram calculados os coeficientes de validade entre as três variáveis analisadas – Q, R24 e B – e a ingestão real pelo método das tríades (Kaaks, 1997), exceto para os ácidos graxos que apresentaram correlações negativas.

Os coeficientes de correlação e de validade foram considerados baixos ($r < 0,2$), moderados ($r = 0,2-0,6$) ou elevados ($r > 0,6$), de acordo com Mcnaughton, Hughes e Marks (2007). Para o cálculo do intervalo de confiança de 95% dos coeficientes de validade foram geradas 1500 amostras *bootstrap* de mesmo tamanho da amostra deste estudo.

A capacidade do Q em classificar indivíduos no mesmo quartil de ingestão em relação ao R24 e biomarcador foi avaliada para os ácidos graxos que apresentaram coeficientes de correlação positivos e significantes para o Q, R24 e biomarcador.

**4. APPLICATION OF THE METHOD OF TRIADS IN THE
VALIDATION OF A FATTY ACID FOOD FREQUENCY
QUESTIONNAIRE FOR A BRAZILIAN ADULT
POPULATION**

Abstract

Background/ Aims: In order to investigate the relationship between fatty acid (FA) intake and chronic diseases in an adult population from Brazil, a FA food frequency questionnaire (Q) validation study was conducted applying the method of triads, using multiple 24 hour recalls as the reference method (R) and serum phospholipids as the biomarker (B). **Methods:** Eighty-one randomly selected individuals were home-interviewed for the application of two 60-item Q and four 24hR and collection of blood samples to analyze serum phospholipids FA. **Results:** The correlations (r) between the Q and 24hR ranged from 0.16 to 0.60. The trans FA 18:1 t ($r_{QR}=0.54$; $r_{QB}=0.32$; $r_{BR}= 0.38$) and 18:2 t ($r_{QR}=0.55$; $r_{QB}=0.61$; $r_{BR}= 0.79$) showed moderate to good correlations for all three measurements. Saturated and monounsaturated FA showed the poorest correlations ($r=-0.11$ to 0.41). In general, the Q presented the highest validity coefficients for the FA 15:0, 18:2 $n-6$ and 22:6 $n-3$. For 18:1 t and 18:2 t , moderate to good ρ were observed, ranging from 0.47 ($\rho_{BT18:1t}$) to 0.93 ($\rho_{BT18:2t}$). **Conclusions:** The Q was able to rank individuals according to their FA intake, particularly for the 15:0, SFA, 18:2 $n-6$, 18:1 t , 18:2 t , 22:6 $n-3$ and $n-3$ FA. This Q can be a valuable instrument to measure the FA intake in the study population.

Key words: method of triads, fatty acid intake, food frequency questionnaire, serum phospholipids, biomarker, dietary fats, trans fatty acids.

INTRODUCTION

Dietary fat plays an important role in the development or prevention of chronic diseases. Among all, the saturated (SFA) and the trans fatty acids (TFA) are considered the most unhealthy ones due to their effect on raising the total cholesterol and low density lipoprotein (LDL-c) and, for TFA, on reducing the high density lipoprotein (HDL-c). Monounsaturated (MUFA) and *n*-3 fatty acids are related with lowered cardiovascular risk [1,2].

In epidemiological studies, fat intake is often evaluated by the food frequency questionnaire (Q) validated for each specific population [3-5]. In the validation of Q, a reference method (R), such as multiple 24 hours food recalls (24hR) is generally used to reduce the intra and interpersonal variation, because the intake of a single day does not represent the dietary habit [6]. However, the 24hR is not a gold standard of the true dietary intake *per se* [7]. The limitations related with the use of multiple 24 hours recalls as the reference method is that errors associated with the Q may be correlated with those of R, due to both systematic and random errors, when estimating the portion size, daily variation in food intake, misreporting of amount eaten and inaccuracy of food tables data [8].

Fat is one of the most difficult dietary components to assess through traditional methods [9]. The fat intake is prone to bias for several reasons such as the social undesirability of fatty acid (FA) intake, especially among overweight; the lack of accuracy and completeness of local food composition databases. Also, it is very difficult for an individual to recognize and quantify the invisible fat intake, like the amount of oil added during a food preparation. Furthermore, the FA composition of certain foods differs dramatically between brands [5,9].

In this regard, the use of biological markers of fat intake may be useful as they are independent of the errors associated with the Q [8,10]. Some validation studies used the fatty acid composition of phospholipids (PL) fraction as a biomarker (B) of FA intake [11-13]. The fatty acids found in phospholipids seem to reflect their consumption a few weeks to months earlier. In addition, it is considered less invasive and less expensive than the adipose tissue biopsy analysis [12].

Kaaks (1997) has recommended the method of triads, when three measurements – food frequency questionnaire, reference method and biomarker – are available in a validation study. This technique allows the calculation of the validity coefficients between the three measurements and the true (but unknown) intake [14].

In the present study, we applied the method of triads to validate a fatty acid food frequency questionnaire especially designed for an adult population in Brazil, using serum phospholipids as the biomarker of fatty acid intake and four 24hR as the reference method.

METHODS

Study Population and Design

Volunteers were 240 adult residents from two regions of the city of Brasilia, Brazil, randomly selected from the Brazilian Institute of Geography and Statistics Population database of 2002. These volunteers participated in a home-interviewed pilot study about the risk factors for chronic diseases [15]. Briefly, in each residence an adult was randomly selected for the application of a questionnaire about risk factors for chronic diseases, blood collection to measure glucose, blood lipids and fatty acid composition. Measures of height, weight, abdominal circumference and blood pressure were also taken. Inclusion criteria were: 18 years of age or older, not been pregnant and to be capable of responding the

questionnaire. These interviews were done from October 2005 to January 2006. At the end of the study, 157 individuals were home-interviewed (65%) [15].

During the period from February to December 2006, volunteers were contacted 4 times in order to respond four 24hR and two Q. The reproducibility of the Q and its validation for other nutrients than fatty acids were performed in another study [unpublished data].

This study was approved by the Ethical Committee at University of Brasilia and all the participants gave their written informed consent.

Food Frequency Questionnaire and 24 Hour Recalls

Four home-interviewed 24hR were applied two months apart and the two Q were applied with the last two 24hR. The Q was developed according to Block (1986) [16] using food intake data assessed at the first 24hR application. The food items were grouped according to their similarity for energy, carbohydrate, fiber, cholesterol, fat, MUFA, SFA, TFA and polyunsaturated fatty acids (PUFA). In total, the Q included 60 food items, separated by 8 groups: cereals and starchy roots (12), leguminous and eggs (4), milk and dairy products (8), fruits and vegetables (4), juices (3), bakery products (6), meat and fish (11), and beverages (12). There were 11 predefined frequency options, ranging from “never” to “ten times” and 4 options to mark the period of consumption (annual, monthly, weekly and daily). The portion sizes were predefined as small, median and large, according to the percentiles 25, 50 and 75 of the foods consumed by all volunteers, respectively. During the application of the first Q, subjects were asked about additional food items consumed at least once a week. The nutrients estimated were energy, protein, carbohydrate, cholesterol, fiber, total fat, and specific fatty acids: 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, total SFA, 16:1,

18:1 *n*-9, total MUFA, 18:2 *n*-6, 20:4 *n*-6, total *n*-6, 18:3 *n*-3, 20:5 *n*-3, 22:6 *n*-3, total *n*-3, 16:1*t*, 18:1*t*,18:2*t* and total TFA. Subjects were asked to recall their frequency of consumption of food items over the preceding year. The Q was applied by trained nutrition students and it lasted approximately 40 minutes.

