

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**  
**ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL E APLICADA À TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO SOBRE O  
PERFIL LIPÍDICO E A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATOS WISTAR SAUDÁVEIS EM  
CRESCIMENTO**

**ADRIANA PRAIS BOTELHO**

**Nutricionista**

**PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA**

**Orientador**

**CAMPINAS – SP**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

B657e Botelho, Adriana Prais  
O efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico e a composição corporal em ratos wistar saudáveis em crescimento/  
Adriana Prais Botelho. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Admar Costa de Oliveira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido linoléico conjugado. 2. Suplementação. 3. Composição corporal. 4. Ratos. 5. Perfil lipídico. I. Oliveira, Admar Costa de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: The effect of conjugated linoleic acid supplementation on lipid profile and body composition of healthy growing Wistar rats.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Conjugated linoleic acid, Supplementation, Body composition, Rats, Lipid profile

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Nutrição experimental e aplicada à tecnologia de alimentos

Banca examinadora: Admar Costa de Oliveira

Célio Kenji Miyasaka

Flávia Queiroga Aranha de Almeida

Semíramis Martins Álvares Domene

Data de defesa: 27/07/2005

**ADRIANA PRAIS BOTELHO**

**Nutricionista**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO SOBRE O  
PERFIL LIPÍDICO E A COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATOS WISTAR SAUDÁVEIS EM  
CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador:

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

**CAMPINAS – SP**

**2005**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira**

**Orientador**

---

**Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka**

**Membro**

---

**Profa. Dra. Flávia Queiroga Aranha de Almeida**

**Membro**

---

**Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene**

**Membro**

Aos meus pais, *Paulo Sérgio e Denise*, pelo amor incondicional e compreensão, e ao meu namorado, *Gabriel*, pelo companheirismo, incentivo constante e respeito.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação e oportunidade de trabalharmos juntos.

À Banca Examinadora, pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio-Pesquisa concedido (Processo nº 03/07648-4).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº 133874/2003-6).

À Pharmanutrients, Gurnee/IL, USA, na pessoa de Susie W. Rockway, pela doação do CLA One® Free Fatty Acid Oil.

À M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda., na pessoa do Prof. Dr. Olavo Rusig, pela doação da mistura vitamínica.

À Dra. Soely Maria Pissini Machado Reis, pela amizade e ajuda constante.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pelos momentos de descontração e apoio técnico, durante a execução dos ensaios biológicos.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, em especial Cidinha, Graça, Fátima, Francisco, Eliana, Carla e Célis, pela ajuda durante todo o trabalho.

Aos funcionários da Coordenaria de Pós-Graduação, em especial ao Cosme, pelos esclarecimentos e ajuda.

Ao Laboratório de Micronutrientes da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, nas pessoas da Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene e da técnica Marlene Maria Torniziello Braz da Silva, pela utilização do liofilizador.

Ao funcionário do Laboratório de Metabolismo da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Aglecio Luiz Souza, pela ajuda na análise de leptina.

Ao arquiteto Francisco Masuda, pelas imagens que puderam ilustrar o trabalho desenvolvido.

Aos amigos do Laboratório de Lípidos, Lilia, Cibelem e Márcio, por todos os momentos especiais compartilhados.

Aos amigos Cláudia, Mônica, Giovana, Luciano, Caroline, Aline e Paulo Sérgio, pela companhia e amizade durante estes anos.

Ao meu irmão, Marcos, pelo otimismo e alegria contagiantes.

Aos meus familiares, Wilma, Carlos, Myria e Maria Stella pela força e conselhos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução de mais esta etapa da minha vida.

"Uma longa viagem começa com um único passo".

*(Lao-Tsé)*



## RESUMO

O ácido linoléico conjugado (CLA), um conjunto de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas, ocorre em pequenas quantidades em uma grande variedade de alimentos. O CLA pode ser originado no rúmen por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta e também, pela dessaturação do ácido graxo C18:1 trans-11. Dessa maneira, concentrações significativas de CLA podem ser encontradas nas carnes, no leite e seus produtos derivados. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico e a composição corporal de ratos Wistar saudáveis em crescimento. Foram realizados dois ensaios biológicos: um em que variou a quantidade de CLA suplementada, e outro em que variaram as misturas comerciais de CLA utilizadas. Para o primeiro ensaio biológico, foram utilizados 40 ratos albinos, machos, recém-desmamados, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos com 10 animais cada, de acordo com a quantidade de suplemento administrada. Os animais foram suplementados diariamente durante 21 dias com AdvantEdge® CLA (EAS™) nas concentrações 1, 2 e 4 % sobre o consumo diário de dieta, constituindo respectivamente os grupos AE1, AE2 e AE4, e com ácido linoléico na concentração de 2 % sobre o consumo diário de dieta, constituindo o grupo controle (C). Com este ensaio procurava-se identificar qual a quantidade de suplemento mais adequada para reduzir a gordura corporal dos ratos. Para o segundo ensaio biológico, foram utilizados 30 ratos albinos, machos, recém-desmamados, da linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em 3 grupos com 10 animais cada, de acordo com a marca de suplemento administrada. Utilizando-se a quantidade de suplemento identificada no primeiro ensaio, os animais receberam diariamente, durante 42 dias, as misturas comerciais AdvantEdge® CLA (EAS™) e CLA One® (Pharmanutrients), constituindo os grupos AE e CO, respectivamente, e ácido linoléico, constituindo o grupo controle (C), na concentração de 2 % sobre o consumo diário de dieta. Durante os dois

períodos experimentais os animais tiveram o peso e consumo de dieta monitorados a cada dois dias. Ao final de cada experimento, os animais foram mortos por deslocamento cervical sob anestesia (pentobarbital sódico – 46 mg/kg), sendo o sangue utilizado para as determinações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e leptina e a carcaça empregada para a determinação da composição corporal centesimal. Para esta avaliação, foi removido todo o conteúdo intestinal para obtenção da carcaça vazia. Em seguida a carcaça foi congelada em nitrogênio líquido, fatiada, liofilizada, moída e armazenada a - 80 °C até o momento das determinações de umidade, cinzas, proteína bruta e gordura. A eficiência alimentar dos ratos não foi alterada com a suplementação de CLA em ambos os ensaios biológicos. Com relação aos valores séricos de triacilgliceróis, estes não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) após a suplementação com CLA. Quanto aos teores de colesterol total no primeiro ensaio, estes demonstraram uma redução dose dependente após 21 dias de tratamento, tomando-se em conta as suplementações. No entanto, no segundo ensaio biológico, aos 42 dias de tratamento, a administração de CLA aumentou os teores de colesterol total dos animais. No tocante à composição corporal, constatou-se uma redução média de 18,0 % dos teores de gordura corporal dos grupos AE2 (11,2 %) e AE4 (11,6 %), quando comparados ao teor do grupo controle (13,9 %). A mesma redução foi observada no segundo ensaio biológico nos grupos AE e CO, em relação ao controle (18,1 %, 16,7 % e 21,2 %, respectivamente). Após 42 dias de suplementação com CLA, os animais dos grupos AE e CO, no segundo ensaio biológico, obtiveram aumento de 7,5 % nos teores de cinzas e diminuição de 22,4 % da concentração sérica de leptina. Tendo em vista os resultados encontrados, pôde-se concluir que a suplementação com ácido linoléico conjugado na concentração de 2 % sobre o consumo médio diário de dieta reduziu a gordura corporal e aumentou os teores de cinzas em ratos.

## ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA), a group of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds, occurs in small quantities in a wide variety of foods. CLA can originate in the rumen by biohydrogenation of fatty acids from ingested food, and by the desaturation of the trans-11 C18:1 fatty acid. Thus, significant concentrations of CLA are found in beef, milk and dairy products. The purpose of this study was to assess the effect of conjugated linoleic acid supplementation on lipid profile and body composition of healthy growing Wistar rats. Two biological assays were performed: one varying CLA supplement concentration in the diet, and another varying the commercial brands of CLA used. For the first assay, 40 albino male, weaning rats were distributed at random in 4 groups of 10 animals each, according to the amount of supplement to be administered. Animals in groups AE1, AE2 and AE4 were supplemented daily for 21 days with the commercial product AdvantEdge® CLA (EAS™) at 1, 2 and 4 % of food intake respectively, and those in group C (control) with linoleic acid at 2% of food intake. The aim of this first assay was to find the optimum amount of supplement for the purpose of body fat reduction. In the second assay, 30 albino male, weaning Wistar rats were distributed at random in 3 groups of 10 animals each, according to the brand of supplement. Animals were supplemented daily for 42 days at a concentration of 2 %, chosen on the basis of results in the previous assay. Group AE received AdvantEdge® CLA (EAS™); group CO was fed CLA One® (Pharmanutrients); and group C (control) was given linoleic acid at 2 % of food intake. Throughout the experimental period animals had their weight and food intake controlled every 2 days. At the end of each experiment, the animals were killed by cervical displacement under anesthesia (sodium pentobarbital – 46 mg/kg). The blood was used for the determinations of serum triacylglycerols, total cholesterol and leptin; and the carcass was used for determining body composition. Gut contents were removed to obtain empty carcass weight. The carcass was then frozen in liquid nitrogen, chopped, dried, ground and stored at - 80 °C until determinations

of water, ash, protein and fat were performed. Feeding efficiency of the rats was not altered by CLA supplementation in either of the assays. No significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed in the serum levels of triacylglycerols after supplementation with CLA. Total cholesterol values, as measured in the first assay after 21 days of treatment, presented a dose-dependent reduction. In the second assay, however, CLA supplementation was found to increase total cholesterol after 42 days. An average reduction of 18.0 % on body fat percentage was found in groups AE2 (11.2 %) and AE4 (11.6 %), compared to the control (13.9 %). Body fat percentage was also reduced by 18.0 % in the second assay in groups AE and CO, compared to the control (18.1 %, 16.7 % e 21.2 %, respectively). After 42 days of CLA supplementation, animals in groups AE and CO, in the second assay, displayed an increase of 7.5 % in ash content and a decrease of 22.4 % in the serum leptin concentration. Considering the results obtained it can be concluded that the conjugated linoleic acid supplementation at a concentration of 2 % of food intake reduced the body fat and increased the ash content of rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos isômeros do CLA trans-10, cis-12; cis-9, trans-11 e do ácido linoléico (cis-9, cis-12). Adaptado de Pariza, Park e Cook (2001).....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema metabólico proposto para biossíntese de cis-9, trans-11 C18:2. Adaptado de Chouirnad, Bauman e Baumgard (1999).....	9
<b>Figura 3.</b> Possíveis mecanismos de ação do ácido linoléico conjugado sobre a alteração da composição corporal. Adaptado de Wang e Jones (2004). ....	36
<b>Figura 4.</b> Gaiolas individuais de crescimento de acordo com as condições experimentais/Laboratório de Ensaios Biológicos do Departamento de Alimentos e Nutrição da UNICAMP. ....	44
<b>Figura 5.</b> Entubação orogástrica utilizando seringas descartáveis de 1 mL e agulhas de gavagem.....	45
<b>Figura 6.</b> Esquema do delineamento experimental do primeiro ensaio biológico.....	47
<b>Figura 7.</b> Esquema do delineamento experimental do segundo ensaio biológico. ....	49
<b>Figura 8.</b> Amostra homogeneizada do rato utilizada para as determinações analíticas. ....	51
<b>Figura 9.</b> Peso corporal e consumo de dieta em gramas dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no primeiro ensaio biológico (21 dias).....	63
<b>Figura 10.</b> Composição corporal centesimal em base úmida dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no primeiro ensaio biológico (21 dias).....	65
<b>Figura 11.</b> Correlação entre a redução da gordura corporal (%) e o consumo do isômero trans-10, cis-12 (mg) dos ratos dos grupos controle e experimentais (n = 40) no primeiro ensaio biológico (21 dias).....	66
<b>Figura 12.</b> Peso corporal e consumo de dieta em gramas dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no segundo ensaio biológico (42 dias). ....	68

<b>Figura 13.</b> Composição corporal centesimal em base úmida dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no segundo ensaio biológico (42 dias). .....	70
<b>Figura 14.</b> Correlação entre a redução da gordura corporal (%) e o consumo do isômero trans-10, cis-12 (mg) dos ratos dos grupos controle e experimentais (n = 30) no segundo ensaio biológico (42 dias). .....	71
<b>Figura 15.</b> Correlação entre o aumento da gordura corporal (%) e a concentração sérica de leptina (ng/mL) dos ratos dos grupos controle e experimentais (n = 30) no segundo ensaio biológico (42 dias). .....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores médios de CLA e porcentagem do isômero cis-9, trans-11 em alguns alimentos. ....	13
<b>Tabela 2.</b> Composição da dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). ....	40
<b>Tabela 3.</b> Mistura mineral AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). ....	41
<b>Tabela 4.</b> Mistura vitamínica AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). ....	42
<b>Tabela 5.</b> Composição centesimal (g/100g) e valor energético (kcal/100g) das dietas experimentais AIN-93G. ....	59
<b>Tabela 6.</b> Composição dos ácidos graxos (g/100 g) do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado. ....	61
<b>Tabela 7.</b> Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) do consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos controle e experimentais no primeiro ensaio biológico (21 dias). ....	62
<b>Tabela 8.</b> Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) dos triacilgliceróis e colesterol total séricos dos grupos controle e experimentais no primeiro ensaio biológico (21 dias). ....	64
<b>Tabela 9.</b> Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) do consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos controle e experimentais no segundo ensaio biológico (42 dias). ....	67
<b>Tabela 10.</b> Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) dos triacilgliceróis e colesterol total séricos dos grupos controle e experimentais no segundo ensaio biológico (42 dias). ....	69
<b>Tabela 11.</b> Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) de leptina sérica dos grupos controle e experimentais no segundo ensaio biológico (42 dias). ....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC – Acetil CoA carboxilase

ACO – Acil CoA oxidase

C/EBP $\alpha$  – Enhancer-binding protein

CLA – Conjugated linoleic acid/Ácido linoléico conjugado

CPT – Carnitina palmitoil transferase

ESPAS – N-etil n-sulfopropil n-anisidina

FABP – Fatty acid-binding protein/Proteínas ligadoras de ácidos graxos

FAS – Fatty acid sintase/Ácido graxo sintase

GLUT4 – Transportador de glucose dependente de insulina

HDL – High density lipoprotein/Lipoproteína de alta densidade

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LDL – Low density lipoprotein/Lipoproteína de baixa densidade

LPL – Lípase lipoprotéica

OLETF – Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>

PPAR $\gamma$  - Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ /Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$

SCD – Stearoil - CoA desaturase/Estearoil – C $\omega$ a dessaturase

SREBP-1 – Sterol regulatory element binding protein-1

TNF – Tumor necrose factor/Fator de necrose tumoral

UCP – Uncoupling proteins



VLDL – Very low-density lipoprotein/Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4 RESULTADOS .....	58
5 DISCUSSÃO .....	73
6 CONCLUSÕES .....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
8 ANEXOS .....	107

## ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1 Descoberta do ácido linoléico conjugado.....	6
2.2 Caracterização da molécula de CLA .....	6
2.3 Síntese do CLA .....	8
2.4 Fontes alimentares e consumo humano de CLA .....	12
2.5 Efeitos fisiológicos do CLA .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Animais para experimentação .....	39
3.2 Dietas experimentais .....	39
3.3 Suplementos .....	42
3.4 Ensaio biológico.....	43
3.5 Métodos analíticos .....	51
3.6 Análise estatística .....	56
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Composição centesimal das dietas experimentais .....	59
4.2 Caracterização dos perfis de ácidos graxos do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado.....	60
4.3 Primeiro ensaio biológico .....	62
4.4 Segundo ensaio biológico .....	66
5 DISCUSSÃO .....	73
5.1 Composição centesimal das dietas experimentais .....	74
5.2 Caracterização dos perfis de ácidos graxos do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado.....	74
5.3 Consumo de dieta e ganho de peso dos animais .....	75
5.4 Perfil lipídico sérico .....	76
5.5 Composição corporal centesimal.....	77
5.6 Concentração de leptina sérica .....	80
6 CONCLUSÕES .....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
8 ANEXOS .....	107





## **1 INTRODUÇÃO**

O ácido linoléico conjugado (CLA), corresponde a um grupo de isômeros de posição e geométricos do ácido octadecadienóico (C18:2) com duplas ligações conjugadas; está presente em pequenas quantidades em uma grande variedade de alimentos e estima-se a existência de 56 possíveis isômeros. Embora possam existir diversos isômeros, dois destes, o cis-9, trans-11 e o trans-10, cis-12 têm despertado grande interesse em função dos seus efeitos fisiológicos já identificados (CHOIRNAD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999; YURAWECZ *et al.*, 1999).

O CLA pode ser originado de forma endógena no rúmen, por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta e também, pela dessaturação do ácido graxo C18:1 trans-11. Na biohidrogenação, o isômero cis-9, trans-11 é o primeiro intermediário formado a partir do ácido linoléico pela  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{11}$  trans-isomerase. Em seguida, ocorrem reduções das ligações cis, até C18:1 trans-11, que podem ainda ser reduzidas até C18:0 (CHOIRNAD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999). Na outra via de produção do CLA o ácido graxo C18:1 trans-11 sofre dessaturação pela enzima  $\Delta^9$  dessaturase presente na glândula mamária e no tecido adiposo (CORL; BAUMGARD; PARIZA, 2000). Sendo assim concentrações significativas de CLA podem ser encontradas nas carnes, no leite e seus produtos derivados (IP; BELURY; LAMMI-KEEFE, 2003; PARODI, 1977).

O interesse pelo ácido linoléico conjugado (CLA), iniciou-se em 1979 quando um grupo de pesquisadores descobriu substâncias antimutagênicas e anticarcinogênicas, dentre as quais o CLA, em carnes grelhadas (PARIZA; HARGRAVES, 1985; PARIZA *et al.*, 1979). Posteriormente, inúmeros trabalhos demonstraram outros efeitos benéficos relacionados à saúde com a utilização do CLA. Estes efeitos incluem: modulação do sistema imune, potencialização da mineralização óssea, prevenção e tratamento do diabetes mellitus não

insulino dependente, redução da aterosclerose e alterações na composição corporal (BAWA, 2003; CHOUIRNAD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999).

A ação da suplementação com CLA contra a carcinogênese foi constatada em inúmeros tecidos como o estomacal (HA; STORKSON; PARIZA, 1990), o intestinal (LIEW *et al.*, 1995) e o cutâneo (BELURY *et al.*, 1996), no entanto, os tumores mamários parecem ser particularmente sensíveis à esta intervenção (IP *et al.*, 1991). Os mecanismos pelos quais o CLA atua contra a carcinogênese, ainda não estão completamente elucidados. Acredita-se que ele atue como um antioxidante ou competindo com o ácido linoléico (BAWA, 2003; McGUIRE; McGUIRE, 1999). O efeito do CLA na prevenção e tratamento do diabetes mellitus, parece estar associado à dose, ao isômero, à espécie, ao sexo e principalmente à existência prévia de obesidade e da sensibilidade à insulina (HARGRAVE *et al.*, 2003). A ação antiaterogênica da suplementação com CLA, pode ser parcialmente explicada pelo declínio da produção de colesterol, assim como de sua secreção pelo fígado (SAKONO *et al.*, 1999), pela redução da síntese de triacilgliceróis, associada ao aumento de sua oxidação e maior ativação do PPAR $\gamma$  (TOOMEY *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2001) e também pela inibição da produção de tromboxano e conseqüente diminuição da agregação plaquetária (STANGL, 2000; TRUITT; McNEILL; VADERHOEK, 1999). Um dos efeitos mais estudados com relação à suplementação com CLA é sua capacidade em alterar a composição corporal, promovendo aumento da massa magra e redução da massa gorda em diferentes espécies, tais como, camundongos, hamsters, ratos, porcos e humanos (WANG; JONES, 2004; SISK *et al.*, 2001; DECKERE *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1997). Existem várias hipóteses sugeridas para explicar esta alteração na composição corporal, como a diminuição da proliferação e diferenciação de pré-adipócitos, diminuição da síntese de triacilgliceróis, aumento da lipólise, alteração da atividade das enzimas carnitina palmitoiltransferase e lípase lipoprotéica e da concentração do hormônio leptina, entre outros (WANG; JONES, 2004).



Atualmente, a discussão a respeito da suplementação com CLA tem sido acirrada frente aos resultados encontrados por muitos grupos de pesquisa nos últimos anos (BAWA, 2003; BELURY, 2002; McGUIRE; McGUIRE, 1999). Embora os efeitos fisiológicos do CLA tenham sido amplamente estudados, seus mecanismos de ação ainda são controversos e parecem ser dependentes da espécie animal, dose e duração do experimento. Dessa maneira, torna-se clara a necessidade de novas investigações (EVANS; BROWN; McINTOSH, 2002).

Com o objetivo geral de verificar os efeitos da suplementação com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico e a composição corporal em ratos Wistar machos saudáveis em crescimento, foram enfocados neste trabalho, os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Caracterizar os ácidos graxos dos suplementos de ácido linoléico e de ácido linoléico conjugado, deste particularmente quanto à concentração dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12;
- ❖ Monitorar o ganho de peso e consumo de dieta dos ratos durante o experimento para observação do crescimento;
- ❖ Determinar do perfil lipídico em termos de triacilgliceróis e colesterol total séricos;
- ❖ Determinar da composição corporal centesimal dos ratos;
- ❖ Determinar da concentração de leptina sérica.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Descoberta do ácido linoléico conjugado

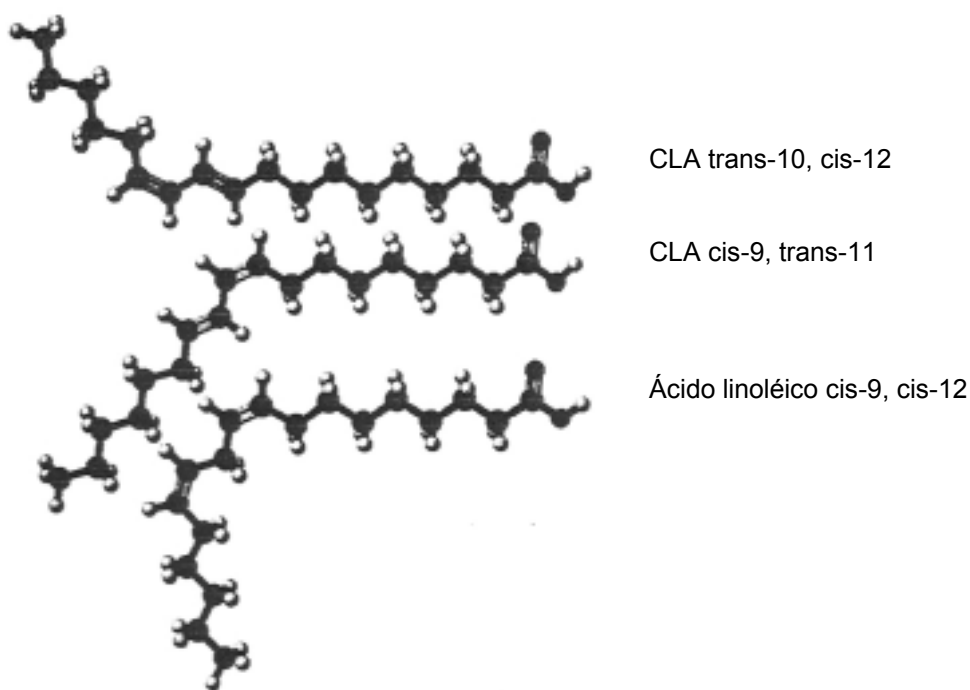
No final da década de 70, Pariza e colaboradores, buscavam identificar componentes indutores da carcinogênese em carnes grelhadas (PARIZA *et al.*, 1979). Alguns anos depois, estes mesmos pesquisadores observaram a presença de compostos com atividade antimutagênica em extratos de carnes e estes, diferentemente dos fatores mutagênicos, que são formados durante o cozimento, estavam presentes independentemente do processo de cocção (PARIZA *et al.*, 1983).

Em 1985, Pariza e Hargraves, demonstraram que estes componentes presentes no extrato de carne bovina, eram capazes de inibir a progressão do tumor em células epiteliais de camundongos. Apenas em 1987, Há, Grimm e Pariza, utilizando técnicas de espectrofotometria e cromatografia, conseguiram isolar e caracterizar estes componentes antimutagênicos desconhecidos da fração lipídica da carne. Neste trabalho, os autores descobriram a existência de quatro isômeros derivados do ácido linoléico, sendo que cada um deles continha um sistema de dupla ligação conjugada, e portanto foram nomeados ácidos linoléico conjugados (CLAs). Desde então, diversos estudos confirmaram a atividade anticarcinogênica do CLA, o que levou a “National Academy of Sciences”, a considerá-los como os únicos ácidos graxos capazes de inibir a carcinogênese em animais experimentais (McGUIRE; McGUIRE, 1999).

## 2.2 Caracterização da molécula de CLA

O ácido linoléico conjugado (CLA), corresponde a uma mistura de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas, ou seja, separadas somente por uma ligação simples carbono-carbono (CHOUINARD; BAUMAN; BAUMGARD,

1999) (Figura 1). Este composto é encontrado em pequenas quantidades em uma grande variedade de alimentos e estima-se a existência de 56 possíveis isômeros (YURAWEZ *et al.*, 1999). Dentre estes isômeros, dois já possuem sua atividade identificada: o isômero cis-9, trans-11 é um potente anticarcinogênico natural (IP *et al.*, 1991; PARIZA; HA, 1990), enquanto que o trans-10, cis-12 é um efetivo agente repartidor de nutrientes (PARK *et al.*, 1997). Muitos estudos, utilizando-se de diferentes modelos experimentais, relacionam o CLA a outros efeitos positivos que favoreceriam a saúde humana, entre eles, redução da aterosclerose, prevenção e tratamento do diabetes mellitus não insulino dependente, modulação do sistema imune e potencialização da mineralização óssea (SEBEDIO; GNAEDIG; CHARDIGNY, 1999).



**Figura 1.** Estrutura dos isômeros do CLA trans-10, cis-12; cis-9, trans-11 e do ácido linoléico (cis-9, cis-12). Adaptado de Pariza, Park e Cook (2001).

## 2.3 Síntese do CLA

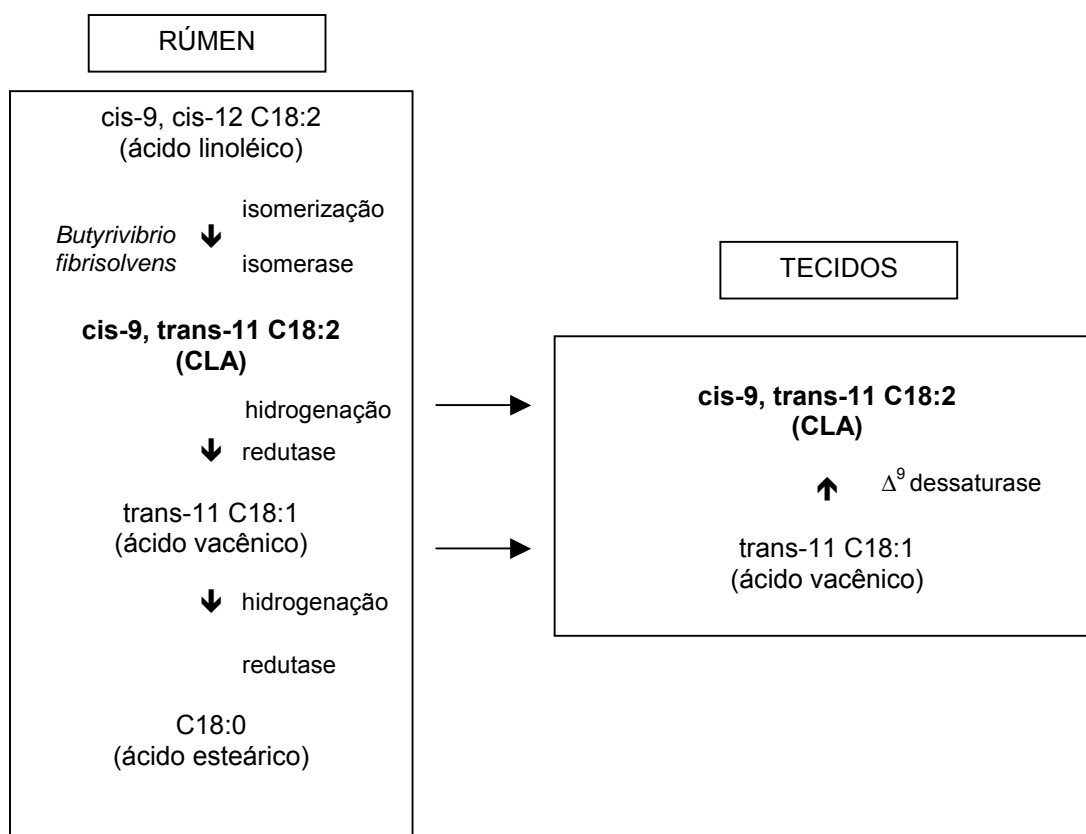
### 2.3.1 Síntese biológica

O CLA pode ser originado de forma endógena no rúmen, por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta e também, pela dessaturação do ácido graxo C18:1 trans-11, por ação de uma enzima presente na glândula mamária e no tecido adiposo chamada  $\Delta^9$  dessaturase ou estearoil - CoA dessaturase (SCD) (CORL *et al.*, 2001).

#### 2.3.1.1 Biohidrogenação

Em ruminantes, durante o processo de biohidrogenação do ácido linoléico, o isômero cis-9, trans-11 C18:2 é o primeiro intermediário formado pelas bactérias ruminais (Figura 2). Dentre as bactérias existentes a *Butyrivibrio fibrosolvens* é a mais conhecida (MARTIN; JENKINS, 2002; KEPLER *et al.*, 1966), porém várias outras espécies possuem lipases capazes de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos, e portanto produzir CLA, entre elas estão a *Lactobacillus casei* e a *Lactobacillus acidophilus* (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003). A isomerização inicial é catalisada pela  $\Delta^{12}$  cis,  $\Delta^{11}$  trans-isomerase que com maior frequência é proveniente da bactéria ruminal é *Butyrivibrio fibrosolvens*. Nesta etapa, a dupla ligação cis do carbono 12 do ácido linoléico é transferida para o carbono 11, assumindo a configuração trans e originando o cis-9, trans-11 C18:2. Em seguida ocorre a saturação da dupla ligação cis-9 pela ação de uma redutase, formando o ácido vacênico (C18:1 trans-11), sendo este encontrado em maior quantidade na gordura do leite de ruminantes (MARTIN; JENKINS, 2002).

Seqüencialmente, ocorre uma nova redução, resultando na formação do ácido esteárico (C18:0) (CHOUINARD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999).



**Figura 2.** Esquema metabólico proposto para biossíntese de cis-9, trans-11 C18:2. Adaptado de Chouirnad, Bauman e Baumgard (1999).

Normalmente a biohidrogenação acontece de forma completa, porém alguns produtos intermediários como o cis-9, trans-11 C18:2, podem atravessar o rúmen, moverem-se pela corrente sanguínea, serem absorvidos pela glândula mamária e incorporados na gordura do leite (GRIINARI *et al.*, 2000). Existem diversos fatores que podem influenciar a biohidrogenação no rúmen, e dessa maneira, alterar a quantidade e a composição dos ácidos graxos insaturados disponíveis para a deposição no tecido adiposo ou para secreção na gordura do leite. As condições de alimentação, assim como, o tipo e a concentração dos ácidos

graxos presentes, determinam quais bactérias ruminais serão predominantes no rúmen e, conseqüentemente o pH, que para favorecer a produção de CLA, deve ser superior a 6,0 (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003; MARTIN; JENKINS, 2002).

Em monogástricos, o CLA também pode ser produzido pelos microorganismos do intestino. Ratos convencionais, mas não ratos “germ free”, podem produzir CLA, utilizando o ácido linoléico como substrato para as bactérias intestinais. No entanto, este CLA produzido parece não ser absorvido (CHIN *et al.*, 1994).

### **2.3.1.2 Síntese via $\Delta^9$ dessaturase**

Nesta via o ácido graxo C18:1 sofre dessaturação pela enzima  $\Delta^9$  dessaturase presente na glândula mamária e no tecido adiposo. Para sustentar a hipótese de que o C18:1 trans-11 produzido no rúmen, poderia ser convertido em CLA na glândula mamária pela ação da  $\Delta^9$  dessaturase, Griinari e outros (2000) infundiram uma mistura de C18:1 trans-11 e C18:1 trans-12 (50 % - 50 %), no abomaso de vacas em lactação. Estes autores observaram aumento de 31 % no conteúdo de CLA cis-9, trans-11 secretado na gordura do leite, indicando que os animais foram capazes de sintetizar CLA de forma endógena. Com o objetivo de verificar qual era a importância da síntese endógena de CLA via  $\Delta^9$  dessaturase, foi realizado um segundo experimento em que foi infundido óleo de esterculina, um potente inibidor da  $\Delta^9$  dessaturase, no abomaso de vacas. Foi encontrada uma redução de 45 % na concentração da gordura do leite e de outros produtos da ação da  $\Delta^9$  dessaturase, os quais foram apontados por um aumento de duas a três vezes na relação da proporção dos ácidos graxos 14:0/14:1, 16:0/16:1 e 18:0/18:1. Utilizando-se da mudança na proporção 14:0/14:1 como um indicativo da extensão da inibição da  $\Delta^9$  dessaturase, os autores estimaram que 64 % do CLA na gordura do leite de ruminantes

foi produzido de forma endógena, sugerindo esta via como responsável pela maior parte do CLA no leite (GRIINARI *et al.*, 2000).

Contribuindo com estes resultados, Corl e colaboradores (2001), demonstraram uma redução expressiva de 60-65 % no CLA cis-9, trans-11 quando vacas receberam uma dieta suplementada com óleo de esterculina. Também foram observadas reduções de 84 %, 59 % e 46 % para o C14:1 cis-9, C16:1 cis-9 e C18:1cis-9, respectivamente. Da mesma maneira, Kay e outros (2002) suplementaram vacas que estavam sob regime de pastejo com óleo de esterculina com o objetivo de analisar a contribuição desta via na formação do CLA. De acordo com as condições a que estes animais foram submetidos, os pesquisadores estimaram que cerca de 87 a 100 % do CLA cis-9, trans-11, presente na gordura do leite, tinham origem via  $\Delta^9$  dessaturase.

### 2.3.2 Síntese química

O CLA também pode ser sintetizado quimicamente a partir do ácido linoléico (C18:2), originando produtos com diferentes composições dos seus isômeros. Este processo pode variar em decorrência da fonte de ácido linoléico utilizada, assim como das condições de isomerização (PARK *et al.*, 2000; CHOUINARD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999). Como exemplos, podemos citar a desidratação do óleo de rícino com a utilização de álcalis fortes à altas pressões e o óleo de cártamo com soluções concentradas de hidróxido de potássio em propileno glicol (MEDEIROS, 2002).



## 2.4 Fontes alimentares e consumo humano de CLA

Pelo fato do CLA ser originado por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais e também via  $\Delta^9$  dessaturase na glândula mamária e no tecido adiposo, os alimentos derivados de ruminantes, particularmente os produtos lácteos, são as maiores fontes de CLA (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003).

Dentre os isômeros de CLA, o cis-9, trans-11 ocorre em maiores concentrações nos alimentos. Isto pode ser explicado pelo fato de que nos ruminantes, as dessaturações ocorrem até o carbono 9, não podendo ocorrer além deste, devido à ausência das dessaturases  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$ , presente somente nos vegetais. Isto torna-se ainda mais importante, ao lembrarmos que a síntese endógena, dependente da ação da  $\Delta^9$  dessaturase, é a principal via de formação do CLA (PARIZA; PARK; COOK, 2001). Também vale ressaltar, que assim como todos os ácidos graxos poliinsaturados, o CLA tende a ser menos direcionado para tecidos de depósito e mais para fosfolípidos de membranas (CHRISTIE, 1982). No caso dos isômeros de CLA, o cis-9, trans-11 é menos metabolizado e, conseqüentemente, mais presente nos alimentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios de CLA e porcentagem do isômero cis-9, trans-11 em alguns alimentos.

<b>Alimento</b>	<b>Total de CLA (mg/g de gordura)</b>	<b>Isômero cis-9, trans-11 (%)</b>
Leite	5,5	92
Manteiga	4,7	88
logurte	4,8	84
Queijo mussarela	4,9	95
Queijo cottage	4,5	83
Carne bovina	4,3	85
Carne ovina	5,6	92
Carne suína	0,6	82
Carne de frango	0,9	84
Carne de peixe	0,3	Nd
Óleo de girassol	0,4	38

nd: não detectado

Fonte: Chin e outros (1992).