The dietary data were analysed in the software NUTWIN, version 1.5 (Sao Paulo, Brazil, 2005). This software uses US Department of Agriculture (USDA) [17] data of fatty acids, including trans fatty acids.

Serum Phospholipids Fatty Acids

Twelve-hour fasting blood samples were collected in the residence of each participant. Samples were stored in a cooler at 4°C and transported to the Laboratory of Nutritional Biochemistry of the University of Brasilia within 4 hours. Blood was centrifuged at 2,200rpm for ten minutes at 5°C to obtain serum which were stored at -70°C and analysed within 1 year after collection.

Total serum lipids were extracted with trichloromethane:methanol (2:1; vol:vol) [18]. Serum phospholipids were separated by one-dimensional thin-layer chromatography by using silica gel plates (Analtech, Inc Newark, DE) and hexane:diethyl ether:acetic acid (80:20:2; vol:vol:vol) development solvent system. The fatty acid methyl esters (FAMES) for all samples were transesterified by methanolysis with BHT (1% H_2SO_4 in methanol) for 12 hours at 30°C [19].

The FAME for individual fatty acids of serum phospholipids were separated on gas chromatography (model GC 17A – Shimadzu) equipped with a flame ionization detector (FID) and a split injection at 250°C. A flexible fused-silica capillary column, 100m x 250mm id and 0.20 μ m film thickness (SP2560 column, Supleco, Bellefonte, PA, USA),

was used with hydrogen as the carrier gas and a split ratio of 1:50. The 100m column was used as it is recommended for the separation of trans isomers [20]. The temperature program was: 125°C for 3 min, 125-170°C at 10°C/min increment, 170°C for 5 min, 170-175°C at 5°C/min, 175°C for 1 min, 175-185°C at 2°C/min, 185°C for 1 min, 185-190°C at 1°C/min, 190°C for 1 min, 190-240°C at 5°C/min, 240°C for 8 min.

Peak retention times and area percentages of total fatty acids were identified by injecting a 37 FAME mix (Supelco, Bellefonte, PA). The 18:1 t and 18:2 t were expressed as the sum of all their *trans* isomers and the fatty acid composition as relative weight percentages of the total fatty acids.

Statistical Analyses

All analyses in the present study were based on the subjects who had completed all three assessments (Q, R and B). For the fatty acid intake and phospholipids, means and standard deviations are presented. To evaluate the association of the three measurements, we estimated the crude and energy-adjusted Pearson partial correlation coefficients (4). Logarithmic transformations were used to improve normality for the phospholipid's fatty acids.

For some specific fatty acids the correlations between the three dietary exposure methods – Q, R and B – were used to calculate the validity coefficients by the method of triads [14]. This method is an application of the factor analysis model. This technique assumes that the correlations between the three measurements are all linearly correlated to the true intake and that the errors between these three methods are independent. However, we can not assume that the Q's errors are not correlated with those of the R. Thus, the validity coefficients may be overestimated. Kaaks (1997) suggests the use of the validity

coefficient (ρ) provided by the method of triads as an upper limit and the correlations between the Q and B as a lower limit of the true validity coefficients [14,21,22]. Briefly, the validity coefficients (ρ) can be estimated as follows:

$$\rho_{QT} = \sqrt{r_{QR} \times r_{QB} / r_{BR}};$$

$$\rho_{RT} = \sqrt{r_{QR} \times r_{BR} / r_{QB}}$$

$$\text{and } \rho_{BT} = \sqrt{r_{BR} \times r_{QB} / r_{QR}}$$

where Q is the measurement from the food frequency questionnaire, R from the reference method, B from the biomarker, r is the correlation coefficient and T is the true, but unknown, intake. Correlations coefficients and validity coefficients results were defined as poor ($r < 0.2$), moderate ($r = 0.2-0.6$) or good ($r > 0.6$) [21]. The 95% confidence intervals (95% CI) for the validity coefficients (ρ) were estimated by the 2.5th and 97.5th empirical percentiles for the replicates of estimated ρ from 1500 bootstrap samples of equal size sample ($n=80$). The SAS program (version 9.1, SAS Institute Inc, Cary, NC) was used for all statistical analyses and a 5% level of significance was used.

The ability of the Q to classify individuals into the same quartile of intake compared with the R and B was tested for those fatty acids which presented positive significant correlation coefficients for the 3 measurements – Q, R and B.

RESULTS

One hundred and six volunteers completed the first 24hR, and 85, 78 and 74, completed the second, third and fourth 24hR, respectively. For the Q, 73 participants completed the first and 72 the second. The reduction in the sample size were due to the change of address (21%), refusal to participate in the study (8.3%), absence of the chosen

adult in the day previously scheduled for the home-interview (2.6%) and death (0.6%). One-hundred and eight volunteers had their blood collected.

Eighty-one adults (63% female), with mean age of 41 years, completed at least three of the four 24hR, one of both Q and provided blood samples and, thus, entered in the analyses. Among the 81 respondents, 51% were overweight or obese, 16% were smokers and 22% had high blood pressure. Also, 54% of the population had a family income of 2 minimum wage (US\$460.00/month) and 62% studied less than 7 years (until primary school). Mean intake of TFA were 2.17g/day (1% of total energy intake) and 1.67g/day (0.87% of total energy intake) in the Q and 24hR, respectively.

The FA distribution in serum PL and diet are shown in Table 1. According to the Q, approximately 26% of total FA intake consisted of saturated fatty acids (SFA), 33% of MUFA, 33% of *n*-6 FA, 5% of *n*-3 FA and 4% of TFA. For the serum PL fatty acids, the corresponding values were 64% for SFA, 14% for MUFA, 16% of total *n*-6 FA, 3% of total *n*-3 FA and 2% of TFA. All fatty acids were relatively in higher proportions in the diet than in the serum PL, except for SFA (up to 2.5-fold higher in serum PL).

The Pearson correlation and partial Pearson correlation coefficients adjusted for energy between the three measurements are shown in Table 2. We presented the fatty acids that had at least one significant correlation. The highest crude correlations occurred between the Q and R ($r_{QR}=0.16-0.60$). The crude correlations between the dietary assessment methods and the biomarker ranged from 0.31 to 0.79. The trans fatty acids 18:1*t* and 18:2*t* showed moderate to good crude correlation coefficients for all three measurements (18:1*t* – $r_{QR}=0.54$; $r_{QB}=0.32$; $r_{BR}= 0.38$; 18:2*t* – $r_{QR}=0.55$; $r_{QB}=0.61$; $r_{BR}= 0.79$). SFA and MUFA showed the poorest crude correlation coefficients, ranging from -0.11 to 0.41.

Table 1. Distribution of fatty acids in serum phospholipids (% of total fatty acids) and diet (% of total fatty acids).