Embora pequenas concentrações de CLA possam ser encontradas nos tecidos humanos, a origem deste composto ainda não está elucidada. Acredita-se que a síntese possa ocorrer a partir do ácido linoléico por meio da captura de hidrogênio por uma espécie reativa originando um dieno conjugado, porém a hipótese mais aceita, é que a presença de CLA no organismo humano estaria relacionada ao consumo de alimentos fontes (VAN DEN BERG; COOK; TRIBBLE, 1995). Dessa maneira, alguns estudos têm sido realizados a fim de estimar o consumo de CLA pela população (RITZENTHALER *et al.*, 2001; JIANG; WOLK; VESSBY, 1999; FRITSCHÉ; STEINHART, 1998). Um total de 51 homens e 51 mulheres foram acompanhados durante um ano e suas ingestões alimentares medidas por meio de pesagem direta dos alimentos. O conteúdo de CLA presente nos alimentos foi avaliado por cromatografia gasosa. Os resultados foram expressos em consumo de CLA total (cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12) e consumo apenas do isômero cis-9, trans-11. Os valores obtidos foram de 212 e 151 mg/dia de CLA total e 193 e 140 mg/dia de cis-9, trans-11 para homens e mulheres, respectivamente

(RITZENTHALER *et al.*, 2001). Fritsche e Steinhart (1998), utilizando-se de uma pesquisa de consumo nacional estimaram um consumo de 430 e 350 mg de cis-9, trans-11/dia para homens e mulheres, respectivamente, na Alemanha. Em uma pesquisa realizada com idosos suecos estimou-se que o consumo de CLA era de 160 mg/dia (JIANG; WOLK; VESSBY, 1999). Baseado na atitude de compra de consumidores canadenses, estimou-se que o consumo de CLA foi de 332 e 295 mg/dia para homens e mulheres, respectivamente (US NATIONAL ACADEMY..., 2002). Considerando os valores encontrados nestes estudos, verifica-se que o consumo de CLA está distante da ingestão de 500 a 1000 mg/dia sugerida pelos pesquisadores para que se observe efeito benéfico (STANTON *et al.*, 1997). Esta constatação pode ser parcialmente explicada devido ao cenário do mercado consumidor atual. Nos dias de hoje, existe uma crescente demanda por produtos isentos de gordura, principalmente a saturada. Este conceito reflete a preocupação com doenças como, a aterosclerose, obesidade e também pela busca por um modelo ideal. Isto fez com que houvesse uma redução na procura por produtos que contenham gordura de origem animal e, conseqüentemente um aumento no consumo de gordura insaturada, como a vegetal. Paralelamente, os efeitos benéficos à saúde proporcionados pelo CLA, despertaram o interesse dos pesquisadores, para o consumo de gordura proveniente de carnes e de produtos lácteos, o que fez com que a indústria alimentícia passasse a enxergar estes alimentos como um importante seguimento a ser explorado (STANTON *et al.*, 1997).

Buscando aumentar o teor de CLA nos alimentos por meio da manipulação dietética, diversos estudos têm sido realizados (LOCK; GARNSWORTHY, 2001; DHIMAN *et al.*, 1999). Comparando diferentes condições de alimentação, Dhiman e colaboradores (1999) observaram que animais nutridos exclusivamente com pastejo podem atingir valores de CLA na carne superiores daqueles que consumiram forragem e concentrados. Este mesmo efeito foi observado durante as estações em que os animais são alimentados exclusivamente em regime

de pastejo, como verão e primavera (LOCK; GARNSWORTHY, 2001). Utilizando-se da adição de diferentes ácidos graxos da dieta, Kelly e outros (1998), compararam a gordura do leite de animais alimentados com dietas feitas com óleos ricos em ácido graxo oléico, linolênico e linoléico e obtiveram valores no conteúdo de CLA de 13,3; 16,7 e 19,1 mg/g de gordura, respectivamente. Mais recentemente, Palmquest e Griinari (2001), conseguiram potencializar a conversão do ácido linoléico em CLA em vacas durante a lactação, com uma combinação de óleo de girassol e óleo de peixe. Quando estes animais foram suplementados com 1 % de CLA na dieta, foi encontrado um aumento de 4 mg/g de gordura para 7 mg/g de gordura no teor de CLA, e um aumento ainda mais expressivo (13 mg/g de gordura) quando os mesmos foram suplementados com 1 % de CLA mais 4 % de óleo de soja (HUANG *et al.*, 2001).

Além da manipulação dietética, outros fatores como extrusão, tostagem e micronização, bem como a temperatura da pasteurização e armazenamento são importantes determinantes dos teores de CLA nos alimentos (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003).

## **2.5 Efeitos fisiológicos do CLA**

### **2.5.1 Efeitos do CLA na carcinogênese**

Inúmeros trabalhos demonstraram evidências incontestáveis do efeito anticarcinogênico do CLA em modelos experimentais (IP *et al.*, 1999a; IP, SCIMECA; THOMPSON, 1995; IP *et al.*, 1994). Embora a ação do CLA contra a carcinogênese tenha sido observada em diversos tecidos como o estomacal (HA; STORKSON; PARIZA, 1990), o intestinal (LIEW *et al.*, 1995) e o cutâneo (BELURY *et al.*, 1996), os tumores da glândula mamária parecem ser particularmente sensíveis à intervenção do CLA. Ip e colaboradores

(1991), demonstraram que ratas ingerindo 10 mg de 7,12 dimetilbenzo-antraceno (substância indutora da carcinogênese) tiveram uma inibição de 32, 56 e 60 % no aparecimento do tumor mamário quando ingeriram 0,5; 1,0 e 1,5 %, respectivamente de CLA na dieta. Esta suplementação com CLA foi iniciada duas semanas antes da administração do agente carcinogênico e continuou até o final do experimento. Neste trabalho verificou-se que embora as ratas tivessem recebido uma mistura de isômeros de CLA, grande parte do cis-9, trans-11 foi incorporado à fração fosfolipídica da membrana, sugerindo que este isômero fosse o responsável pela inibição da carcinogênese.

Posteriormente Ip e outros (1994), alimentaram ratas com quantidades crescentes de CLA (0,05; 0,1; 0,25 ou 0,5 %) durante duas semanas antes da administração de 5 mg de 7,12 dimetilbenzo-antraceno. Após 36 semanas de suplementação, foi observada uma redução dose dependente da incidência e do tamanho do tumor mamário, confirmando a atividade biológica benéfica do CLA no tratamento da carcinogênese. Quando ratas foram suplementadas continuamente com 1 % de CLA na dieta, no período pós desmame até a puberdade, o que corresponde ao período de desenvolvimento da glândula mamária, foi observada uma inibição do câncer de mama. Este efeito foi mantido quando as fêmeas continuaram ininterruptamente recebendo CLA após a administração do agente indutor de tumores (IP; SCIMECA; THOMPSON, 1995). Neste mesmo sentido, Ip e outros (1997) demonstraram que animais que receberam CLA juntamente com leves doses de 7,12 dimetilbenzo-antraceno durante 20 semanas, apresentaram uma redução de 70 % no número total de tumores. Neste experimento, o CLA foi incorporado predominantemente em lípides neutros e após o término da suplementação os teores de CLA retornaram ao seu valor basal. Isto explicaria a necessidade de um suprimento contínuo de CLA para manter a inibição da progressão do tumor.

O consumo de altas quantidades de lípidos, especialmente de ácido linoléico, está associado ao aumento de tumores mamários em ratos (WELSCH, 1992). Para investigar a

relação entre a quantidade de gordura consumida e a eficácia do CLA na proteção do câncer, Ip e outros (1996) suplementaram por 23 semanas, ratas com 10; 13,3; 16,7 e 20 % de uma mistura de óleos vegetais acrescida ou não de 1 % de CLA. Estes animais receberam uma única dose de 7,5 mg de 7,12 dimetilbenzo-antraceno no início do experimento. Ao final, os grupos que não receberam CLA tiveram um aumento de 40 % no número de tumores formados, enquanto que os grupos que receberam 10; 13,3; 16,7 e 20 % da mistura de óleos vegetais acrescida de CLA apresentaram uma redução de 56, 46, 51 e 50 %, respectivamente. Estes resultados sugerem que o efeito preventivo do CLA independe da quantidade e da qualidade da gordura na dieta.

Para verificar se a manteiga produzida com a gordura do leite de vacas enriquecida com CLA, possuía a mesma atividade biológica da mistura de isômeros, Ip e colaboradores (1999a) alimentaram ratas Sprague-Dawley durante todo o período da puberdade. Os animais que consumiram a manteiga mostraram uma inibição de 53 % na progressão do tumor mamário. Também foi observado um acúmulo de cis-9, trans-11 na glândula mamária e em outros tecidos.

A maior sensibilidade dos tumores da glândula mamária frente à administração de CLA pode ser explicada por algumas hipóteses. Ip e outros (1999b), sugeriram que células primárias suplementadas com CLA apresentaram inibição no crescimento e estímulo à apoptose. Este estudo aponta que o CLA seja capaz de inibir o crescimento e a diferenciação das células epiteliais normais da glândula mamária. Corroborando com estes dados, Ip (2001) demonstrou que o CLA estocado nos adipócitos poderia agir como um fator parácrino na regulação do crescimento das células epiteliais mamárias. Além destes efeitos no epitélio mamário, o CLA também pode agir indiretamente reduzindo a diferenciação do estroma mamário para um tipo de célula endotelial. Particularmente o CLA foi capaz de diminuir a capacidade das células do estroma mamário de formar redes de microcapilares *ex vivo*,

contribuindo desta maneira para a eficácia na inibição da carcinogênese mamária (IP *et al.*, 2001). Embora os efeitos do CLA sobre outros tipos de câncer sejam conhecidos, os mecanismos pelos quais o CLA atua ainda não estão completamente elucidados. As hipóteses variam desde uma ação antioxidante (BAWA, 2003), até uma possível competição com o ácido linoléico. Nesta última, o CLA diminuiria a biossíntese de ácido araquidônico e, conseqüentemente de eicosanóides, que por sua vez estariam relacionados à formação de tumores (McGUIRE; McGUIRE, 1999).

### **2.5.2 Efeitos do CLA no sistema imune**

Alguns trabalhos têm demonstrado que o sistema imune também pode ser afetado pelo CLA. O consumo dietético de CLA seria capaz de potencializar as respostas imunológicas, assim como reduzir os efeitos adversos mediados pelo catabolismo (PARIZA; PARK; COOK, 2001).

Para avaliar o efeito do CLA sobre as funções celulares de macrófagos, Cook e colaboradores (1993), isolaram macrófagos peritoniais de ratos alimentados com 0,5 % de CLA. Estas células demonstraram uma atividade fagocitária duas vezes maior quando comparado às células do grupo controle. Corroborando com estes resultados, Yamasaki e outros (2000) demonstraram que quando ratos Sprague-Dawley foram suplementados com diferentes doses de CLA (0; 0,05; 0,10; 0,25 e 0,50 %) durante 3 semanas, houve um aumento na produção de IgG, IgM e IgA pelo baço destes animais.

A caquexia induzida pela deficiência no sistema imune traz grandes prejuízos e danos aos criadores de animais. Após a vacinação habitual, aves, suínos e bovinos diminuem a velocidade de ganho de peso resultando em uma significativa perda comercial e aumento de

---

custo (WHIGHAM; COOK; ATKINSON, 2000). Durante a resposta imunológica frente ao ataque de um patógeno, grande quantidade de citocinas são produzidas e estas são responsáveis por um aumento no catabolismo tecidual. Como exemplo, temos a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral (TNF) que quando liberados pelos macrófagos estimulam a proteólise do músculo esquelético, induzindo a anorexia (DAUN; McCARTHY, 1993; OHGO *et al.*, 1992). Como consequência do aumento de interleucina-1 no músculo esquelético, ocorre a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que por sua vez, é responsável pela degradação proteica (DINARELLO, 1984). Considerando que as prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido linoléico via ciclooxygenases, e que o CLA seria capaz de competir com o ácido linoléico pela absorção e com isto inibir a produção de PGE<sub>2</sub>, Cook e colaboradores (1993) investigaram o efeito da suplementação com CLA. Ratos e galinhas receberam 0,5 % de CLA após terem o sistema imune suprimido por bactérias. Ao final, ambos os grupos que receberam CLA apresentaram uma menor perda de peso quando comparados aos respectivos controles. Com este mesmo propósito, camundongos foram alimentados com 0,5 % de óleo de peixe (controle) ou CLA. O grupo controle apresentou uma perda de peso duas vezes maior após a indução da queda no sistema imunológico, quando comparado ao grupo que recebeu CLA (MILLER *et al.*, 1994).

Em humanos, a atividade do CLA parece ser diferente da encontrada em modelos experimentais. Dezesete mulheres saudáveis ficaram confinadas em uma unidade metabólica por 93 dias, recebendo nos primeiros 30 dias cápsulas de óleo de girassol (6 g/dia) para adaptarem-se. Em seguida elas foram divididas em 2 grupos, sendo que 10 delas passaram a receber cápsulas com CLA (3,9 g/dia) e as demais continuaram a receber óleo de girassol. Ao final do experimento o estado imunológico destas mulheres foi comparado e verificou-se que não houve aumento no número de linfócitos T e B, granulócitos e monócitos em ambos os grupos (KELLY *et al.*, 2000). Frente a estes resultados discrepantes, o consumo de CLA com o



objetivo de promover a saúde humana, especialmente prevenindo a perda de peso em doenças como câncer, AIDS e lupus merece maiores investigações (WHIGHAM; COOK; ATKINSON, 2000).

### **2.5.3 Efeitos do CLA no diabetes mellitus**

Diversos fatores de risco, como a diminuição da tolerância à glicose, etnia, idade, sexo e principalmente a obesidade, estão associados ao desenvolvimento do diabetes mellitus não insulino dependente. Buscando identificar os efeitos do CLA na prevenção e tratamento do diabetes mellitus não insulino dependente, Houseknech e outros (1998), alimentaram ratas da linhagem Zucker, caracterizada por desenvolver espontaneamente diabetes entre a sétima e a décima segunda semana de idade, com 1,5 % de uma mistura de isômeros de CLA. Após 2 semanas de tratamento, os animais suplementados apresentaram normalização da tolerância à glicose e diminuição dos ácidos graxos livres circulantes. Utilizando-se do mesmo modelo experimental, Teachey e outros (2003), suplementaram ratas durante 20 dias consecutivos com óleo de milho (controle), ou com uma mistura dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 (0,3 g/kg ou 1,5 g/kg de peso corporal), ou com ácido lipóico (10 mg/kg ou 50 mg/kg de peso corporal), ou com uma combinação das menores ou das maiores doses de CLA e ácido lipóico. Após serem submetidas ao teste de tolerância a glicose oral, verificou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da glicose plasmática nas ratas que receberam as menores doses de CLA e da combinação de CLA e ácido lipóico. Também foi encontrado um aumento de 77 % e 54 % na atividade de transporte da glicose mediada pela insulina nos músculos epitroclearis e sóleo, respectivamente, na menor dose do tratamento combinado. Já os grupos que receberam altas doses de CLA e ácido lipóico isoladamente ou a combinação destes suplementos não demonstraram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros analisados. Estes resultados sugerem que uma combinação de baixas doses de CLA e ácido lipóico, promoveram

uma interação sinérgica capaz de melhorar o transporte de glicose muscular, assim como o estresse oxidativo e o acúmulo de triacilglicerol intramuscular. Este efeito possivelmente deve-se à ação antioxidante destes componentes quando consumidos em conjunto.

Belury, Mahon e Banni (2003) demonstraram que 81 % dos indivíduos portadores de diabetes mellitus não insulino dependente (n = 11), que receberam 6,0 g de CLA/dia durante 8 semanas, apresentaram redução significativa da glicose sanguínea de jejum quando comparados ao grupo controle.

Embora a suplementação com CLA tenha sido capaz de diminuir a glicemia de jejum em modelos experimentais e humanos portadores de diabetes mellitus, o mesmo não foi observado em porcos (STANGL; MULLER; KIRCHGESSNER, 1999), camundongos (CLÉMENTT *et al.*, 2002) e humanos normoglicêmicos (MEDINA *et al.*, 2000). Quando camundongos foram alimentados durante 4 semanas com 2,4 % de óleo de girassol (controle) ou 2 % de óleo de girassol acrescido de 0,4 % de ácido linoléico conjugado ou dos isômeros de CLA cis-9, trans-11 ou trans-10, cis-12, foi verificado um aumento de 10 vezes nos níveis plasmáticos de insulina do grupo que recebeu trans-10, cis-12, quando comparado aos demais (CLÉMENTT *et al.*, 2002). Resultados similares foram observados em humanos. Homens obesos não diabéticos (n = 25) receberam 3 g/dia de óleo de oliva (controle) ou uma mistura composta predominantemente por cis-9, trans-11 CLA. Após um período de 12 semanas de suplementação, o grupo que recebeu CLA apresentou uma maior resistência ( $p < 0,05$ ) à atividade da insulina (RISÉRUS *et al.*, 2004).

O efeito do CLA no diabetes mellitus parece ser dependente da dose, isômero, espécie, sexo e principalmente da existência prévia de obesidade e da sensibilidade à insulina. Dessa maneira, pesquisas mais abrangentes devem ser realizadas buscando elucidar o efeito deste composto no benefício desta doença (HARGRAVE *et al.*, 2003).

#### 2.5.4 Efeitos do CLA na mineralização óssea

Algumas evidências têm apontado que a composição dos ácidos graxos da dieta seja responsável pela modulação da mineralização óssea (LI; WATKINS, 1998; COOK, JEROME, PARIZA, 1997; McCARTHY *et al.*, 1991). Wuthier (1993), demonstrou que o perfil lipídico dietético tem impacto sobre a formação de cartilagem. Mais recentemente, Li e outros (1999), relataram que galinhas e ratos consumindo ácidos graxos poliinsaturados, incluindo o CLA, apresentaram ossos mais densos de acordo com análises histológicas de sua formação.

Para determinar a influência do CLA na formação óssea, Cook, Jerome e Pariza (1997), suplementaram frangos com 0 (controle); 0,375 e 0,75 % de CLA durante 3 semanas. Ao final, a tíbia destes animais foi coletada e a quantidade de minerais medida. Os frangos que receberam CLA tiveram o conteúdo mineral elevado em 10 % quando comparado ao grupo controle. Uma possível explicação para este efeito benéfico da suplementação com CLA, é que quando consumido em quantidade suficiente, ele seja capaz de inibir a biossíntese de eicosanóides, entre eles a prostagladina E<sub>2</sub> e conseqüentemente alterar a produção do fator de crescimento mediado pela insulina. Este, por sua vez, atua estimulando a anabolismo do tecido ósseo pelo osteoblasto (LI; WATKINS, 1998; McCARTHY *et al.*, 1991).

#### 2.5.5 Efeitos do CLA no perfil lipídico

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morbi-mortalidade nos países desenvolvidos e em grande parte dos países em desenvolvimento (LEE; KRITCHEVSKY; PARIZA, 1994). Dentre estas doenças, a aterosclerose é a principal, sendo responsável por 50 % dos casos de morte no ocidente (TOOMEY *et al.*, 2003). A aterosclerose

é uma doença progressiva, caracterizada pelo acúmulo de lípidos nas artérias que envolve um complexo processo inflamatório (LIBBY, 2002). Embora ainda não haja um consenso entre os pesquisadores, com relação ao surgimento da aterosclerose, sabe-se que a hipercolesterolemia é um fator importante para seu aparecimento (LIBBY, 2002).

Considerando a hipótese de que o CLA possa causar alterações no perfil lipídico e dessa maneira reduzir a aterosclerose, Lee, Kritchevsky e Pariza (1994), realizaram um estudo com coelhos em que o grupo de animais suplementado com CLA (0,5 g/coelho/dia) adicionado a uma dieta hipercolesterolêmica por 22 semanas, obteve redução significativa ( $p < 0,02$ ) da fração LDL colesterol, quando comparado ao grupo controle. Análises histológicas da aorta demonstraram redução no número de lesões e na quantidade de colesterol depositado no grupo que recebeu CLA. Utilizando-se do mesmo modelo experimental, Kritchevsky (2001) encontrou uma regressão de 30 % nas lesões aterogênicas no grupo suplementado com 1 % de CLA.

Outros resultados importantes foram encontrados em estudos realizados com camundongos. Toomey e outros (2003), encontraram resultados positivos quando suplementaram camundongos “knockout” para apo E com 1 % de cis-9, trans-11 CLA. Estes animais, caracterizados por possuir aterosclerose pré-estabelecida, apresentaram um retardo no desenvolvimento de novas lesões, assim como regressão no tamanho das lesões já existentes. Análises imunológicas e químicas apontaram um aumento na quantidade de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) nas células musculares lisas da artéria aorta dos camundongos suplementados com CLA, sugerindo que este seria o mecanismo responsável pela inibição da aterosclerose. O PPAR $\gamma$  é um membro de uma família de receptores nucleares, pertencente a um tipo de fatores de transcrição regulatórios que parece estar envolvido no transporte de lípidos entre monócitos e macrófagos, na inibição da

formação de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente na redução da placa de ateroma (KERSTEN; DESVERGNE; WAHLI, 2000).

Alguns estudos com ratos também demonstraram resultados significativos com relação à alteração no perfil lipídico (RAHMAN *et al.*, 2001; STANGL, 2000). Ratos Sprague-Dawley foram alimentados com dieta AIN-93G acrescida de 3 % de uma mistura de isômeros de CLA ou isenta de CLA durante 39 dias. As concentrações de triacilgliceróis, colesterol total e fosfatidilcolina das lipoproteínas LDL e HDL não foram alteradas com o tratamento. No entanto, os triacilgliceróis presentes na VLDL sofreram redução de 59 % no grupo que recebeu CLA (STANGL, 2000). Para avaliar se o CLA seria capaz de alterar o perfil lipídico de animais mesmo após um curto período de suplementação, Rahman e outros (2001) alimentaram ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) por apenas 48 horas. Este modelo experimental, é caracterizado por desenvolver obesidade e diabetes não insulino dependente na fase adulta. Após 12 semanas de adaptação, os animais foram divididos em 2 grupos que receberam 7,5 % de óleo de açafraão acrescido de 7,5 % de CLA ou somente 15 % de óleo de açafraão, constituindo os grupos CLA e controle, respectivamente. Os animais permaneceram 24 horas em jejum e em seguida receberam por 48 horas suas respectivas dietas. Ao final, o grupo que recebeu CLA apresentou 15 % de redução nos níveis de colesterol total sérico e também diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de HDL-colesterol e fosfolípides. No entanto, a concentração sérica de triacilgliceróis não foi alterada pelo tratamento.

Estudos realizados com hamsters demonstraram que este modelo animal parece responder diferentemente à suplementação com CLA. Durante 8 semanas, hamsters machos receberam dieta contendo uma mistura de isômeros de CLA, apenas os isômeros cis-9, trans-11 CLA ou trans-10, cis-12 CLA ou dieta sem CLA (controle), constituindo 4 grupos com 32 animais cada. A coleta de sangue foi realizada na metade e ao final do experimento. Nestes dois momentos, os valores de colesterol total plasmático dos animais suplementados

com a mistura de isômeros e apenas com o trans-10 cis-12 apresentaram redução estatisticamente significativa em relação aos demais. Em contrapartida, estes mesmos animais obtiveram concentrações de triacilgliceróis plasmáticos superiores aos animais dos grupos cis-9, trans-11 e controle. O perfil dos ácidos graxos das lipoproteínas VLDL, LDL e HDL também foi analisado. Os animais que receberam a mistura de CLA e o isômero trans-10, cis-12 tiveram o colesterol LDL e HDL reduzidos. Já as concentrações de colesterol e triacilgliceróis da VLDL aumentaram nestes mesmos grupos após a suplementação (DECKERE *et al.*, 1999). Corroborando com estes resultados, Gavino e colaboradores (2000) alimentaram hamsters por 43 dias com dieta aterogênica acrescida de uma mistura de isômeros de CLA (10 g/kg de dieta) ou do isômero puro cis-9, trans-11 CLA (2 g/kg de dieta) ou de ácido linoléico (2 g/kg de dieta). Somente os animais que receberam a mistura de isômeros de CLA, apresentaram redução nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis e colesterol total. Estes estudos sugerem que o isômero trans-10, cis-12 seja o responsável pelo efeito antiaterogênico encontrado, visto que mesmo quando presente em pequenas quantidades, como nas misturas de CLA, alterações positivas foram relatadas (GAVINO *et al.*, 2000; DECKERE *et al.*, 1999).

Embora contraditórios, alguns estudos realizados com modelos experimentais têm demonstrado efeito antiaterogênico com a administração de CLA (STANGL, 2000; DECKERE *et al.*, 1999; LEE; KRITCHEVSKY; PARIZA, 1994). Porém, em humanos, os resultados não são satisfatórios. Um estudo realizado com dezessete mulheres suplementadas com 3,9 g de uma mistura de CLA por 63 dias, não demonstrou redução significativa dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol total e LDL-colesterol. Este resultado pode ser explicado pelo pequeno número da amostra, curto tempo de intervenção e também pelo fato das voluntárias terem consumido dieta normolipídica durante o experimento (BENITO *et al.*, 2001). Sabe-se que é mais difícil observar reduções lipídicas em indivíduos normolipídicos do que em hiperlipídicos (NELSON *et al.*, 1997). Reforçando estes dados, homens (n = 14) e mulheres (n = 10) foram

divididos em 2 grupos homogêneos constituindo os grupos CLA e controle. Nas primeiras 2 semanas de tratamento, o grupo CLA recebeu 2 cápsulas/dia de uma mistura de isômeros, enquanto que o grupo controle recebeu a mesma quantidade de óleo de soja. Em seguida, estes mesmos indivíduos passaram a receber por mais 4 semanas, 4 cápsulas/dia de CLA (grupo CLA) ou óleo de soja (controle). Os participantes tiveram seu sangue coletado no início, metade e ao final do experimento. Os valores encontrados para triacilgliceróis e colesterol total séricos não apresentaram redução estatisticamente significativa (MOUGIOS *et al.*, 2001). Resultados similares foram encontrados mais recentemente por Petridou, Mougios e Sagredos (2003). Dezesete mulheres, divididas em 2 grupos receberam durante 45 dias 2,1 g de uma mistura de CLA ou óleo de soja. Após este período, o grupo que recebeu óleo de soja, passou a receber a mistura de CLA, e o que recebia CLA, passou a receber óleo de soja por mais 45 dias. Ao final do tratamento amostras de sangue foram coletadas e o perfil lipídico analisado. Não foi encontrada redução estatisticamente significativa nas concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-colesterol.

O efeito antiaterogênico da suplementação com CLA pode ser explicado pelo declínio da produção de colesterol, assim como de sua secreção pelo fígado (SAKONO *et al.*, 1999), pela redução da síntese de triacilgliceróis, associada ao aumento de sua oxidação e maior ativação do PPAR $\gamma$  (TOOMEY *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2001) e também pela inibição da produção de tromboxano e conseqüente diminuição da agregação plaquetária (STANGL, 2000; TRUITT; McNEILL; VADERHOEK, 1999). Pelo fato do CLA mostrar-se efetivo sobre as alterações no perfil lipídico em alguns modelos experimentais, novos trabalhos precisam ser realizados com o propósito de elucidar os mecanismos de ação do CLA na prevenção da aterosclerose e dessa maneira assegurar sua utilização na redução das doenças cardiovasculares em humanos (BELURY, 2002).

### 2.5.6 Efeitos do CLA na composição corporal

Um dos efeitos mais estudados com relação à suplementação com CLA é sua capacidade em alterar a composição corporal, promovendo aumento da massa magra e redução da massa gorda em diferentes espécies, tais como: camundongos (PARK *et al.* 1997), hamster (DECKERE *et al.*, 1999), ratos (SISK *et al.*, 2001), porcos (OSTROWSKA *et al.*, 1999) e humanos (ZAMBELL *et al.*, 2000). Estudos têm evidenciado que o isômero trans-10, cis-12 CLA seja o responsável por este efeito (PARK *et al.*, 1999). Existem vários mecanismos propostos para explicar esta alteração na composição corporal, entre eles estão a diminuição da proliferação e diferenciação de pré-adipócitos, diminuição da esterificação de ácidos graxos em triacilgliceróis, aumento do gasto energético, aumento da lipólise, alteração da atividade das enzimas carnitina palmitoiltransferase e lipase lipoprotéica e da concentração do hormônio leptina, entre outros (WANG; JONES, 2004).

Ao contrário dos adipócitos maduros, os pré-adipócitos são capazes de proliferar-se facilmente, e este é um dos mecanismos responsáveis por aumentar a deposição de gordura (BELURY, 2002). Ao considerar que a diminuição da proliferação dos pré-adipócitos possa causar redução do acúmulo de gordura, vários estudos foram realizados. Utilizando pré-adipócitos 3T3-L1 de roedores, alguns estudos demonstraram diminuição na proliferação das células suplementadas com CLA (EVANS *et al.*, 2000; SATORY; SMITH, 1999). Pré-adipócitos de humanos também apresentaram redução de 30 a 35 % na proliferação celular quando tratados com CLA (McNELL; MERSMANN, 2001). Quando os pré-adipócitos tornam-se maduros e diferenciam-se a adipócitos, estes passam a ter a capacidade de sintetizar e estocar uma grande quantidade de lípidos (WANG; JONES, 2004; GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998). A diferenciação do pré-adipócito a adipócito maduro é medida por uma série de fatores de transcrição, dentre eles, particularmente pelo “enhancer-binding protein” (C/EBP $\alpha$ ) e pelo



receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000). Estes fatores de transcrição coordenam a expressão de genes envolvidos na síntese e manutenção dos adipócitos, incluindo o transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4) e a esteroil - CoA dessaturase (SCD). Muitos estudos estão sendo realizados com a hipótese de que se menos pré-adipócitos diferenciarem-se até adipócitos maduros, possa haver diminuição do número de células potencialmente capazes de armazenar lípidos e conseqüentemente redução da massa gorda (PARIZA; PARK; COOK, 2000). Neste sentido, Brodie e colaboradores (1999), demonstraram que culturas de células de pré-adipócitos 3T3-L1, quando tratadas com uma mistura de CLA, apresentaram menores níveis de PPAR $\gamma$ . A suplementação de pré-adipócitos 3T3-L1 também mostrou redução da expressão do C/EBP $\alpha$  (KANG *et al.*, 2003). Da mesma maneira, vários estudos demonstraram a capacidade do CLA em inibir a atividade do GLUT4 (KANG *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2002) e da SCD (BROWN *et al.*, 2003; CHOI *et al.*, 2000; BRETILLON *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem uma redução da proliferação celular como conseqüência da inibição de fatores de transcrição e genes envolvidos neste processo.

Assim como a inibição da proliferação e diferenciação dos adipócitos, a redução no tamanho destas células contribui para a diminuição do tecido adiposo. O tamanho do tecido adiposo corresponde quase que exclusivamente à quantidade de triacilgliceróis no interior da célula, visto que este representa cerca de 95 % dos lípidos dos adipócitos (BELURY, 2002). Estudos *in vitro* têm demonstrado que pré-adipócitos 3T3-L1 suplementados com CLA diminuem seu conteúdo de triacilgliceróis e conseqüentemente seu tamanho (EVANS *et al.*, 2000). Resultados similares foram reportados por Brown, Evans e McIntosh (2001), que trataram culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 durante os 6 primeiros dias de diferenciação com o isômero puro trans-10, cis-12 CLA. Estas células tiveram a quantidade de triacilgliceróis no seu interior diminuída concomitantemente com o seu tamanho. Estes mesmos resultados foram

observados em estudos *in vivo*. Ratos Sprague-Dawley foram alimentados durante 5 semanas com dietas contendo 0; 0,25; e 0,5 % de uma mistura de CLA (97 %) e com 0,5 % de uma mistura de CLA (55 %). Os animais que receberam CLA apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) do peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e parametrial. Esta redução foi causada pela diminuição no tamanho das células adiposas, visto que não foi observada diminuição no número de células em ambos os tecidos (AZAIN *et al.*, 2000). Utilizando-se do mesmo modelo experimental, Poulos e outros (2001), encontraram redução dos tecidos inguinal e retroperitoneal de ratos alimentados com 0,5 % de CLA, causada pelo aumento de número de adipócitos pequenos e diminuição do número de adipócitos grandes. Sisk e colaboradores (2001) demonstraram que machos e fêmeas não obesos de ratos da linhagem Zucker, quando suplementados com 0,5 % de CLA, tiveram redução do tecido adiposo causada pela diminuição do tamanho dos adipócitos. No entanto, o mesmo não foi observado nos animais obesos, que tiveram seu tecido adiposo aumentado após a suplementação.

A síntese de triacilglicerol pode ser alterada pela atividade da enzima lípase lipoprotéica (LPL). A LPL é sintetizada no adipócito e logo em seguida migra para a superfície do endotélio epitelial, onde age clivando os ácidos graxos das lipoproteínas circulantes. Estes ácidos graxos podem ser oxidados ou participarem da ressíntese lipídica pelos adipócitos. Acredita-se que a redução da atividade da LPL possa diminuir os ácidos graxos disponíveis capazes de serem ressintetizados a triacilgliceróis e assim reduzir a deposição lipídica (PARIZA; PARK; COOK, 2001). Park e outros (1997) encontraram uma redução linear da atividade da lípase lipoprotéica em culturas de adipócitos 3T3-L1 quando tratadas com uma quantidade crescente (20 a 200  $\mu\text{mol/L}$ ) de uma mistura de isômeros de CLA. Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores, buscou identificar qual isômero seria responsável por alterar a composição corporal. Culturas de adipócitos 3T3-L1 foram tratadas com uma mistura de CLA e pelos isômeros puros trans-10, cis-12 CLA, cis-9, trans-11 CLA e

trans-9, trans-11 CLA. Apenas as células suplementadas com a mistura e com o isômero puro trans-10, cis-12 CLA demonstraram redução significativa da atividade da LPL, assim como dos triacilgliceróis e gliceróis intracelulares (PARK *et al.*, 1999).

Além da LPL, outras enzimas envolvidas na lipogênese, como a acetil CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) foram afetadas pela suplementação com CLA. Estas enzimas são responsáveis pela síntese *de novo* no tecido adiposo e na glândula mamária. Neste sentido, Tsuboyama-Kasaoka e outros (2000) quantificaram o RNAm para ACC e FAS em fêmeas de camundongos alimentadas com 1 % de CLA durante 5 meses. Estes animais apresentaram uma redução de 72 % e 88 % dos níveis de RNAm das enzimas acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase, respectivamente. Pelo fato da expressão de várias enzimas lipogênicas ser controlada pelo fator de transcrição SREBP-1 “sterol regulatory element binding protein-1”, o efeito da suplementação com CLA na expressão do SREBP-1 também foi analisado. A abundância do RNAm deste fator de transcrição diminuiu com o tratamento e passou a ser 33 % da abundância comparada ao grupo controle (SAKAI *et al.*, 1996). O PPAR $\gamma$ , outro importante fator de transcrição envolvido na adipogênese, foi suprimido em fêmeas e machos de camundongos C57BL/6J (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000) e em machos de camundongos ICR (TAKAHASHI *et al.*, 2002), quando estes animais foram alimentados com uma mistura de CLA contendo os isômeros cis-9, trans-11 CLA e trans-10, cis-12 CLA em quantidades similares. A concentração do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4), determina a passagem de glicose para o tecido adiposo, para o músculo e para a membrana plasmática. A suplementação com 1 % de CLA diminuiu os níveis de RNAm do GLUT4 no tecido adiposo branco e marrom, ao mesmo tempo que aumentou sua concentração no músculo esquelético em camundongos. Estes resultados sugerem que o CLA seja capaz de inibir a conversão de glicose em gordura, especificamente triacilglicerol (TAKAHASHI *et al.*, 2002).

O efeito do CLA sobre a lipogênese, também foi observado em vacas e culturas de pré-adipócitos humanos. Vacas alimentadas com uma única dose de 100 gramas de CLA mostraram uma diminuição da síntese de ácidos graxos, sugerida pela redução dos lípides secretados no leite (LOOR; HERBEIN, 1998). Mais recentemente, vacas suplementadas com 10 g/dia do isômero trans-10, cis-12 CLA, demonstraram uma redução na lipogênese associada a um aumento dos teores de ácidos graxos não esterificados no plasma (BAUMGARD *et al.*, 2002; BAUMGARD *et al.*, 2000). Estudos realizados com cultura de pré-adipócitos humanos indicam que o CLA seja responsável por diminuir o conteúdo de triacilgliceróis intracelular, por meio do declínio da síntese de ácidos graxos (EVANS; BROWN; McINTOSH, 2002).