Fatty acids	Serum PL – mean (SD)	Q - mean (SD)	24hR - mean (SD)
15:0	0.65 (0.88)	0.0004 (0.0007)	0.0004 (0.0018)
16:0	30.90 (3.53)	16.29 (1.56)	15.89 (1.58)
17:0	1.35 (0.15)	0.0017 (0.002)	0.001 (0.003)
18:0	24.24 (2.77)	6.81 (0.84)	6.82 (0.84)
SFA	63.80 (6.16)	25.84 (3.61)	25.39 (3.53)
16:1 <i>n-9</i>	1.32 (0.90)	1.52 (0.40)	1.51 (0.50)
18:1 <i>n-9</i>	10.67 (1.22)	31.13 (2.31)	31.11 (3.00)
MUFA	14.38 (1.81)	32.78 (2.54)	32.80 (3.17)
18:2 <i>n-6</i>	9.31 (1.06)	32.59 (5.25)	33.90 (4.67)
20:4 <i>n-6</i>	5.18 (4.85)	0.21 (0.12)	0.21 (0.12)
Total <i>n-6</i>	16.45 (5.74)	32.81 (5.27)	34.12 (4.66)
18:3 <i>n-3</i>	1.85 (1.37)	4.20 (0.82)	4.43 (0.77)
20:5 <i>n-3</i>	0.23 (0.48)	0.08 (0.14)	0.06 (0.13)
22:6 <i>n-3</i>	1.09 (2.21)	0.26 (0.39)	0.20 (0.35)
Total <i>n-3</i>	3.19 (2.73)	4.62 (1.14)	4.76 (1.02)
16:1 <i>t</i>	0.98 (0.86)	0.23 (0.18)	0.02 (0.03)
18: <i>t</i>	1.03 (0.98)	3.34 (2.40)	2.58 (2.16)
18:2 <i>t</i>	0.06 (0.34)	0.36 (0.21)	0.30 (0.23)
TFA	2.08 (2.18)	3.93 (2.64)	2.91 (2.38)

Serum PL: Serum phospholipids
Q: Food Frequency Questionnaire
24hR: Mean of three or four 24 hour recalls
SD: Standard Deviation
SFA: Saturated fatty acids
MUFA: Monounsaturated fatty acids
TFA: Trans fatty acids

Table 2. Comparison of fatty acid intake (g/100g fat) assessed by the food frequency questionnaire (Q) and multiple 24 hour recalls (24hR) with phospholipids (PL) fatty acids (% of total fatty acids).

Fatty acid	Partial correlation coefficient					
	24hR X PL fatty acids		Q X PL fatty acids		Q X 24hR fatty acids	
	<i>r</i> Unadjusted	<i>r</i> Adjusted for energy intake	<i>r</i> Unadjusted	<i>r</i> Adjusted for energy intake	<i>r</i> Unadjusted	<i>r</i> Adjusted for energy intake
15:0	0.28 [†]	0.27 [†]	0.34*	0.20	0.33*	0.40*
16:0	0.24 [†]	0.18	0.25 [†]	0.17	0.16	-0.16
17:0	0.33*	0.41*	0.56 [†]	0.55 [†]	0.22	0.02
18:0	0.17	0.19	0.16	-0.16	0.30*	0.24 [†]
SFA	0.26 [†]	0.25 [†]	0.25 [†]	-0.11	0.24 [†]	0.17
16:1 <i>c</i>	0.26 [†]	0.21	0.02	0.02	0.32*	0.34*
18:1 <i>c</i>	0.23 [†]	0.32*	0.21	-0.02	0.35*	0.22
MUFA	0.25 [†]	0.17	0.09	-0.07	0.33*	0.20
18:1 <i>t</i>	0.38 [†]	0.26	0.32 [†]	0.29	0.54*	0.39*
18:2 <i>t</i>	0.79 [†]	0.78	0.61 [†]	0.61 [†]	0.55*	0.46*
TFA	0.27 [†]	0.08	0.24	0.22	0.60*	0.60*
18:2 <i>n</i> -6	0.24 [†]	0.28 [†]	0.25 [†]	0.14	0.37*	0.32*
Total <i>n</i> -6	-0.31*	-0.31*	-0.29*	-0.14	0.45*	0.42*
18:3 <i>n</i> -3	0.07	-0.22	-0.24 [†]	-0.18	0.33*	0.30*
20:5 <i>n</i> -3	0.40 [†]	0.36 [†]	0.32	0.32	0.27 [†]	0.28 [†]
22:6 <i>n</i> -3	0.24 [†]	0.24	0.37 [†]	0.37 [†]	0.40*	0.40*
Total <i>n</i> -3	0.31 [†]	0.31 [†]	0.21 [†]	0.33*	0.32*	0.29 [†]
PUFA	-0.27 [†]	-0.28 [†]	-0.34*	-0.20	0.36*	0.32*

**p*<0.01

[†] *p*<0.05

r: Partial Pearson Correlation Coefficient

Table 3 shows the validity coefficient, its 95% IC and its range among the 3 measurements. We were not able to apply the method of triads for all fatty acids, because there were negative correlations for some of them. Indeed, the validity coefficients were calculated for the following fatty acids: 15:0, total SFA, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2 *n*-6, 22:6 *n*-3 and total *n*-3 fatty acids, which presented positive significant Pearson correlation for all the three measurements. In general, the highest validity coefficients were obtained for the Q

($\rho_{QT15:0}=0.63$, $\rho_{QT18:2\ n-6}=0.62$, $\rho_{QT22:6\ n-3}=0.78$). For the fatty acids 15:0, SFA, 18:2 *n-6* and total *n-3*, two of the three ρ were similar, suggesting that the at least two of the methods yielded similar measurements of the FA intake. For the TFA 18:1*t* and 18:2*t* moderate to good validity coefficients were observed, ranging from 0.47 ($\rho_{BT18:1t}$) to 0.93 ($\rho_{BT18:2t}$).

Table 3. Validity coefficients of the food frequency questionnaire (Q), multiple 24 hour recalls (24hR) and the biomarkers (B) of fatty acid intake as calculated for the method of triads and the 95% CI (n=81)*.

Fatty acid	Validity coefficients [†]						Range of the validity coefficients [‡]		
	ρ_{QT}	95%CI	ρ_{BT}	95%CI	ρ_{RT}	95%CI	ρ_{QT}	ρ_{BT}	ρ_{RT}
15:0	0.63	0.06-1.00	0.54	0.07-1.00	0.52	0.08-1.00	0.34-0.63	0.33-0.54	0.34-0.52
SFA	0.48	0.07-1.00	0.52	0.03-0.75	0.50	0.15-1.00	0.25-0.48	0.24-0.52	0.25-0.50
18:1 <i>t</i>	0.67	0.15-1.00	0.47	0.03-0.47	0.80	0.24-1.00	0.32-0.67	0.54-0.47	0.32-0.80
18:2 <i>t</i>	0.65	0.38-1.00	0.93	0.10-1.00	0.84	0.12-1.00	0.61-0.65	0.55-0.93	0.61-0.84
18:2 <i>n-6</i>	0.62	0.11-1.00	0.40	0.06-1.00	0.60	0.25-1.00	0.25-0.62	0.37-0.40	0.25-0.60
22:6 <i>n-3</i>	0.78	0.22-1.00	0.47	0.11-1.00	0.51	0.04-0.92	0.37-0.78	0.40-0.47	0.37-0.51
Total <i>n-3</i>	0.47	0.09-1.00	0.45	0.03-0.56	0.69	0.12-1.00	0.21-0.47	0.32-0.45	0.21-0.69

* The validity coefficients were not calculated for the other fatty acids owing that one of the three correlations was negative.

[†] All values >1.00 were truncated as 1.00.

[‡] The lower limit for the Q and biomarker is represented by the correlation between the Q and B; the lower limit for the R by the correlation between the B and the R; and the upper limit was calculated by the method of triads.

The study group was divided into quartiles based on their 15:0, SFA, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2 *n-6*, 22:6 *n-3* and *n-3* intake (Table 4). The Q's ability to classify individuals into the same or adjacent quartile of intake as the R24h ranged between 59 and 77%, while using the biomarker it ranged from 54 to 84%. We observed the highest percent of individuals classified into the same or adjacent quartile for 18:1*t* (80%) and 18:2*t* (84%) and no individual classified into the opposite quartile for the 18:2*t* and 10% for the 18:1*t*, when the Q were compared to B.