O aumento no processo de apoptose dos adipócitos contribui de forma importante para a diminuição da deposição de gordura em animais tratados com CLA. Quando fêmeas de camundongos C57BL/6J foram alimentadas com dieta semi-purificada com ou sem CLA (1 %) durante 11 dias, verificou-se 41 % de redução no tamanho dos adipócitos do tecido adiposo branco dos animais que receberam CLA. Esta redução foi possivelmente causada pelo aumento na expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). O TNF $\alpha$  é uma citocina capaz de causar apoptose nos adipócitos e dessa maneira reduzir o tecido adiposo (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos representam a principal fonte de energia para muitos tecidos, especialmente para o muscular e o hepático. A maioria dos tecidos contém pequenas quantidades de lípidos estocados, sendo assim, o suprimento contínuo de ácidos graxos é proveniente do tecido adiposo. Os ácidos graxos são produzidos por meio da lipólise, transportados pela corrente sanguínea e atingem as células, onde sofrem oxidação. Alguns estudos têm demonstrado aumento na razão lipolítica de células 3T3-L1 e em porcos suplementados com CLA (OSTROWSKA *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1997).

Embora estes resultados sejam escassos, eles sugerem que o aumento na lipólise possa contribuir para a redução da deposição lipídica.

Muitas são as evidências de que o aumento da oxidação dos ácidos graxos possa diminuir a quantidade disponível destes para a síntese de triacilgliceróis e conseqüentemente da deposição tecidual de gordura. A oxidação dos ácidos graxos ocorre em duas organelas distintas, que são a mitocôndria e o peroxissomo (BELURY, 2002). Estudos indicam que o consumo dietético de CLA induz o aumento da oxidação. Ratos alimentados com 1 % de uma mistura de CLA por 2 semanas produziram mais cetonas do que o controle, que recebeu 1 % de ácido linoléico (SAKONO *et al.*, 1999). Neste mesmo sentido, Evans, Brown e McIntosh (2002), verificaram que a razão  $\beta$ -hidroxibutirato/acetato aumentou, sugerindo que o consumo de CLA alterou a oxidação celular, particularmente aumentando a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. Este mesmo grupo de pesquisadores observou aumento na oxidação de ácido oléico em adipócitos 3T3-L1 que receberam 50  $\mu\text{mol/L}$  de trans-10, cis-12 CLA por 6 dias. A carnitina palmitoiltransferase (CPT) é a enzima responsável pelo transporte inicial de ácidos graxos para o interior da mitocôndria para serem oxidados, sendo portanto, uma enzima limitante para a  $\beta$ -oxidação. Martin e colaboradores (2000) demonstraram um aumento na atividade da CPT no fígado e no tecido adiposo de ratos que consumiram dieta contendo 1 % de trans-10, cis-12 CLA durante 6 semanas. Rahman e outros (2001) também observaram aumento da atividade da CPT no tecido adiposo marrom, tecido adiposo perirenal, tecido muscular e fígado em ratos OLEFT suplementados com 1 % de CLA na forma de triacilglicerol e na forma de ácidos graxos livres.

A ACO é uma enzima limitante na  $\beta$ -oxidação peroxissomal, a qual tem sua atividade aumentada com a proliferação desta organela (TUGWOOD *et al.*, 1992). O CYP4A1 é uma enzima envolvida na  $\omega$ -hidroxilação dos ácidos graxos, responsável pelo aumento da

$\beta$ -oxidação (ALDRIDGE; TUGWOOD; GREEN, 1995). As proteínas ligadoras de ácidos graxos (“fatty acid-binding protein” – FABP), são responsáveis por transportar ácidos graxos através da membrana plasmática e torná-los disponíveis para a metabolização (VANDEN HEUVEL *et al.*, 1993). Considerando o envolvimento destes três fatores na oxidação dos ácidos graxos, diversos estudos buscaram avaliar o efeito da suplementação com CLA sobre os mesmos (MOYA-CAMARENA; VANDEN HEUVEL; BELURY, 1999; BELURY *et al.*, 1997). Neste sentido, Moya-Camarena, Vanden Heuvel e Belury (1999) demonstraram que a suplementação com 1,5 % de CLA aumentou os níveis de RNAm da ACO e da FABP em ratos. Resultados similares foram relatados por Belury e outros (1997) quando camundongos alimentados com 0,5 a 1,5 % de CLA tiveram um aumento dos níveis de ACO, FABP e CYP4A1.

Um aumento no gasto energético pode ser outro provável mecanismo capaz de diminuir a deposição de gordura em algumas espécies tratadas com CLA. West e outros (1998), alimentaram camundongos AKR/J com dieta rica (45 % kcal) ou pobre (15 % kcal) em lípidos, acrescida ou não de 1 % de CLA. Os grupos suplementados com CLA apresentaram redução significativa da deposição de gordura, independente do tipo de dieta consumida e aumento na razão metabólica, indicando aumento do gasto energético. Resultados similares foram reportados por Ohnuki e colaboradores (2001) quando camundongos Std ddY receberam uma única dose de uma mistura de CLA. Estes animais demonstraram elevação no gasto energético e subseqüentemente diminuição do tecido adiposo branco. Mais recentemente, Terpstra e outros (2002), verificaram o gasto energético de camundongos em fase de crescimento, submetidos ou não a uma dieta restrita e alimentados ou não com 0,93 % de uma mistura de isômeros de CLA, durante 39 dias. A energia presente na carcaça, na comida e nas fezes foi medida por meio de uma bomba calorimétrica. O CLA diminuiu a porcentagem de energia que foi armazenada na carcaça de 1,9 para -2,3 e de 1,3 para -2,9 em animais consumindo dieta não restrita e restrita, respectivamente. Os valores negativos nos grupos que receberam CLA

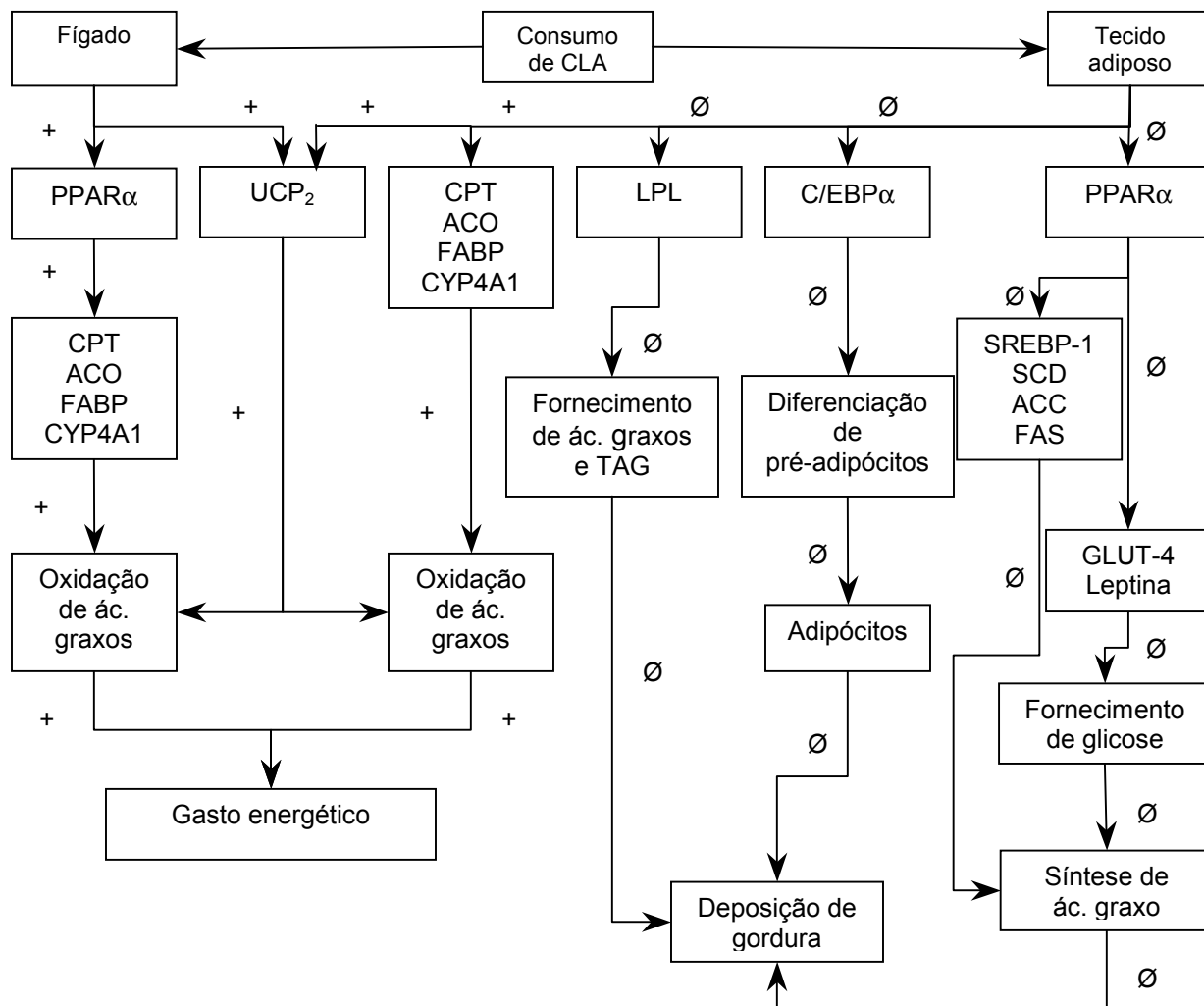
indicam que os animais ficaram em balanço energético negativo, ou seja, além de não estocarem energia, ainda tiveram seu gasto energético aumentado. Estes animais apresentaram uma menor quantidade de energia estocada na carcaça, que foi causada por um aumento de 74 % no gasto energético e de 26 % da energia perdida nas fezes. Acredita-se que este aumento na termogênese (gasto energético) nos animais seja particularmente atribuído a alterações na expressão dos genes das proteínas “uncoupling proteins” (UCP). Estas proteínas regulam a adiposidade e possuem expressão em diversos tecidos. A UCP1 é expressa exclusivamente no tecido adiposo marrom, a UCP2 é expressa igualmente em diferentes tecidos e a UCP3 é expressa no tecido muscular e também no tecido adiposo marrom (ADAMS, 2000). Sendo assim, alguns estudos têm demonstrado aumento na expressão destas proteínas em animais tratados com CLA (RYDER *et al.*, 2001; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000). Um aumento nos níveis de RNAm de UCP2 causado pela ingestão de CLA, foi observado no tecido adiposo branco parametrial e no fígado de fêmeas de camundongos C57BL/6J (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000). Corroborando com estes resultados, foi demonstrado um aumento na expressão do gene da UCP2 no tecido adiposo branco e no músculo esquelético de ratos ZDF e também no tecido adiposo branco de camundongos C57BL/6J (RYDER *et al.*, 2001).

A leptina é um hormônio sintetizado exclusivamente pelos adipócitos e secretado no plasma, responsável por sinalizar a saciedade ao hipotálamo. A quantidade de leptina produzida e sua concentração plasmática dependem diretamente do tamanho do adipócito e do tecido adiposo (MEDINA *et al.*, 2000). Ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) tiveram os teores de leptina reduzidos estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quando alimentados com 1 % de CLA durante 4 semanas (RAHMAN *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Yamasaki e outros (2003), que observaram níveis de leptina sérica inferiores quando ratos Sprague-Dawley receberam 0,2 % de CLA por 8 semanas. No entanto, outras espécies, como coelhos e humanos, não apresentaram alterações nos teores de leptina,

quando alimentados com CLA (CORINO *et al.*, 2002; MEDINA *et al.*, 2000). A suplementação com CLA, mostrou-se capaz de reduzir a atividade do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e este, por sua vez, de diminuir a expressão dos genes para leptina em roedores e adipócitos (KALLEN; LAZAR, 1996; ZHANG *et al.*, 1996). Simultaneamente, a incorporação do CLA na fração fosfolipídica das membranas celulares, altera os sinais de transdução e conseqüentemente a produção de leptina (IP; SCIMECA; THOMPSON, 1994). Estes estudos sugerem a atuação do CLA na diminuição da produção deste hormônio.

Sendo assim, estes são os possíveis mecanismos de ação pelos quais o CLA é capaz de alterar a composição corporal (Figura 3). É possível verificar que todas as mudanças metabólicas que ocorrem propiciam concomitantemente a diminuição da lipogênese e a potencialização da lipólise (PARK *et al.*, 1997).





**Figura 3.** Possíveis mecanismos de ação do ácido linoléico conjugado sobre a alteração da composição corporal. + Aumento/Ø Supressão. ACC, acetil CoA carboxilase; ACO, acil CoA oxidase; C/EBP, “enhancer-binding protein”; CPT, cartinina palmitoiltransferase; CYP4A1; FABP, “fatty acid-binding protein”/proteínas ligadoras de ácidos graxos; FAS, ácido graxo sintase; GLUT, transportador de glicose; LPL, lípase lipoprotéica; PPAR, “peroxisome proliferator activated receptor”/receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; SCD, estearoil CoA dessaturase; SREBP, “sterol regulatory element binding protein”; UCP, “uncoupling protein”. Adaptado de Wang e Jones (2004).

Em humanos, os efeitos da suplementação com CLA sobre a composição corporal são controversos. Em um estudo realizado por Blankson e colaboradores (2000), foram analisados 47 indivíduos obesos e sobrepesos suplementados com 1,7; 3,4; 5,1 ou 6,8 g/dia de

CLA ou com 9 g/dia de óleo de oliva por 12 semanas. Após o tratamento, houve uma redução da gordura corporal não dose dependente dos grupos suplementados com 3,4 e 6,8 g/dia de CLA. Contribuindo com estes resultados, Smedman e Vessby (2001) encontraram uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) da gordura corporal de mulheres saudáveis suplementadas com 3,4 g/dia de uma mistura de CLA durante 12 semanas. No entanto, nenhuma alteração na composição corporal foi observada em mulheres confinadas em uma unidade metabólica por 64 dias que receberam 3,0 g/dia de CLA (ZAMBEL *et al.*, 2000). Entretanto, é importante ressaltar, que a maioria dos estudos que visam constatar alterações na composição corporal, são realizados com modelos experimentais em fase crescimento, enquanto que, com humanos, na fase adulta. Portanto, os estudos sobre os efeitos do CLA em humanos, têm como objetivo a diminuição dos depósitos de gordura já formados (hipertrofia) e em animais em crescimento, a diminuição do número de adipócitos e, conseqüentemente, da deposição de gordura (hiperplasia e hipertrofia) (PARIZA; PARK; COOK, 2000).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Animais para experimentação

Foram utilizados ratos Wistar, albinos, machos, saudáveis, recém-desmamados (21 a 23 dias), com peso médio de  $52,4 \pm 4,34$  g para o primeiro ensaio biológico, e  $60,0 \pm 3,51$  g para o segundo ensaio biológico, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP).

### 3.2 Dietas experimentais

As dietas foram elaboradas conforme o “American Institute of Nutrition” (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), AIN-93G (Tabela 2), com concentração de proteína bruta de 12 % (GOENA *et al*, 1989).

A caseína utilizada como fonte protéica era proveniente de M. Cassab, e continha 79,0 % de proteína bruta no primeiro ensaio biológico e 81,5 % no segundo ensaio biológico. O amido de milho era proveniente de Corn Products Brasil 3408; o amido dextrinizado de Corn Products Brasil 1910; a sacarose de União®; o óleo de soja era da marca Liza®; a fibra celulose microfibrilada Arbocel 1-290; a L-cistina Synth C1.027.01AE; o bitartarato de colina Sigma C162; o tertibutilidroquinona Sigma B9161; a mistura mineral (AIN-93G-MX) (Tabela 3) e a mistura vitamínica (AIN-93G-VX) (Tabela 4) eram aquelas preconizadas pelo “American Institute of Nutrition” para dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

**Tabela 2.** Composição da dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg</b>
Amido de milho	427,916* / 430,796**
Amido de milho dextrinizado	142,100* / 143,060**
Caseína (79,0 %* / 81,5 %**)	151,820* / 147,230**
Sacarose	107,650* / 108,370**
Óleo de soja	70,000
Fibra	50,000
Mistura mineral	35,000
Mistura vitamínica	10,000
L-cistina	3,000
Bitartarato de colina	2,500
Tert-butil hidroquinona	0,014

\* Primeiro ensaio biológico

\*\* Segundo ensaio biológico

**Tabela 3.** Mistura mineral AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg</b>
<b>Elementos minerais essenciais</b>	
Carbonato de cálcio anidro – 40,04 % Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico – 22,76 % P; 2873 % K	19,00
Cloreto de sódio – 39,34 % Na; 60,66 % Cl	74,00
Sulfato de potássio – 44,87 % K; 18,39 % S	46,60
Citrato de potássio, tri-K, monoidratado – 36,16 % K	70,78
Óxido de magnésio – 60,32 % Mg	24,00
Citrato férrico – 16,5 % Fé	6,06
Carbonato de zinco – 52,14 % Zn	1,65
Carbonato de manganês – 47,79 % Mn	0,63
Carbonato de cobre – 57,47 Cu	0,30
Iodeto de potássio – 59,3 % I	0,01
Selenito de sódio anidro – 41,79 % Se	0,01025
Paramolibidato de amônio, 4H <sub>2</sub> O – 54,34 % Mo	0,00795
<b>Elementos minerais potencialmente benéficos</b>	
Meta-silicato de sódio, 9H <sub>2</sub> O – 9,88 % Si	1,45
Sulfato de potássio crômico, 12H <sub>2</sub> O – 10,42 % Cr	0,275
Cloridrato de lítio – 16,38 % Li	0,0174
Ácido bórico – 17,5 % B	0,0815
Fluoreto de sódio – 45,24 % F	0,0635
Carbonato de níquel – 45 % Ni	0,0066
Vanadato de amônia – 43,55 % V	0,0318
Sacarose em pó (q.s.p.)	221,026

**Tabela 4.** Mistura vitamínica AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg</b>
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina – HCl	0,700
Tiamina – HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> ) (0,1 % em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- $\alpha$ -tocoferol (E) – 500 UI/g	15,00
Palmitato de all-trans-retinol (A) – 500.000 UI/g	0,800
Colicalciferol (D3) – 400.000 UI/g	0,250
Filoquinona (K)	0,075
Sacarose em pó (q.s.p.)	974,655

### 3.3 Suplementos

Os suplementos utilizados foram ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376) e as misturas comerciais de ácido linoléico conjugado 75 % AdvantEdge® CLA (EAS™, Golden/CO, USA) e CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 % 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients, Gurnee/IL, USA).