Table 4. Agreement of quartile assignment (%) between food frequency questionnaire (Q), reference method (R) and biomarker (B), n=81.

Fatty acid	Q x R			Q x B			R x B		
	Same quartile (%)	Same or adjacent quartile (%)	Grossly misclassified* (%)	Same quartile (%)	Same or adjacent quartile (%)	Grossly misclassified* (%)	Same quartile (%)	Same or adjacent quartile (%)	Grossly misclassified* (%)
15:0	53	77	6	26	67	10	64	88	6
SFA	25	69	12	28	65	9	19	58	11
18:1 t	28	67	11	35	80	10	17	69	11
18:2 t	33	69	22	51	84	0	15	77	15
18:2 n -6	31	72	11	33	64	10	26	57	14
22:6 n -3	27	59	10	30	54	16	30	64	7
Total n -3	36	75	10	26	62	15	30	69	10

Q: Food frequency questionnaire; R: Multiple 24 hour recalls; B: biomarker (serum phospholipids fatty acids).

* Classified from one extreme quartile to the other extreme quartile.

DISCUSSION

Unlike most Brazilian validation studies, in which data from Q were validated against multiple 24hR [23-25], this study estimated the fatty acid intake by using three methods – Q, multiple 24hR and a biomarker. The results of this study suggest that the food frequency questionnaire developed here has an acceptable validity for several fatty acids, especially 15:0, SFA, 18:2 n -6, 18:1 t , 18:2 t , 22:6 n -3 and total n -3.

The ideal biomaker of fatty acid intake would be the one that is based on precise and quantitative knowledge of the physiological balance between intake and output, known as recovery-based markers [7]. These markers provide an accurate and direct estimative of their quantitative relationship with the dietary intake. Biomarkers for energy (doubly labeled water), potassium (urinary excretion of potassium) and protein (24-hour urinary nitrogen) [7] are well known recovery markers but until now there is no recovery-based marker of fatty acid intake. For fatty acids and most of the nutrients there is only concentration-based markers, which are based on the concentration's measurement of a

specific compound, at a given point of time. These markers can not be translated into absolute intakes levels per day, but at very best can provide only a correlate of dietary intake levels [7]. Some fatty acid validation studies used the adipose tissue as the biomarker of FA intake which has indicated to reflect the previous 1 to 2 years of FA intake. We used serum PL FA, which is less invasive, inexpensive and reflects the ingestion of the previous weeks to months [9,26]. Both adipose tissue and phospholipids FA are considered concentration-based markers of FA intake. Also, for specific fatty acids, some studies showed no difference between the correlation of adipose tissue and blood biomarkers with the FA intake [4,27,28].

The *n*-6 and *n*-3 fatty acids compete for desaturases and elongases in their metabolism [29]. The total *n*-6/total *n*-3 ratio of 4:1 seems to be acceptable for individuals with a low intake of 20:5 *n*-3 and 22:6 *n*-6 [30]. In this study, the total *n*-6/total *n*-3 ratio was 5.15 in phospholipids and 7.1 in both Q and 24hR.

The fatty acid composition of phospholipids contributes significantly to the physical and biochemical properties of membranes [31]. It is well established that all fatty acids can be incorporated into cell phospholipids and thereby modify the membranes. *Trans* fat uptake into membranes was reported to directly reflect the dietary *trans* levels [32]. Once incorporated into phospholipids, the membrane fluidity and the activity of several integral proteins was shown to be altered [33]. Niu, Mitchell and Litman (2005) found that the TFA in the phospholipids had a higher cholesterol affinity, resulting in a higher level of cholesterol incorporated into these membranes, when compared with the *cis* isomers [33]. In our study, we found 2.08% TFA of total FA in the blood phospholipids, which was similar to the amount found in the plasma of US women (TFA= 1.98) [34], but higher than TFA phospholipids found in maternal serum at the end of pregnancy (TFA=1.31) [35]

and TFA plasma phospholipids in an ethnically diverse cohort living in Australia (TFA=1.0) [36].

The fatty acids with the highest correlation coefficients for the three measurements were those which are not endogenously synthesized, such as 15:0, 18:1*t*, 18:2*t* and 18:2 *n*-6 (Table 3). We also observed moderate correlations between the three methods for the 22:6 *n*-3 and total *n*-3 FA. In general, for the 22:6 *n*-3 and long chain *n*-3 FAs, the dietary intake is considered their main sources, although small amounts of 18:3*n*-3 can be converted to 20:5*n*-3 and a minimal amount is converted to 22:6*n*-3 [29,37]. Some studies have also found a positive relation between the *n*-3 intake and its amount in the PL [21,36].

Correlations between the Q and R in the present study were moderated to good ($r=0.24-0.60$), for 9 of the 13 FA measured (Table 3), indicating that the Q was able to rank individuals for most fatty acids. These correlations were also observed in other fatty acid validation studies [3,4,21,38]. In the study of McNaughton [21], 44 participants completed a Q and 12 weighed food recalls. Moderate to good correlations were observed for all FA, except for TFA ($r=0.03$). On the contrary, the study of Cantwell [5] showed high correlations coefficients for TFA between the fat intake questionnaire and a modified diet history ($r=0.67$). In our study, the highest correlations for Q and R were found for trans fatty acids ($r_{QR18:1t}=0.54$, $r_{QR18:2t}=0.55$). The main sources of these FA were filled cookies, ruminant meat, margarine, milk, cake powder, industrialized bread, French fries, pork sausage, sausage, cream cheese and olive oil [data not shown].

The best correlations between the Q and the B were observed for 18:2*t* ($r_{QB}=0.61$ and $r_{BR}=0.79$) as it occurred in the study with a Costa Rican population, where the highest correlations for TFA intake and biomarkers were observed for the 18:2*t* ($r_{QB}=0.24$, for plasma as biomarker and $r_{QB}=0.40$, for adipose tissue as biomarker) [37]. We also found significant correlations between Q and serum PL for most of the FA (Table 3). Lower

correlations for the palmitoleic (16:1*c*) and arachidonic acids (20:4 *n*-6) were observed with plasma PL as the biomarker in an Australian population [36] and with the Costa Rican population, in which the adipose tissue was used as the biomarker [39]. The poor correlations could reflect the endogenous synthesis of these FA [4,9]. The adjustment for energy intake improved the correlation coefficients for some FA and lowered it for others, as it was observed in other studies [4,36].

The method of triads have been applied in a few validation studies [40-46] and only in three validation studies of fatty acid intake [4,21,27]. In this study we were able to calculate the validity coefficients (ρ) for the fatty acids 15:0, SFA, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2 *n*-6, 22:6 *n*-3 and total *n*-3. For these fatty acids, the ρ ranged from 0.40 to 0.93. The validity coefficients suggested that the biomarker was the best measurement of dietary intake for SFA and 18:2*t*. For the 15:0, 18:2 *n*-6 and 22:6 *n*-3, the Q was best correlated with the true intake (Table 4). The study of McNaughton et al (2007), using plasma PL as biomarker of FA intake, showed high ρ values for the total *n*-3, total long-chain *n*-3, arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosaexaenoic acid (DHA). In general, the biomarker presented the lowest ρ , ranging from 0.29 (ρ BT 20:4 *n*-6) to 0.60 (ρ BT long-chain *n*-3). In that study, the authors did not find significant correlations for TFA, which was attributed to the decrease in TFA content of the food supply in Australia [21].

Although all the previous studies [21,27,40-46] used 1000 bootstrap samples to calculate the 95% CI, we used 1500 bootstrap samples because of the high proportion of missing validity coefficients (data not shown). In general, missing validity coefficients in the bootstrap samples occur when at least one correlation (r_{QR} , r_{QB} or r_{BR}) between the three measures includes zero in the 95% CI. Also, we observed the existence of validity coefficient's 95% CI >1 (Table 3). This limitation is known as Heywood cases, which may

result from either random sampling fluctuations or violations to the model assumptions [14,22].

Some studies have shown association of the odd fatty acids, 15:0 and 17:0, with dairy products intake as those fatty acids are not synthesized by humans, but by the bacterial flora in the rumen of ruminants [2,27]. In those studies, the 15:0 were better correlated to the dairy product intake than the 17:0. The study of Brevik et al (2005) examined the relation between the dairy fat intake and the proportion of pentadecanoic and heptadecanoic acids in serum phospholipids and adipose tissue as biomarkers. The authors found no positive significant associations between the 17:0 intake and its content in the serum and adipose tissue. The highest validity coefficients were observed for the reference method (0.80 to 1.00). They found moderate ρ_{BT} (0.49) between the intake of dairy products (main source of 15:0) and the biomarkers. Thus, serum proportions of 15:0 seem to perform equally well as 15:0 in adipose tissue [27]. In our study, we observed moderate to good validity coefficients of the 15:0 ($\rho_{QT}= 0.63$; $\rho_{BT}=0.54$; $\rho_{RT}=0.52$).

In the study with a Costa Rican population, the authors applied the method of triads to evaluate the performance of a Q for several micronutrients and fatty acids [4]. They used adipose tissue as B and seven 24hR as the R. The 18:2 n -6 presented the highest validity coefficients for the Q ($\rho_{QT}=0.89$) and B ($\rho_{BT}=0.67$). The study found moderate to good ρ_{QT} and ρ_{RT} , but poor to moderate ρ_{BT} for SFA and MUFA [5]. The disparity between estimates obtained from those studies could be due to differences in the sample size, the biomarker of FA intake, the methodology of FA analysis, the structure and size of the Q, lack of accurate food composition tables, and differences in the populations studied [5].

In order to know the relative validity of a Q, Masson et al [47] recommend the use of correlations coefficients and the classification of subjects into categories (terciles, quartiles or quintiles) of intake. For epidemiological studies, they recommend more than

50% of subjects correctly classified and less than 10% grossly misclassified for nutrients of interest [43]. In this study, the quartile assignment proved that the Q was able to adequately identify individuals according to their PL FA levels of the 15:0, SFA, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2 *n*-6, 22:3 *n*-3 and *n*-3, as more than 50% of the study population were classified into the same or adjacent quartile of intake. When Q and R were compared, 10% or less of the individuals were grossly misclassified for 15:0, 22:6 *n*-3 and *n*-3 FA. In the comparison of Q and B, 10% or less were misclassified for 15:0, SFA, 18:1*t*, 18:2*t* and 18:2 *n*-6. These results are in agreement with the correlation and validity coefficients found in this study.

The subjects of this study had some important characteristics to be considered as source of possible bias: they were low-income and low-literacy individuals [30]. Furthermore, there was a difference in the time frame of the biomarker (serum PL FA reflects the weeks to months earlier) and the Q and 24hR, which spanned through 1 year of data collection. In addition, we should consider the limitation inherent to the dietary assessment methods, such as food composition tables, especially for fatty acids. We used the fatty acid composition of the USDA database, as there wasn't a complete Brazilian food table available for the fatty acid food composition when the study was initiated. This study was applied in the same year in which Brazilian Government introduced the resolution on mandatory labelling of TFA content in food products. Since then, TFA content of food products have systematically been lowered by the industries. Thus, it may be possible that ingestion of TFA among this population have decreased, requiring adjustment to the new consumption pattern.

In summary, the fatty acid food frequency questionnaire designed for an adult population in Brazil seems to have an acceptable validity for fatty acids, particularly for 15:0, SFA, 18:2 *n*-6, 18:1*t*, 18:2*t*, 22:6 *n*-3 and *n*-3, as observed by the validity coefficients of the three methods applied and the true intake. The results suggest that this food

frequency questionnaire is a valid instrument to assess the fatty acid intake allowing associations between the dietary exposure and the development of chronic diseases in this population.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Scientific Council of Technological Development (CNPq) and CAPES for the financial support.

References

- 1) WHO/FAO. Expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, Switzerland, 2002.
- 2) Wolk A, Vessby B, Ljung H, Barrefors P: Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *Am J Clin Nutr* 1998, 68: 291-295.
- 3) Lemaitre RN, King IB, Patterson RE, Psaty BM, Heckbert SR: Assessment of trans-fatty acid intake with a food frequency questionnaire and validation with adipose tissue levels of trans-fatty acids. *Am J Epidemiol* 1998, 148 (11): 1085-1093.
- 4) Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X, Spiegelman D, Campos H: Application of the method of triads to evaluate the performance of food frequency questionnaires and biomarkers as indicators of long-term dietary intake. *Am J Epidemiol* 2001, 154: 1126-35.
- 5) Cantwell MM, Gibney MJ, Cronin D, Younger KM, Neill JPO, Hogan L, Flynn MAT: Development and validation of a food-frequency questionnaire for the determination of detailed fatty acid intakes. *Pub Health Nutr* 2004, 8 (1): 97-107.
- 6) Freedman LS, Midthune D, Carroll RJ, Smith SK, Subar AF, Troiano RP, Dodd K, Schatzkin A, Ferrari P, Kipnis V: Adjustments to improve the estimation of usual dietary intake distributions in the population. *J Nutr* 2004, 134: 1836-1843.
- 7) Kaaks R, Ferrari P, Ciampi A, Plummer M, Riboli E: Uses and limitations of statistical accounting for random error correlations, in the validation of dietary questionnaire assessments. *Pub Health Nutr* 2002, 5(6A): 969-976.
- 8) Bingham S: Biomarkers in nutritional epidemiology. *Pub Health Nutr* 2002, 5 (6A): 821-827.

- 9) Arab L, Akbar J: Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Pub Health Nutr* 2002, 5 (6A): 865-871.
- 10) Potischman N: Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr* 2003, 133: 875S-880S.
- 11) Skeaf CM, Gowans S: Home use of margarine is an important determinant of plasma trans fatty acid status: a biomarker study. *Br J Nutr* 2006, 96: 377-383.
- 12) King IB, Lemaitre RN, Kestin M: Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesterol esters: investigation of a biomarker of total fat intake. *Am J Clin Nutr* 2006, 83: 227-236.
- 13) Beydoun MA, Kaufman JS, Ibrahim J, Satia JA, Heiss G. Measurement error adjustment in essential fatty acid intake from a food frequency questionnaire: alternative approaches and methods. *BMC Med Res Methodol* 2007; 14: 7-41.
- 14) Kaaks RJ: Biochemical markers as additional measurements in studies of the accuracy of dietary questionnaire measurements: conceptual issues. *Am J Clin Nutr* 1997, 65 (suppl): 1232S-1239S.
- 15) Yokota RTC, Vasconcelos TF, Ito MK, Dutra ES, Baiocchi KC, Hamann EM, Lopes EB, Barbosa RB. Prevalência de fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis em duas regiões do Distrito Federal. *Com Ciências Saúde* 2007, 18 (4): 289-296. [Portuguese]
- 16) Block G, Hartman AM, Dresser CM, Carroll MD, Gannon J, Gardner L: A data-based approach to diet questionnaire design and testing. *Am J Epidemiol* 1986, 124 (3): 453-69.
- 17) USDA – United States Department of Agriculture. Composition of foods raw, processed, prepared in USDA Nutrient database for standard reference. Release 13.