### **3.4 Ensaios biológicos**

#### **3.4.1 Acompanhamento do consumo de dieta e ganho de peso dos animais**

Durante o primeiro e segundo ensaios biológicos a avaliação do consumo de dieta e água, assim como a verificação do ganho de peso dos animais foi realizada a cada dois dias.

#### **3.4.2 Condições experimentais**

Foram utilizados 40 e 30 ratos Wistar para o primeiro e o segundo ensaios biológicos, respectivamente. Os animais foram mantidos em gaiolas de aço inox individuais de crescimento, com água e alimentação sob o sistema de livre acesso durante todo o experimento. A temperatura e umidade relativa permaneceram em uma faixa de  $22 \pm 1$  °C e 60 - 70% respectivamente e com ciclo claro/escuro de 12 horas (Figura 4).





**Figura 4.** Gaiolas individuais de crescimento de acordo com as condições experimentais/Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Alimentos e Nutrição da UNICAMP.

Após um período de 7 dias de adaptação às condições do ensaio, os ratos tanto do primeiro como do segundo ensaio biológico, foram divididos aleatoriamente objetivando a homogeneidade de peso corporal tanto intra quanto intergrupo. No primeiro ensaio biológico, os ratos foram divididos em 4 grupos com 10 animais cada, permanecendo por mais 21 dias em experimentação. No segundo ensaio biológico, os ratos foram divididos em 3 grupos com 10 animais cada e permaneceram por sua vez, mais 42 dias em experimentação.

Durante todo o período experimental, os animais foram suplementados por meio de entubação orogástrica utilizando seringas descartáveis de 1 mL e agulhas de gavagem. A quantidade de suplemento administrada era calculada a cada dois dias com base no consumo médio diário de dieta de cada grupo. Sendo assim, a suplementação acompanhou a ingestão de dieta normal dos ratos. Levou-se em consideração a densidade de cada suplemento para o cálculo da quantidade em mililitros, que variou de 0,11 a 0,58 mL no primeiro experimento e de

0,25 a 0,49 mL no segundo experimento. Os suplementos eram aspirados pela seringa e mantidos ao abrigo da luz até o momento da administração. Os ratos eram retirados grupo a grupo da sala de experimentação, acondicionados em caixas plásticas e levados a sala em que eram suplementados. Este procedimento ocorria diariamente as 14:00 horas, visto que os roedores possuem hábitos noturnos e neste horário eles estavam menos saciados (Figura 5).



**Figura 5.** Entubação orogástrica utilizando seringas descartáveis de 1 mL e agulhas de gavagem.

### **3.4.3 Primeiro ensaio biológico**

Com este primeiro ensaio biológico procurava-se identificar qual a quantidade de suplemento mais adequada para reduzir estatisticamente a gordura corporal dos ratos. O suplemento administrado foi escolhido com vista na facilidade de sua aquisição no mercado local. As quantidades foram escolhidas levando-se em consideração a amplitude dos valores utilizados na literatura. Dessa maneira, os grupos foram nomeados de acordo com a quantidade de suplemento administrada:

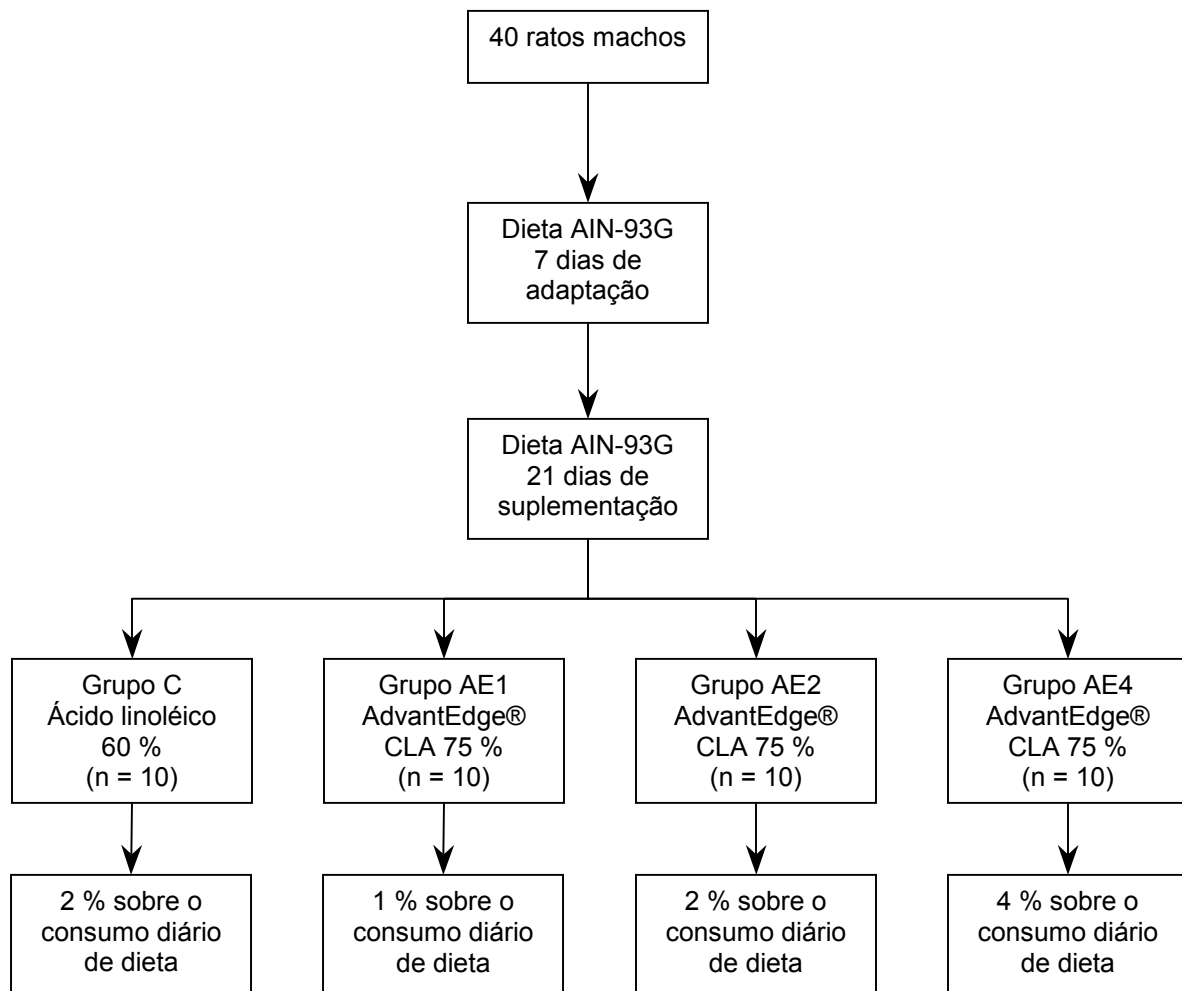
**Grupo C (Controle):** Suplementação com **2%** em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376).

**Grupo AE1:** Suplementação com **1%** em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado **AdvantEdge® CLA 75 % (EAS™)**.

**Grupo AE2:** Suplementação com **2%** em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado **AdvantEdge® CLA 75 % (EAS™)**.

**Grupo AE4:** Suplementação com **4%** em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado **AdvantEdge® CLA 75 % (EAS™)**.

Neste primeiro ensaio foram realizadas as determinações de triacilgliceróis e colesterol total séricos e da composição corporal centesimal dos ratos (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema do delineamento experimental do primeiro ensaio biológico

#### 3.4.4 Segundo ensaio biológico

A quantidade de suplemento utilizada neste segundo ensaio biológico foi escolhida com base nos resultados obtidos no primeiro ensaio. Utilizou-se como critério de escolha a redução da massa gorda estatisticamente significante aliada à viabilidade econômica e operacional.

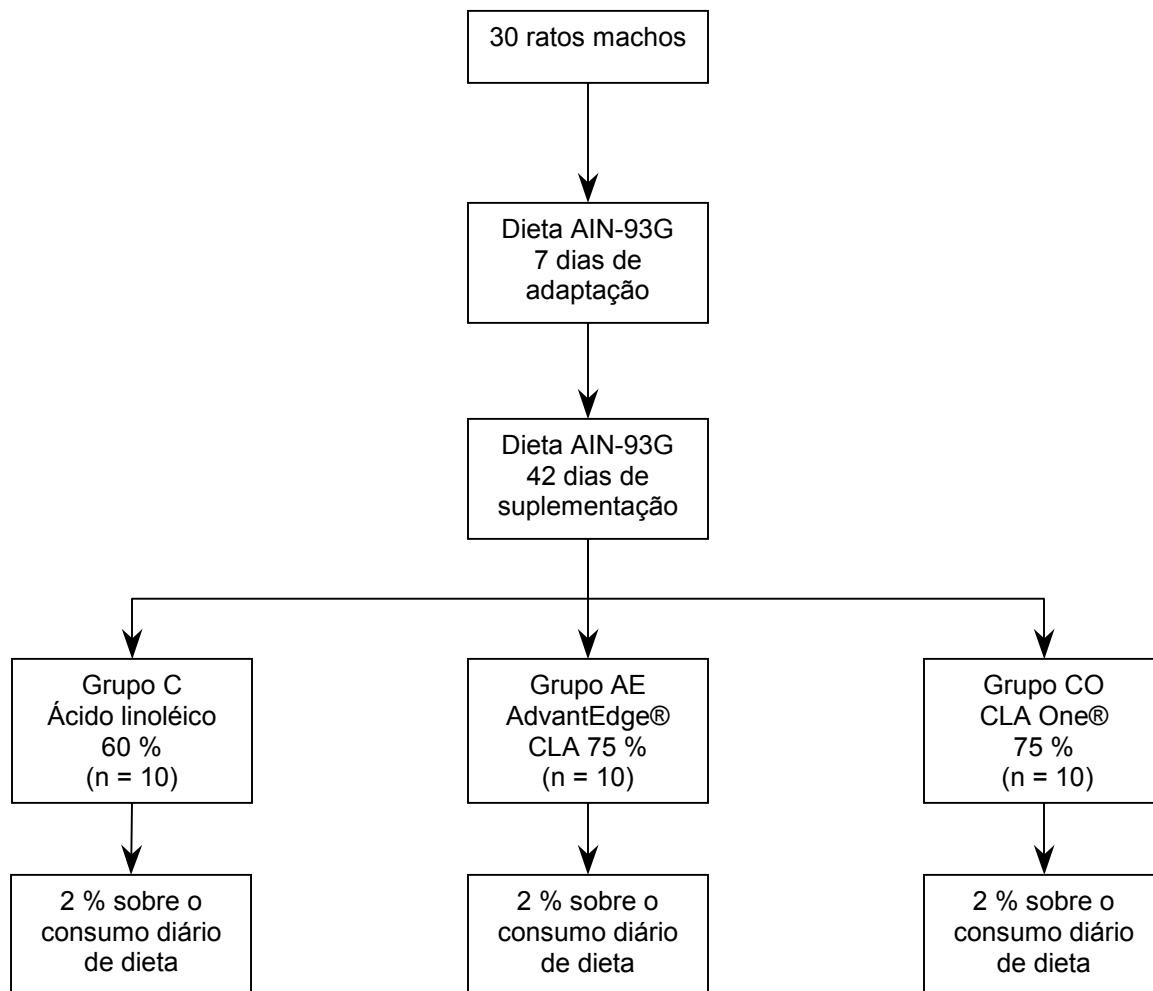
Pelo fato da quantidade de suplemento escolhida ser a mesma para todos os grupos neste segundo ensaio biológico, os mesmos foram nomeados referindo-se apenas à marca do suplemento administrado:

**Grupo C (Controle):** Suplementação com 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376).

**Grupo AE:** Suplementação com 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado **AdvantEdge®** CLA 75 % (EAS™).

**Grupo CO:** Suplementação com 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado **CLA One®** Free Fatty Acid Oil 75 % 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients).

Neste segundo ensaio foram realizadas as determinações de triacilgliceróis e colesterol total séricos, composição corporal centesimal e leptina sérica (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema do delineamento experimental do segundo ensaio biológico.

### 3.4.5 Obtenção do soro do sangue dos animais para a determinação do perfil lipídico

O sangue dos animais foi coletado sob anestesia (pentobarbital sódico – 46 mg/kg, Hypnol 3 %), por meio de punção cardíaca, após jejum de 12 horas ao final de cada experimento. As amostras de sangue foram coletadas com seringas de 10 mL e escoadas suavemente sem a agulha pela parede dos tubos de polietileno sem anticoagulante previamente identificados. Os tubos repousaram em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em

seguida, foram centrifugados (Centrífuga Excelsa® II modelo 206 MP – FANEM) a 3000 rpm por 10 minutos (adaptado de CARVALHO, 1999). Posteriormente, o soro sobrenadante foi separado, utilizando-se uma pipeta e armazenado em micro tubos de polipropileno em Freezer Ultra Low – REVCO a - 80 °C até o momento das análises.

#### **3.4.6 Preparo da carcaça dos animais para a determinação da composição corporal centesimal**

Após a exsanguinação sob anestesia os animais foram mortos por deslocamento cervical e todo o trato gastrointestinal foi retirado, limpo com soro fisiológico e devolvido à carcaça. Em seguida, esta foi congelada em nitrogênio líquido, fatiada, liofilizada, batida em liquidificador industrial por 7 minutos, moída em micromoinho por 40 segundos para a obtenção da homogeneidade da amostra e armazenada em frascos de vidro identificados em Freezer Ultra Low – REVCO a - 80 °C (Figura 8).

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – IB/UNICAMP) – Protocolo nº 564-1 (Anexo 1).



**Figura 8.** Amostra homogeneizada do rato utilizada para as determinações analíticas.

### **3.5 Métodos analíticos**

#### **3.5.1 Determinação da composição centesimal das dietas experimentais**

As análises de umidade, proteína total e cinzas das dietas experimentais foram realizadas segundo os métodos 930.15, 942.05 e 954.01 respectivamente, descritos pela Association of Official Analytical Chemists (1995). Utilizou-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína. Os lípidos totais foram determinados por Bligh e Dyer (1959).



### **3.5.2 Determinação dos perfis de ácidos graxos do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado**

A metilação foi realizada segundo o método de Christie (1982). Cerca de 50 mg de cada amostra foram pesados em tubos de extração graduados com fundo cônico. Em seguida foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico metanólico a 1 %. Os tubos foram tampados e agitados em agitador elétrico por 1 minuto. Após esta etapa, os tubos permaneceram em banho-maria com agitação a 50 °C por 2 horas. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de cloreto de sódio a 5 %, seguido de agitação por 1 minuto. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de hexano e novamente os tubos foram agitados por 30 segundos. O sobrenadante (hexano e metil éster), foi transferido para outro tubo de extração e a ele foram acrescentados 4 mL de bicarbonato de potássio a 5 %. Os tubos foram agitados em agitador elétrico por 1 minuto e a separação das fases ocorreu rapidamente. Este novo sobrenadante foi transferido para um outro tubo de extração contendo 1 g de sulfato de sódio. O hexano presente foi evaporado com a utilização de fluxo de nitrogênio em banho-maria a 40 °C. Ao final, foram adicionados 2 mL de hexano e a solução transferida para um vial de cromatografia devidamente identificado e armazenado a - 20 °C.

O perfil dos ácidos graxos foi determinado por meio de cromatografia gasosa utilizando coluna capilar de sílica fundida, CP SIL 88 (0,25 mm x 0,2 µm x 100 m) e detector de ionização de chama (FID). Foi utilizado um gradiente de temperatura no qual a temperatura inicial foi de 70 °C por 4 minutos, seguida de um aumento de 13 °C/minuto até atingir 175 °C, permanecendo nesta temperatura durante 27 minutos, seguida de um acréscimo de 4 °C/minuto até 215 °C por 11 minutos com novamente um aumento de 4 °C/minuto até 240 °C durante 4 minutos, totalizando 70 minutos de corrida. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 300 °C, respectivamente. A injeção foi no modo “split”, com relação 50:1. O gás

de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de 1,8 mL/minuto e 36,3 psi de pressão na cabeça da coluna (MEDEIROS, 2002).

Os resultados foram expressos em porcentagem do total de ácidos graxos. Como padrão, foi usado o CRM-164 (Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Bruxelas, Bélgica), que tem valores certificados para 11 ácidos graxos, utilizados para estabelecer os fatores de correção para cada um dos ácidos graxos certificados que foram usados para transformar o pico expresso em porcentagem de área para massa (mg/g ácidos graxos totais).

### **3.5.3 Determinação dos triacilgliceróis e colesterol total séricos**

As análises de triacilgliceróis e colesterol total do soro foram feitas 12 horas após a coleta utilizando-se kits enzimáticos comerciais Labtest Diagnóstica, códigos GPO-ANA-CAT. 59 e COD-ANA-CAT. 60, respectivamente.

Na determinação dos triacilgliceróis, o glicerol liberado na hidrólise dos triacilgliceróis, catalizada pela enzima lípase lipoprotéica é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado pela glicerolfosfato oxidase a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio acopla-se a 4-aminoantipirina e ao n-etil n-sulfopropil n-anisidina (ESPAS) produzindo quinoneimina, que tem absorvidade máxima em 540 nm. As análises foram feitas em triplicata, adicionando-se 1 mL de reagente de cor a 10 µL de soro, incubando-se em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, sendo que uma concentração de triacilglicerol de 200 mg/dL foi usada como padrão. A absorbância dos testes e do padrão foi lida em luz visível no comprimento de onda de 540 nm, em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU – 70), acertando o zero com o branco .

Na determinação do colesterol total, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase formando colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase resultando em colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Este, na presença da peroxidase, oxida o fenol e a 4 aminoantipirina formando a antipirilquinonimina, que tem absorvidade máxima em 500 nm. As análises foram feitas em triplicata, adicionando-se 1 mL de reagente de cor a 10 µL de soro, incubando-se em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, sendo que uma concentração de colesterol de 200 mg/dL foi usada como padrão. A absorbância dos testes e do padrão foi lida em luz visível no comprimento de onda de 500 nm, em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU – 70), acertando o zero com o branco.

### **3.5.4 Determinação da composição corporal centesimal dos animais liofilizados**

#### **3.5.4.1 Proteína bruta**

O nitrogênio total dos animais liofilizados foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1995). A matéria orgânica total foi digerida sob aquecimento com ácido sulfúrico, na presença de mistura catalisadora composta de sulfato de cobre pentahidratado e sulfato de potássio anidro (1:19) até que carbono, hidrogênio e enxofre fossem oxidados. O nitrogênio da proteína foi reduzido e transformado em sulfato de amônia.