- Beltsville, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient data laboratory, 1999.
- 18) Folch J, Lees M, Stanley SGH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957, 226:497-509.
 - 19) Hamilton RJ, Hamilton S: *Lipid analysis: a practical approach* 1992. IRL PRESS.
 - 20) Ratnayake WMN: Overview of methods for the determination of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography, silver-ion liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 2004, 87 (2): 523-539.
 - 21) Mcnaughton SA, Hughes MC, Marks GC: Validation of a FFQ to estimate the intake of PUFA using plasma phospholipid fatty acids and weighed food records. *Br J Nutr* 2007, 97: 561-568.
 - 22) Ocké MC, Kaaks RJ: Biochemical markers as additional measurements in dietary validity studies: application of the method of triads with examples from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 1997, 65 (suppl): 1240S-1245S.
 - 23) Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 2006, 83 (suppl): 1526S-35S.
 - 24) Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Rev Nutr* 2006, 19 (6): 761-70 [Portuguese].
 - 25) Sichieri R, Everhart JE: Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Rev Nutr* 1998; 18 (10): 1649-59.

- 26) Fornés NS, Stringhini MLF e Elias BM: Reproducibility and validity of a food-frequency questionnaire for use among low-income Brazilian workers. *Pub Health Nutr* 2003; 6 (8): 821-827.
- 27) Cardoso MA, Kida AA, Tomita LY, Stocco PR: Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among women of Japanese ancestry living in Brazil. *Nut Res* 2001; 21: 725-733.
- 28) Arab L: Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr* 2003, 133:925S-932S.
- 29) Brevik A, Veierod MB, Drevon CA, Andersen LA: Evaluation of the odd fatty acids 15:0 and 17:0 in serum and adipose tissue as markers of intake of milk and dairy fat. *Eur J Clin Nutr* 2005, 59: 1417-1422.
- 30) Baylin A, Kim MK, Palmer AD, Siles X, Dougherty L, Tocco P, Campos H: Fasting whole blood as a biomarker of essential fatty acid intake in epidemiologic studies: comparison with adipose tissue and plasma. *Am J Epidemiol* 2005, 162 (4): 373-381.
- 31) Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lip Res* 2008, 47: 348-380.
- 32) Roach C, Feller SE, Ward JA, Shaikh SR, Zerouga M, Stillwell W. Comparison of *Cis* and *Trans* fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties. *Biochemistry* 2004, 43: 6344-51.
- 33) Niu SL, Mitchell DC, Litman BJ. *Trans* fatty acid derived phospholipids show increased membrane cholesterol and reduced receptor activation as compared to their *cis* analogs. *Biochemistry* 2005, 44: 4458-65.

- 34) Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Hu FB. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr* 2007, 86: 74-81.
- 35) De Vriese SR, Christophe AB, Maes M. Fatty acid composition of phospholipids and cholesteryl esters in maternal serum in the early puerperium. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids* 2003, 68 (5): 331-335.
- 36) Hogde AM, Simpson JA, Gibson RA, Sinclair AJ, Makrides M, O'Dea K, English DR, Giles GG: Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007, 17(6): 415-426.
- 37) Welch AA, Bingham SA, Ive J, Friesen MD, Wareham NJ, Riboli E, Khaw KT: Dietary fish intake and plasma phospholipid n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations in men and women in the European Prospective Investigation into Cancer – Norfolk United Kingdom Cohort. *Am J Clin Nutr* 2006, 84: 1130-1339.
- 38) Parra MS, Schnaas L, Meydani M, Perroni E, Martinez S, Romieu I: Erythrocyte cell membrane phospholipid levels compared against reported dietary intakes of polyunsaturated fatty acids in pregnant Mexican women. *Pub Health Nutr* 2002, 5(6A): 931-937.
- 39) Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H: Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 2002, 76: 750-757.
- 40) Fowke JH, Hebert JR, Fahey: Urinary excretion of dithiocarbamates and self-reported cruciferous vegetable intake: application of the method of triads to a food-specific biomarker. *Pub Health Nutr* 2002, 5 (6): 791-799.
- 41) Pufulete M, Emery PW, Nelson M, Sanders AB: Validation of a short food frequency questionnaire to assess folate intake. *Br J Nutr* 2002, 87: 383-390.

- 42) Andersen LF, Veierod MB, Johansson L, Sakhi A, Solvoll K, Drevon CA: Evaluation of three dietary assessment methods and serum biomarkers as measures of fruit and vegetable intake, using the method of triads. *Br J Nutr* 2005, 93: 519-527.
- 43) Shai I, Rosner BA, Shahar DR, Vardi H, Azrad AB, Kanfi A, Schwarzfuchs D, Fraser D: Dietary evaluation and attenuation of relative risk: multiple comparisons between blood and urinary biomarkers, food frequency, and 24-hour recall questionnaires: the DEARR Study. *J Nutr* 2005, 135: 573-579.
- 44) Bhakta D, Silva IS, Higgins C, Sevak L, Kassam-Khamis T, Mangtani P, Adlercreutz H, McMichael A: A semiquantitative food frequency questionnaire is a valid indicator of the usual intake of phytoestrogens by South Asian women in the UK relative to multiple 24-h recalls and multiple plasma samples. *J Nutr* 2005, 135: 116-123.
- 45) McNaughton SA, Marks GC, Gaffney P, Williams G, Green A: Validation of a food-frequency questionnaire assessment of carotenoid and vitamin E intake using weighed food records and plasma biomarkers: the method of triads model. *Eur J Clin Nutr* 2005, 59: 211-218.
- 46) Verkleij-Hagoort AC, Vries JHM, Stegers MPG, Lindemans J, Ursem NTC, Steegers-Theunissen RPM: Validation of the assessment of folate and vitamin B12 intake in women of reproductive age: the method of triads. *Eur J Clin Nutr* 2007, 61: 610-615.
- 47) Masson LF, McNeill G, Tomany JO, Simpson JA, Peace HS, Wei L et al: Statistical approaches for assessing the relative validity of a food frequency questionnaire: use of correlation coefficients and the kappa statistic. *Pub Health Nutr* 2003, 16 (3): 313-321.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Dos 14 ácidos graxos identificados no fosfolípido sérico, 12 apresentaram correlação significativa com recordatório de 24 horas (R) e/ou questionário de frequência alimentar (Q).
- As correlações entre biomarcador e R ou Q foram maiores para os ácidos graxos não sintetizados endogenamente (15:0, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2*n*-6), enquanto para os ácidos graxos saturados e monoinsaturados as correlações foram menores.
- O coeficiente de validade (ρ) do Q dos ácidos graxos 15:0, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2*n*-6 e 22:6*n*-3 foram elevados, variando de $\rho=0,68$ a 0,78.
- O AG 18:2*t* sérico pode ser considerado um bom biomarcador do seu consumo por ter apresentado o maior ρ , tanto em relação aos outros AG quanto aos outros instrumentos de avaliação do consumo, e devido a sua elevada capacidade em classificar indivíduos de acordo com a ingestão estimada pelo Q.
- O Q pode ser considerado um instrumento válido para estimar o consumo de ácidos graxos na população deste estudo, principalmente para os AG 15:0, 18:1*t*, 18:2*t*, 18:2*n*-6 e 22:6*n*-3.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Achutti A, Azambuja MIR. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: repercussões do modelo de atenção à saúde sobre a seguridade social. *Ciênc Saúde Coletiva* 2004; 9 (4): 833-840.