Cerca de 100 mg de amostra foram digeridas por aproximadamente 8 horas a 350 °C. Foi utilizado 6,25 como fator de conversão de nitrogênio para a proteína dos animais.

#### **3.5.4.2 Umidade**

Cerca de 2 g de amostra foram pesados em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. As amostras eram levadas à estufa a 105 °C por 16 horas e em seguida colocadas em dessecador para esfriar. Depois de frio, o conjunto cadinho mais amostra seca era pesado em balança analítica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Para a conversão dos valores de base seca para base úmida, os sólidos totais foram calculados pela diferença entre o peso total da carcaça antes da liofilização e o conteúdo de água perdido neste processo.

#### **3.5.4.3 Cinzas**

Para esta determinação foram utilizados cerca de 2 g de amostra que foram previamente carbonizadas em chama e a calcificação feita em mufla a 600 °C por 5 horas (AOAC, 1995).

#### **3.5.4.4 Extrato etéreo**

Para a determinação do extrato etéreo dos animais liofilizados, foram utilizados cerca de 2 g de amostra seca, o que correspondia a aproximadamente 7,5 g de amostra úmida e éter de petróleo. Utilizou-se temperatura de 55 °C e 6 horas de extração contínua em banho-maria (LEES, 1979).

### **3.5.5 Determinação da leptina sérica**

Na determinação da leptina sérica foi utilizado kit de radioimunoensaio Rat Leptin Ria Kit RL-83K (Linco Research, Saint Charles/Missouri, USA). Neste método, uma concentração fixa e conhecida do anticorpo de leptina de rato é incubada ao iodo marcado ( $^{125}\text{I}$ ) de modo que concentração de iodo ligado aos sítios de ligação do anticorpo seja limitada. Sendo assim, quando um anticorpo desconhecido (soro) é adicionado ao sistema, ocorre uma competição entre os anticorpos pela ligação com o iodo. Dessa maneira, quanto mais iodo marcado estiver ligado ao anticorpo conhecido, menos leptina está presente na amostra. Este ensaio foi realizado em três dias, sendo que no primeiro 100  $\mu\text{L}$  de soro foram adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo de leptina de rato e a 100  $\mu\text{L}$  de tampão. O sistema foi homogeneizado e encubado por 24 horas em temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de iodo marcado e novamente o sistema foi homogeneizado e permaneceu repousando em temperatura ambiente por 24 horas. Na etapa final, 1 mL de reagente precipitante foi adicionado, seguido de centrifugação por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pelete formado no fundo do tubo de polipropileno foi lido em contador gama. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de leptina/mL de soro.

### **3.6 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida de teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %. A determinação do grau de associação entre a ingestão do isômero trans-10, cis-12 referente a todo período de suplementação do primeiro e segundo ensaios e a redução da massa gorda, assim como dos valores de leptina e da massa gorda, foi

obtida pela correlação linear de Pearson. Foi considerada a influência conjunta das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, e as suas forças foram classificadas segundo Levin (1978), considerando-se, no mínimo, coeficientes moderados de correlação, positivos e negativos, com  $r$  entre 0,5 e 0,95 e entre -0,5 e -0,95, respectivamente (SNEDECOR, 1948). O programa utilizado para a análise foi o “Statistical Analysis System” (SAS) (1993).

## 4 RESULTADOS

#### 4.1 Composição centesimal das dietas experimentais

Os resultados da determinação da composição centesimal das dietas experimentais do primeiro e segundo ensaios biológicos, respectivamente, estão expressos na Tabela 5. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre a composição das dietas consumidas pelos animais em ambos os experimentos.

**Tabela 5.** Composição centesimal (g/100g) e valor energético (kcal/100g) das dietas experimentais AIN-93G.

Componente químico	Primeiro ensaio biológico	Segundo ensaio biológico
	AIN-93G	AIN-93G
Umidade	2,77 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,41 <sup>a</sup>
Proteína bruta	12,29 ± 0,29 <sup>a</sup>	12,39 ± 0,31 <sup>a</sup>
Lípides totais	7,15 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,11 ± 0,09 <sup>a</sup>
Cinzas	2,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,06 <sup>a</sup>
Carboidratos*	75,06 <sup>a</sup>	74,79 <sup>a</sup>
Valor energético**	413,75 <sup>a</sup>	412,71 <sup>a</sup>

\* Determinação de carboidratos feita por diferença.

\*\* Calculado pela soma: (proteína bruta x 4) + (lípides totais x 9) + (carboidratos x 4).

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao teste de Tukey.



#### **4.2 Caracterização dos perfis de ácidos graxos do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado**

A composição dos ácidos graxos dos suplementos de ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376) e das misturas comerciais de ácido linoléico conjugado 75 % AdvantEdge® CLA (EAS™) e CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 % 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients), expressos em g/100 g de ácidos graxos, podem ser visualizados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Composição dos ácidos graxos (g/100 g) do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado.

Ácidos graxos	Ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376)	Ácido linoléico conjugado 75 % AdvantEdge® CLA (EAS™)	CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 % 1CLA1- FFBL-KG (Pharmanutrients)
g/100 g de ácidos graxos			
C8:0	-	0,02	0,06
C10:1	-	0,01	-
C12:0	-	0,01	-
C14:0	0,13	-	-
C16:0 iso	0,02	-	-
C16:0	2,89	2,15	3,86
C16:1 cis-9	0,17	0,01	-
C17:0	0,04	0,03	-
C17:1	0,07	0,01	-
C18:0	0,80	2,96	1,91
C18:1 cis-9	25,90	13,23	16,86
C18:1 cis-11	2,06	1,04	0,94
<b>C18:2 cis-9, cis-12</b>	<b>59,64</b>	<b>0,75</b>	<b>0,93</b>
<b>C18:2 cis-9, trans-11 CLA</b>	<b>0,09</b>	<b>40,12</b>	<b>36,81</b>
<b>C18:2 trans-10, cis-12 CLA</b>	<b>0,08</b>	<b>39,15</b>	<b>36,27</b>
C18:2 cis-11 trans-13 CLA	-	-	1,44
C18:2 trans-11 cis-15	0,82	0,21	0,47
C18:3	-	0,06	0,13
C20:0	1,01	-	-
C20:1	-	0,06	0,13
C20:2	6,18	0,01	-
C20:3	-	0,04	-
C20:4	0,01	-	-
C20:5	0,01	0,02	0,03
C22:0	-	0,04	0,07
Total	100,00	100,00	100,00

### 4.3 Primeiro ensaio biológico

#### 4.3.1 Consumo de dieta e ganho de peso dos animais

Na Tabela 7, estão expressas as médias do consumo de dieta por grupo (g), o ganho de peso médio dos ratos (g) e a eficiência alimentar, respectivamente, durante os 21 dias do primeiro ensaio biológico. Observa-se que apenas o grupo AE1 apresentou valor estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos demais grupos para o consumo de dieta e, no entanto, não diferiu quanto à eficiência alimentar.

**Tabela 7.** Valores médios  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 10$ ) do consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos controle e experimentais no primeiro ensaio biológico (21 dias).

Grupos	Consumo (g)	Ganho de peso (g)	Eficiência Alimentar
C	241,4 $\pm$ 22,9 <sup>a</sup>	78,4 $\pm$ 16,1 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
AE1	285,6 $\pm$ 17,9 <sup>b</sup>	99,0 $\pm$ 8,4 <sup>b</sup>	0,35 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
AE2	243,0 $\pm$ 23,5 <sup>a</sup>	83,4 $\pm$ 13,0 <sup>a,b</sup>	0,35 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
AE4	230,0 $\pm$ 23,8 <sup>a</sup>	75,8 $\pm$ 17,7 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao teste de Tukey.

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

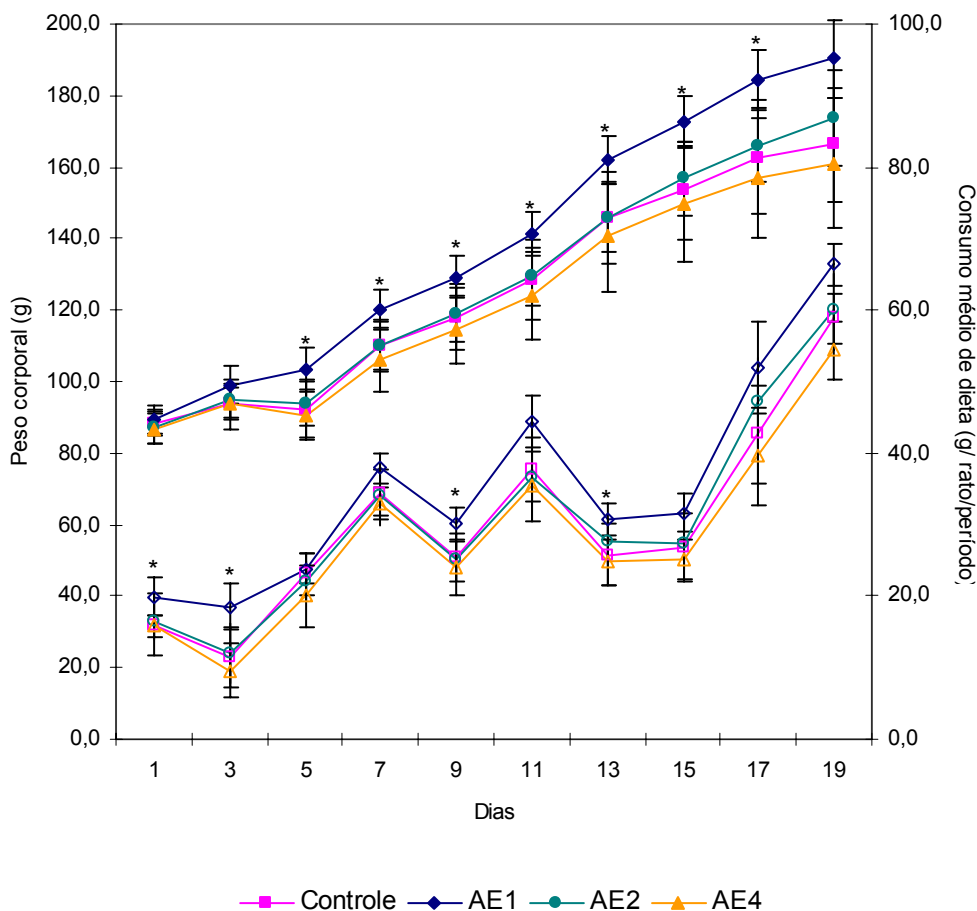
Grupo AE1: 1 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE2: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE4: 4 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Na Figura 9 estão apresentados o peso corporal médio (g) e o consumo médio de dieta (g) dos ratos dos grupos controle e experimentais a cada 2 dias de experimento, onde se verifica que em alguns intervalos, o grupo AE1 destacou-se em relação aos demais grupos ( $p \leq 0,05$ ). É possível observar na Figura 9, que embora o primeiro ensaio biológico tenha sido

realizado em 21 dias, o peso corporal, assim como o consumo de dieta foram apresentados apenas até o 19º dia de experimentação. Isto se deve pelo fato de que no vigésimo dia, a dieta foi retirada para que os ratos ficassem em jejum para coleta de sangue e, dessa maneira, os dados obtidos neste período não foram reais.



**Figura 9.** Peso corporal e consumo de dieta em gramas dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no primeiro ensaio biológico (21 dias).

Marcadores cheios indicam valores referentes ao peso médio (g).

Marcadores vazios indicam valores referentes ao consumo médio de dieta (g).

\* Asteriscos indicam diferença estatística para marcadores cheios ou vazios, do grupo AE1 em relação aos demais grupos segundo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE1: 1 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE2: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE4: 4 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

### 4.3.2 Perfil lipídico sérico

Os teores de triacilgliceróis e colesterol total séricos (mg/dL) do primeiro ensaio biológico estão apresentados na Tabela 8. No que diz respeito aos valores de triacilgliceróis, estes não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Quanto aos valores de colesterol total, apenas o grupo AE1 apresentou um teor superior ao grupo controle, ocorrendo uma redução dos valores à medida que aumentava a quantidade de CLA suplementada.

**Tabela 8.** Valores médios  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 10$ ) dos triacilgliceróis e colesterol total séricos dos grupos controle e experimentais no primeiro ensaio biológico (21 dias).

Grupos	Triacilgliceróis (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
C	116,25 $\pm$ 37,95 <sup>a</sup>	90,63 $\pm$ 7,85 <sup>a</sup>
AE1	118,76 $\pm$ 39,07 <sup>a</sup>	105,44 $\pm$ 11,24 <sup>b</sup>
AE2	117,65 $\pm$ 58,18 <sup>a</sup>	92,12 $\pm$ 13,31 <sup>a</sup>
AE4	97,08 $\pm$ 34,00 <sup>a</sup>	74,06 $\pm$ 6,44 <sup>c</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao teste de Tukey.

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE1: 1 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

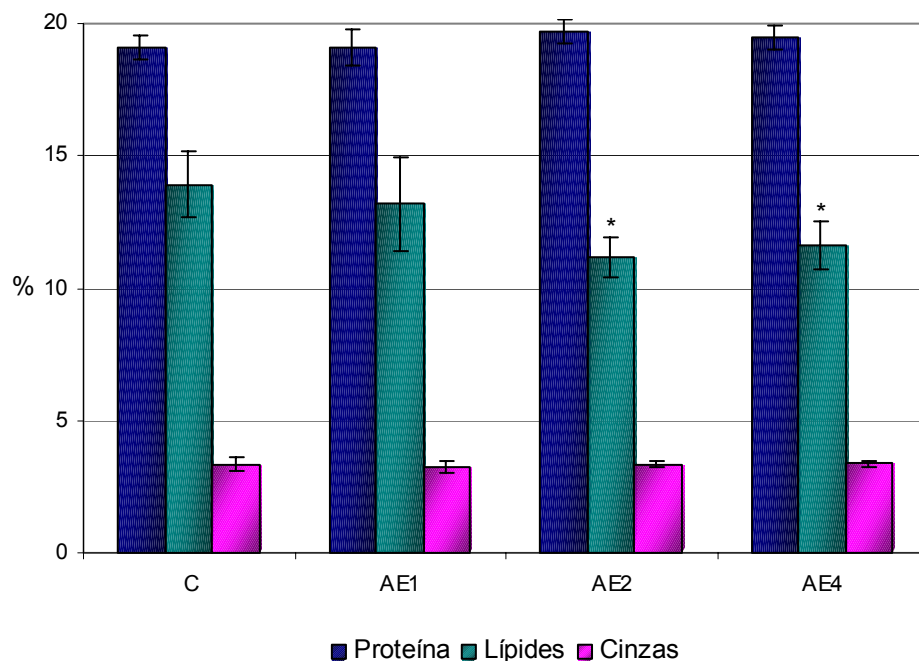
Grupo AE2: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE4: 4 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

### 4.3.3 Composição corporal centesimal

Na Figura 10 estão apresentados os valores de proteína, lípides e cinzas, correspondentes a composição corporal centesimal dos ratos do primeiro ensaio biológico. Nota-se que apenas os teores de lípides tiveram redução estatisticamente significativa

( $p < 0,05$ ) nos grupos que receberam 2 e 4 % de ácido linoléico conjugado sobre o consumo médio de dieta, em relação aos demais grupos. Verificou-se significativa correlação entre a crescente ingestão do isômero trans-10, cis-12 e a redução da massa gorda ( $r = - 0,54169$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 11).



**Figura 10.** Composição corporal centesimal em base úmida dos ratos do grupo controle e experimentais ( $n = 10$ ) no primeiro ensaio biológico (21 dias).

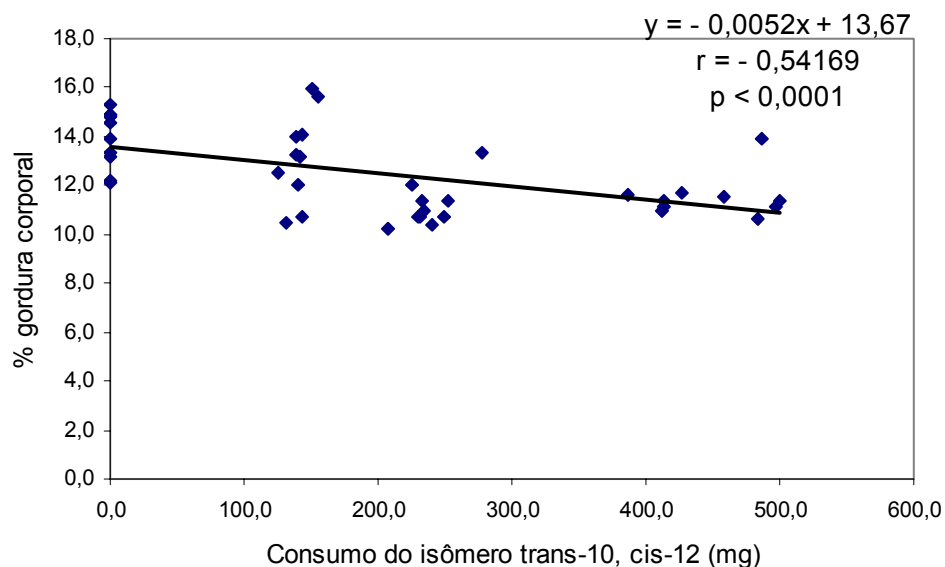
\* Asteriscos indicam diferença estatística para barras de mesma cor, em relação ao grupo controle segundo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE1: 1 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE2: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE4: 4 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.



**Figura 11.** Correlação entre a redução da gordura corporal (%) e o consumo do isômero trans-10, cis-12 (mg) dos ratos dos grupos controle e experimentais ( $n = 40$ ) no primeiro ensaio biológico (21 dias).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE1: 1 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE2: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo AE4: 4 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

#### 4.4 Segundo ensaio biológico

##### 4.4.1 Consumo de dieta e ganho de peso dos animais

Na Tabela 9, estão apresentadas as médias do consumo de dieta por grupo (g), o ganho de peso médio dos ratos (g) e a eficiência alimentar, respectivamente, durante os 42 dias do segundo ensaio biológico. Observa-se que apenas o grupo AE apresentou valor estatisticamente superior para o consumo de dieta ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos demais grupos, porém não diferiu quanto ao ganho de peso e à eficiência alimentar.

**Tabela 9.** Valores médios  $\pm$  desvio-padrão (n = 10) do consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos controle e experimentais no segundo ensaio biológico (42 dias).