Andersen LF, Veierod MB, Johansson L, Sakhi A, Solvoll K, Drevon CA. Evaluation of three dietary assessment methods and serum biomarkers as measures of fruit and vegetable intake, using the method of triads. *Br J Nutr* 2005; 93: 519-527.

Arab L, Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Pub Health Nutr* 2002; 5 (6A): 865-871.

Arab L. Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr* 2003; 133: 925S-932S.

Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 750-757.

Baylin A, Kim MK, Palmer AD, Siles X, Dougherty L, Tocco P, Campos H. Fasting whole blood as a biomarker of essential fatty acid intake in epidemiologic studies: comparison with adipose tissue and plasma. *Am J Epidemiol* 2005; 162 (4): 373-381.

Beydoun MA, Kaufman JS, Ibrahim J, Satia JA, Heiss G. Measurement error adjustment in essential fatty acid intake from a food frequency questionnaire: alternative approaches and methods. *BMC Med Res Methodol* 2007; 7:41.

Bhakta D, Silva IS, Higgins C, Sevak L, Kassam-Khamis T, Mangtani P, Adlercreutz H, McMichael A. A semiquantitative food frequency questionnaire is a valid indicator of the usual intake of phytoestrogens by South Asian women in the UK relative to multiple 24-h recalls and multiple plasma samples. *J Nutr* 2005; 135: 116-123.

Bingham SA. Biomarkers in nutritional epidemiology. *Pub Health Nutr* 2002; 5 (6A): 821-827.

Blanck HM, Bowman BA, Cooper GR, Myers GL, Miller DT. Laboratory issues: use of nutritional biomarkers. *J Nutr* 2003; 133: 888S-894S.

Block G, Hartman AM, Dresser CM, Carrol MD, Gannon J, Gardner L. A data-based approach to diet questionnaire design and testing. *Am J Epidemiol* 1986; 124 (3): 453-469.

Brasil. Ministério da Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro. Brasília: Organização Panamericana de Saúde, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. VIGITEL Brasil 2006: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília, 2007.

Brevik A, Veierod MB, Drevon CA, Andersen LA. Evaluation of the odd fatty acids 15:0 and 17:0 in serum and adipose tissue as markers of intake of milk and dairy fat. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59: 1417-1422.

Buzzard M. 24-hour recall and food record methods. In: Willett WC. *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998. p.50-73.

Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilization of food-frequency questionnaires – a review. *Pub Health Nutr* 2002; 5 (4): 567-587.

Cantwell MM, Gibney MJ, Cronin D, Younger KM, Neill JPO, Hogan L, Flynn MAT. Development and validation of a food-frequency questionnaire for the determination of detailed fatty acid intakes. *Pub Health Nutr* 2004; 8 (1): 97-107.

Cantwell MM. Assessment of individual fatty acid intake. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 187-191.

Christie WW. Method for separation of simple lipid classes. In: *Lipid Analysis*. England: The Oily Press; 2003. p.105 a 135.

Dixon LB, Subar AF, Wideroff L, Thompson FE, Kahle LL, Potischman N. Carotenoid and tocopherol estimates from the NCI diet history questionnaire are valid compared with multiple recalls and serum biomarkers. *J Nutr* 2006; 136: 3054-3061.

Efron B, Gong G. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *Am Stat* 1983; 37: 36-48.

Fisberg RM, Martini LA, Slater B. Métodos de inquéritos alimentares. In: Fisberg RM, Slater B, Marchioni DML, Martini LA. Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos. São Paulo: Manole; 2005. p.1-31.

Folch J, Lees M, Stanley SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957, 226:497-509.

Fowke JH, Hebert JR, Fahey. Urinary excretion of dithiocarbamates and self-reported cruciferous vegetable intake: application of the 'method of triads' to a food-specific biomarker. *Pub Health Nutr* 2002; 5 (6): 791-799.

Freedman LS, Midthune D, Carroll RJ, Smith SK, Subar AF, Troiano RP, Dodd K, Schatzkin A, Ferrari P, Kipnis V. Adjustments to improve the estimation of usual dietary intake distributions in the population. *J Nutr* 2004; 134: 1836-1843.

Fremann DF, Linseisen J, Wolfram G. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) intake assessment and possible biomarkers of CLA intake in young women. *Pub Health Nutr* 2001; 5 (1): 73-80.

Garland MG, Sacks FM, Colditz GA, Rimm EB, Sampson LA, Willett WC, Hunter DJ. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:25-30.

Gebauer SK, Psota TL, Kris-Etherton PM. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids* 2007; 42: 787-799.

Gibson RS. Anthropometric assessment of body composition. In: *Principles of Nutritional Assessment*. New York: Oxford University Press; 1990. p. 187-207.

Gibson RS. Measuring food consumption of individuals. In: *Principles of Nutritional Assessment*. New York: Oxford University Press; 2005. p.41-64.

Hair Jr JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Modelagem de equações estruturais. In: *Análise multivariada de dados*. Porto Alegre: Bookman; 2005. p. 465-513.

Hegsted DM. Serum-cholesterol response to dietary cholesterol: a re-evaluation. *Am J Clin Nutr* 1986, 44: 299-305.

Henderson JR, Tocher DR. Thin-layer chromatography. In: Hamilton RJ, Hamilton S. Lipid analysis: a practical approach. Manchester: IRL PRESS; 1992. p. 65-111.

Hjartaker A, Lund E, Bjerve KS. Serum phospholipid fatty acid composition and habitual intake of marine foods registered by a semi-quantitative food frequency questionnaire. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51: 736-42.

Hunter D. Biochemical indicators of dietary intake. In: *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998. p.174-243.

Kaaks R, Ferrari P, Ciampi A, Plummer M, Riboli E. Uses and limitations of statistical accounting for random error correlations, in the validation of dietary questionnaire assessments. *Pub Health Nutr* 2002; 5 (6A): 969-976.

Kaaks R, Ferrari P. Dietary intake in epidemiology: can we know what we are measuring? *Ann Epidemiol* 2006; 16: 377-380.

Kaaks RJ. Biochemical markers as additional measurements in studies of the accuracy of dietary questionnaire measurements: conceptual issues. *Am J Clin Nutr* 1997; 65 (suppl): 1232S-1239S.

Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X, Spiegelman D, Campos H. Application of the method of triads to evaluate the performance of food frequency questionnaires and biomarkers as indicators of long-term dietary intake. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 1126-1135.

Katan MB, Zock PL, Meninsk RP. Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr* 1994; 60 (suppl): 1017S-1022S.

Keys A. Serum cholesterol response to dietary cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1984; 40: 351-359.

King IB, Lemaitre RN, Kestin M. Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesterol esters: investigation of a biomarker of total fat intake. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 227-236.

Kuriki K, Nagaya T, Tokudome Y, Imaeda N, Fujiwara N, Sato J, Goto C, Ikeda M, Maki S, Tajima K, Tokudome S. Plasma concentrations of (n-3) highly unsaturated fatty acids are good biomarkers of relative dietary fatty acid intake: a cross-sectional study. *J Nutr* 2003; 133: 3643-3650.

Lemaitre RN, King IB, Patterson RE, Psaty BM, Heckbert SR. Assessment of trans-fatty acid intake with a food frequency questionnaire and validation with adipose tissue levels of trans-fatty acids. *Am J Epidemiol* 1998; 148 (11): 1085-1093.

London SJ, Sacks FM, Caesar J, Stampfer MJ, Siguel E, Willett WC. Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue and diet in postmenopausal US women. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 340-5.

Lopes ACS, Caiaffa WT, Mingoti SA, Lima-Costa MFF. Ingestão alimentar em estudos epidemiológicos. *Rev. bras. epidemiol.* 2003; 6 (3): 209-219.

Ma J, Folsom AR, Shahar E, Eckfeldt JH. Plasma fatty acid composition as an indicator of habitual dietary fat intake in middle-aged adults. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 564-571.

Marshall JR. Methodologic and statistical considerations regarding use of biomarkers of nutritional exposure in epidemiology. *J Nutr* 2003; 133: 881S-887S.

Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEE, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr* 2006; 19 (6): 761-770.

McNaughton SA, Hughes MC, Marks GC. Validation of a FFQ to estimate the intake of PUFA using plasma phospholipid fatty acids and weighed food records. *Br J Nutr* 2007; 97: 561-568.

McNaughton SA, Marks GC, Gaffney P, Williams G, Green A. Validation of a food-frequency questionnaire assessment of carotenoid and vitamin E intake using weighed food records and plasma biomarkers: the method of triads model. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59: 211-218.

Meninsk RP, Katan MB. Effect dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 1990; 323: 439-445.

Meninsk RP, Katan MB. Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoprotein in healthy men and women. *Lancet* 1987; 1: 122-125.

Nikkari T, Luukkainen P, Pietinen P, Puska P. Fatty acid composition of serum lipid fractions in relation to gender and quality of dietary fat. *Ann Med* 1995; 27: 491-498.

Ocké MC, Kaaks RJ. Biochemical markers as additional measurements in dietary validity studies: application of the method of triads with examples from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 1997; 65 (suppl): 1240S-1245S.

Pereira RA, Sichieri R. Métodos de avaliação do consumo de alimentos. In: Kac G, Sichieri R, Gigante DP. *Epidemiologia Nutricional*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/Atheneu; 2007. 181-200.

Plummer M, Kaaks R. Commentary: An OPEN assessment of dietary measurement errors. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 1062-1063.

Potischman N, Freudenheim JL. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview. *J Nutr* 2003; 133: 873S-874S.

Potischman N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr* 2003; 133: 875S-880S.

Pufulete M, Emery PW, Nelson M, Sanders AB. Validation of a short food frequency questionnaire to assess folate intake. *Br J Nutr* 2002; 87: 383-390.

Ratnayake WMN. Overview of methods for the determination of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography, silver-ion liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 2004; 87 (2): 523-539.

Shai I, Rosner BA, Shahar DR, Vardi H, Azrad AB, Kanfi A, Schwarzfuchs D, Fraser D. Dietary evaluation and attenuation of relative risk: multiple comparisons between blood and urinary biomarkers, food frequency, and 24-hour recall questionnaires: the DEARR Study. *J Nutr* 2005; 135: 573-579.

Skeaff CM, Gowans S. Home use of margarine is an important determinant of plasma trans fatty acid status: a biomarker study. *Br J Nutr* 2006; 96: 377-383.

Slater B, Phillipi ST, Marchioni DML, Fisberg RM. Validação de questionários de frequência alimentar – QFA: considerações metodológicas. *Rev. bras. epidemiol.* 2003; 6 (3): 200-208.

Smedman AEM, Gustafsson IB, Berglund LGT, Vessby BOH. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 22-29.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. [IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial](#). Arq. Bras. Cardiol. 2004; 82 (Supl IV): 1-14.

Subar AF, Thompson FE, Kipnis V, Midthune D, Hurwitz P, McNutt S, McIntosh A, Rosenfeld S. Comparative validation of the Block, Willett, and National Cancer Institute food frequency questionnaires. *Am J Epidemiol* 2001; 154:1089-1099.

Sullivan B, Williams PG, Meyer BJ. Biomarker validation of a long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid food frequency questionnaire. *Lipids* 2006; 41: 845-850.

Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Hu FB. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 74-81.

USDA – United States Department of Agriculture. Composition of foods raw, processed, prepared in USDA Nutrient database for standard reference. Release 13. Beltsville, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient data laboratory, 1999.

Van't Veer P, Kardinaal AFM, Baush-Goldbohm RA, Kok FJ. Biomarkers for validation. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47 (2): S58-S63.

Vaz JS, Deboni F, Azevedo MJ, Gross JL, Zelmanovitz. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. *Rev Nutr* 2006; 19 (4): 489-500.

Verkleij-Hagoort AC, Vries JHM, Stegers MPG, Lindemans J, Ursem NTC, Steegers-Theunissen RPM. Validation of the assessment of folate and vitamin B12 intake in women of reproductive age: the method of triads. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61: 610-615.

Welch AA, Bingham SA, Ive J, Friesen MD, Wareham NJ, Riboli E, Khaw KT. Dietary fish intake and plasma phospholipid n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations in men and women in the European Prospective Investigation into Cancer – Norfolk United Kingdom cohort. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 1330-1339.

WHO/FAO. Expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, Switzerland, 2002.

WHO/FAO. Technical report series 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Joint FAO/WHO Expert Consultation, World Health Organization, Geneva, 2003.

Willett W, Stampfer MJ. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol* 1986; 124 (1): 17-27.

Willett WC, Lenart E. Reproducibility and validity of food-frequency questionnaires. In: *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998. p.101-147.

Willett WC. Diet and coronary heart disease. In: *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998b. p.414-466.

Willett WC. Food-frequency methods. In: *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998c. p.74-94.

Willett WC. Overview of nutritional epidemiology. In: *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998a. p.3-17.

Willett WC. The Mediterranean diet: science and practice. *Pub Health Nutr* 2005; 9 (1A): 105-110.

Wolk A, Furuheim M, Vessby B. Fatty acid composition of adipose tissue and serum lipids are valid biological markers of dairy fat intake in men. *J Nutr* 2001; 131: 828-833.

Wolk A, Vessby B, Ljung H, Barrefors P. Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 291-295.

Yokota RTC, Vasconcelos TF, Ito MK, Dutra ES, Baiocchi KC, Hamann EM, Lopes EB, Barbosa RB. Prevalência de fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis em duas regiões do Distrito Federal. *Com Ciências da Saúde* 2007; 18 (4): 289-296.

Zock PL, Meninsk RP, Harryvan J, Vries JHM, Katan MB. Fatty acids in serum cholesteryl esters as quantitative biomarkers of dietary intake in humans. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 1114-1122.

7. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: **Estudo de validação e reprodutibilidade de um questionário de frequência alimentar, com enfoque em ácidos graxos dietéticos, para uso em população adulta.**

Convido o Senhor (a): _____
a participar desta pesquisa, que envolve responder questionários de frequência alimentar, recordatórios de 24 horas e coletar uma amostra de sangue para determinação dos níveis de ácidos graxos. O objetivo deste estudo é avaliar a ingestão de gorduras da população através de um questionário sobre alimentos consumidos habitualmente e dosar a quantidade e tipo de gordura no sangue. Caso seja verificado que o senhor (a) necessita de cuidados médicos, será encaminhado para atendimento no posto de saúde mais próximo à sua casa. Foram dadas informações suficientes sobre o estudo e foi garantido que todas as informações colhidas serão mantidas em sigilo absoluto. O senhor (a) foi esclarecido que: Poderá desistir de participar do estudo quando quiser, sem ter que dar explicações ou justificativa.

Assina livremente a confirmação para participar do estudo

_____ Brasília, _____ de
_____ 200 ____

Desejando maiores esclarecimentos com relação à pesquisa, contatar a coordenadora do projeto: Marina Ito: 3307-2548; e Comitê de Ética em pesquisa: tel: 3325-4955.