Grupos	Consumo (g)	Ganho de peso (g)	Eficiência Alimentar
C	631,2 $\pm$ 48,7 <sup>a</sup>	192,5 $\pm$ 27,2 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
AE	645,7 $\pm$ 27,6 <sup>b</sup>	203,5 $\pm$ 17,9 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
CO	621,9 $\pm$ 30,9 <sup>a</sup>	187,0 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao teste de Tukey.

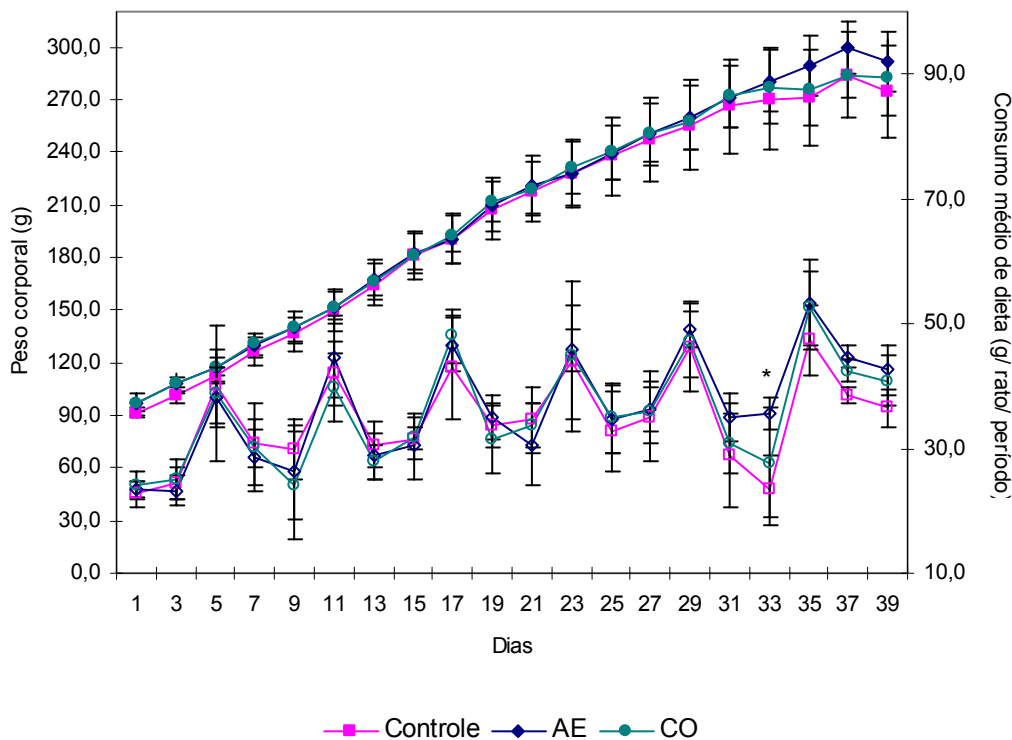
Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.

Na Figura 12 estão apresentados o peso corporal médio (g) e o consumo médio de dieta (g) dos ratos dos grupos controle e experimentais a cada 2 dias de experimento, onde se observa que o grupo AE apresentou consumo médio de dieta superior aos demais em um único período ( $p \leq 0,05$ ). Apesar do segundo ensaio biológico ter sido realizado em 42 dias, o peso corporal, assim como o consumo de dieta foram apresentados apenas até o 39º dia de experimentação. Isto se deve pelo fato de que no quadragésimo primeiro dia, a dieta foi retirada para que os ratos ficassem em jejum para coleta de sangue e, dessa maneira, os dados obtidos neste período não foram reais (Figura 12).





**Figura 12.** Peso corporal e consumo de dieta em gramas dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no segundo ensaio biológico (42 dias).

Marcadores cheios indicam valores referentes ao peso médio (g).

Marcadores vazios indicam valores referentes ao consumo médio de dieta (g).

\* Asteriscos indicam diferença estatística para marcadores cheios ou vazios, do grupo AE1 em relação aos demais grupos segundo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.

#### 4.4.2 Perfil lipídico sérico

Os teores de triacilgliceróis e colesterol total séricos (mg/dL) do segundo ensaio biológico podem ser visualizados na Tabela 10. Com relação aos valores de triacilgliceróis, estes não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), assim como foi

observado no primeiro ensaio biológico. No que diz respeito aos valores de colesterol total, os grupos experimentais AE e CO, suplementados com ácido linoléico conjugado, demonstraram teores superiores ao grupo controle.

**Tabela 10.** Valores médios  $\pm$  desvio-padrão (n = 10) dos triacilgliceróis e colesterol total séricos dos grupos controle e experimentais no segundo ensaio biológico (42 dias).

Grupos	Triacilgliceróis (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
C	142,95 $\pm$ 27,55 <sup>a</sup>	93,67 $\pm$ 19,82 <sup>a</sup>
AE	152,89 $\pm$ 44,53 <sup>a</sup>	108,49 $\pm$ 8,94 <sup>b</sup>
CO	168,39 $\pm$ 39,88 <sup>a</sup>	115,12 $\pm$ 7,63 <sup>b</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao teste de Tukey.

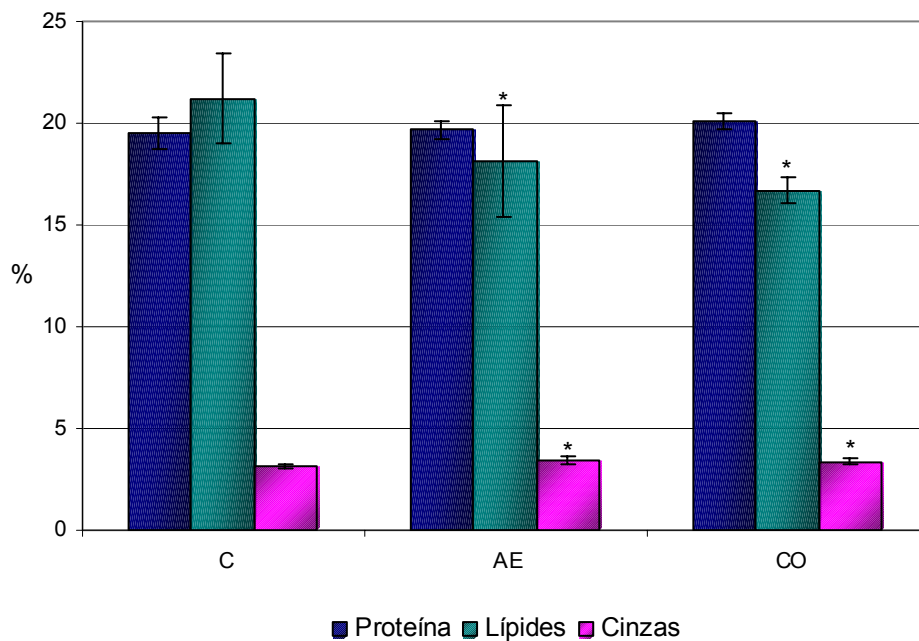
Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.

#### 4.4.3 Composição corporal centesimal

A composição corporal centesimal dos ratos do segundo ensaio biológico está apresentada na Figura 13. Pode-se observar que os grupos experimentais, AE e CO, apresentaram uma redução dos teores de lípides e um aumento dos teores de cinzas estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Nota-se uma correlação significativa entre o consumo do isômero trans-10, cis-12 e a diminuição da gordura corporal ( $r = -0,65929$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 14).



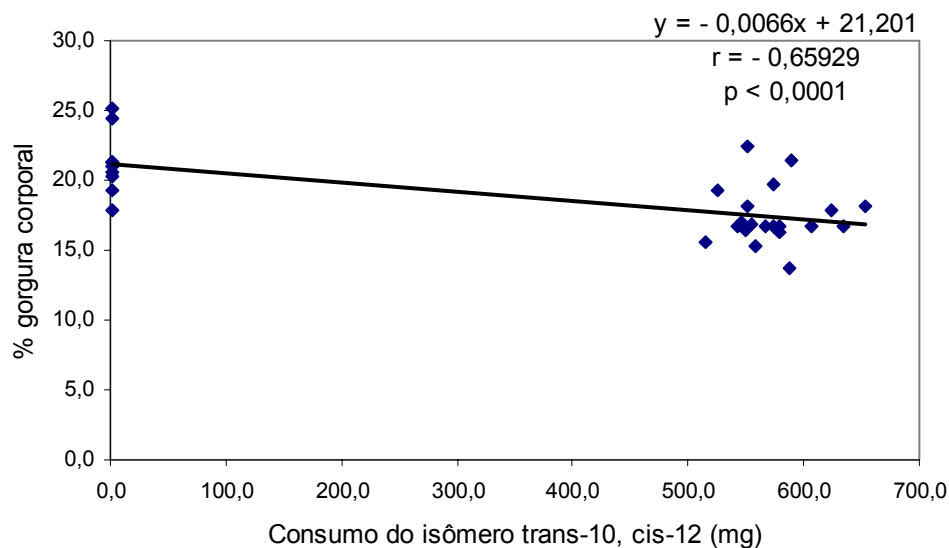
**Figura 13.** Composição corporal centesimal em base úmida dos ratos do grupo controle e experimentais (n = 10) no segundo ensaio biológico (42 dias).

\* Asteriscos indicam diferença estatística para barras de mesma cor, em relação ao grupo controle segundo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.



**Figura 14.** Correlação entre a redução da gordura corporal (%) e o consumo do isômero trans-10, cis-12 (mg) dos ratos dos grupos controle e experimentais (n = 30) no segundo ensaio biológico (42 dias).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.

#### 4.4.4 Concentração de leptina sérica

Na Tabela 11 estão apresentados os valores da concentração sérica de leptina (ng/mL) dos ratos do segundo ensaio biológico. Verifica-se que os grupos AE e CO obtiveram concentrações inferiores em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). Foi constatada uma correlação positiva moderada entre os valores de leptina sérica e os teores de gordura corporal ( $r = 0,74672$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 15).

**Tabela 11.** Valores médios  $\pm$  desvio-padrão (n = 10) de leptina sérica dos grupos controle e experimentais no segundo ensaio biológico (42 dias).

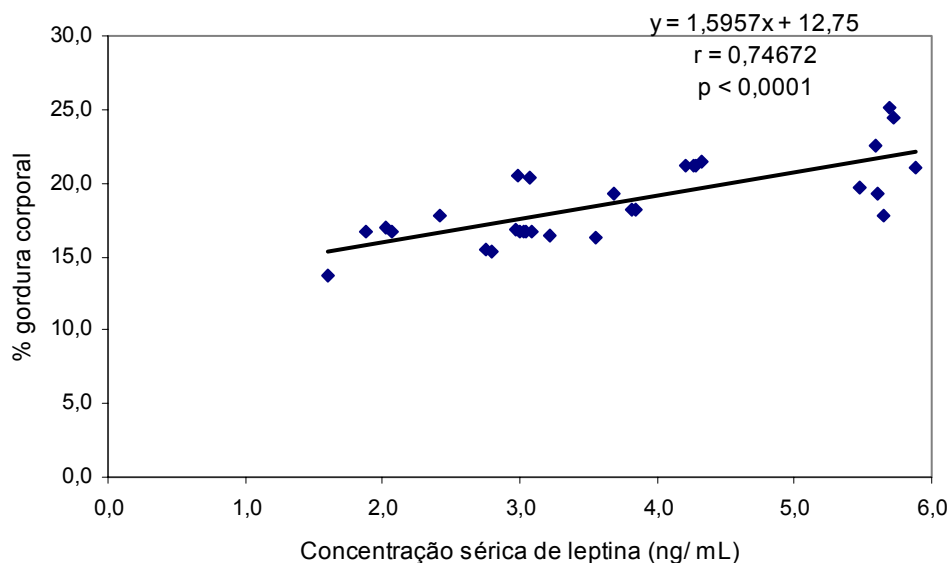
Grupos	Leptina (ng/mL)
C	4,21 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
AE	3,45 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>
CO	3,08 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao teste de Tukey.

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.



**Figura 15.** Correlação entre o aumento da gordura corporal (%) e a concentração sérica de leptina (ng/mL) dos ratos dos grupos controle e experimentais (n = 30) no segundo ensaio biológico (42 dias).

Grupo C (Controle): 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico 60 %.

Grupo AE: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado AdvantEdge® CLA 75 %.

Grupo CO: 2 % em relação ao consumo médio diário de dieta de ácido linoléico conjugado CLA One® Free Fatty Acid Oil 75 %.

## **5 DISCUSSÃO**

## 5.1 Composição centesimal das dietas experimentais

A composição centesimal das dietas AIN-93G utilizadas no primeiro e segundo ensaios biológicos não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), sendo consideradas isoenergéticas e isoprotéicas (Tabela 5). Dessa maneira, as diferenças entre os resultados obtidos neste estudo foram decorrentes das suplementações com ácido linoléico ou com ácido linoléico conjugado.

## 5.2 Caracterização dos perfis de ácidos graxos do ácido linoléico e das misturas de ácido linoléico conjugado

A composição dos ácidos graxos presentes nos suplementos de ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376) e das misturas comerciais de ácido linoléico conjugado 75 % AdvantEdge® CLA (EAS™) e CLA One® Free Fatty Acid Oil 75% 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients), determinada por meio de cromatografia gasosa está coerente com as quantidades indicadas pelos fabricantes. O conteúdo dos isômeros predominantes presentes nas misturas foi de **40,12 %** e **36,81 %** para o isômero cis-9, trans-11 e de **39,15 %** e **36,27 %** para o isômero trans-10, cis-12, nas misturas de ácido linoléico conjugado 75% AdvantEdge® CLA (EAS™) e CLA One® Free Fatty Acid Oil 75% 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients), respectivamente (Tabela 6).

### 5.3 Consumo de dieta e ganho de peso dos animais

De acordo com os resultados obtidos no primeiro ensaio biológico, com 21 dias de experimento, o grupo AE1 apresentou maior consumo de dieta (g) em relação aos demais e maior ganho de peso (g) em relação aos grupos controle e AE4 ( $p \leq 0,05$ ), mas, no entanto, a eficiência alimentar [ganho de peso (g)/consumo de dieta (g)] não diferiu entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Isto demonstra que embora o grupo AE1 tenha apresentado maior consumo de dieta, seu aproveitamento foi igual aos outros grupos (Tabela 7). Com relação ao segundo ensaio biológico, com 42 dias de experimento, apenas o grupo AE apresentou consumo de dieta (g) estatisticamente superior ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos demais grupos, porém não diferiu quanto ao ganho de peso (g) e à eficiência alimentar (Tabela 9). Estes resultados sugerem a possibilidade do efeito do CLA por meio da alteração do metabolismo lipídico. Sabe-se que estes animais estavam em fase de crescimento, caracterizada por hiperplasia do tecido adiposo (PARIZA; PARK; COOK, 2000). Dessa forma, a ação do CLA na atividade das enzimas lipogênicas lipase lipoprotéica, acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase pode ter sido suficiente para igualar o ganho de peso destes animais, mesmo com um consumo de dieta superior aos demais grupos. Vale ressaltar, que a mistura de ácido linoléico conjugado administrada a este grupo, AdvantEdge® CLA (EAS™), contém maior teor do isômero trans-10, cis-12 (39,15 %) em relação à outra mistura (36,27 %), e que este isômero está particularmente envolvido na alteração da composição corporal (PARK *et al.*, 1999).

No que se refere ao peso corporal médio (g) e consumo médio de dieta (g) monitorados a cada 2 dias ao longo do experimento, dos ratos dos grupos controle e experimentais, no primeiro ensaio biológico, nota-se que em alguns períodos, o grupo AE1 apresentou valores superiores ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos demais grupos. O mesmo pôde ser



observado no segundo ensaio biológico, para apenas um período de consumo médio de dieta (g) do grupo AE em relação aos outros grupos (Figuras 9 e 12, respectivamente). Estudos têm demonstrado que pequenas variações no consumo de dieta não afetam de forma significativa a composição corporal final dos animais (PARK *et al.*, 1997).

#### 5.4 Perfil lipídico sérico

Os teores de triacilgliceróis séricos (mg/dL) apresentados nas Tabelas 8 e 10 referentes aos resultados obtidos no primeiro e segundo ensaios biológicos, respectivamente, não apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Da mesma maneira, Azain e outros (2000) não observaram diferenças nos teores de triacilgliceróis séricos em ratos Spargue-Dawley suplementados com 0,25 e 0,5 % de CLA durante 5 semanas. Corroborando com estes resultados, ratas Wistar alimentadas com 2,5 % de uma mistura de CLA por 2 semanas não apresentaram alterações nos valores de triacilgliceróis (HAYASHI, 2003).

Os resultados obtidos em ambos os ensaios biológicos, com relação aos teores de triacilgliceróis, podem ser explicados pelo efeito da suplementação com CLA. Ao considerar que a lipase lipoprotéica age clivando os triacilgliceróis das lipoproteínas circulantes, e que o consumo dietético de CLA seria capaz de diminuir a atividade desta enzima (PARK *et al.*, 1997), a suplementação com CLA possivelmente proporcionou uma menor clivagem dos triacilgliceróis, fazendo com que estes permanecessem nas lipoproteínas circulantes (PARIZA; PARK; COOK, 2001).

No tocante aos teores de colesterol total (mg/dL) no primeiro ensaio biológico, apenas o grupo AE1 apresentou valor superior ao grupo controle, ocorrendo uma redução destes valores à medida que aumentava a quantidade de CLA suplementada. Em contrapartida,

no segundo ensaio biológico houve um aumento dos teores de colesterol total (mg/dL) dos grupos experimentais, AE e CO, em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que durante um curto período de suplementação, como 21 dias, o CLA parece exercer um efeito dose dependente, entretanto, com 42 dias de suplementação, o CLA desempenhou um efeito negativo, mesmo na concentração de 2 % sobre o consumo médio de dieta.

Vale destacar que grande parte dos estudos que procuram investigar a ação do CLA sobre o perfil lipídico, utilizam modelos experimentais e dietas pró-aterogênicos. Dessa maneira, o efeito da suplementação torna-se mais evidente, como o estudo realizado por Lee, Kritchevsky e Pariza (1994), em que coelhos suplementados com CLA (0,5 g/coelho/dia) adicionado a uma dieta hipercolesterolêmica por 22 semanas, tiveram redução significativa ( $p < 0,02$ ) da fração LDL colesterol, quando comparados ao grupo controle. Todavia, camundongos C57BL/6, que quando alimentados com dieta aterogênica desenvolveram lesões na camada íntima da aorta em apenas 15 semanas, consumindo dieta aterogênica não mostraram diminuição dos triacilgliceróis e colesterol total séricos quando alimentados com 2,5 g de CLA/kg de dieta durante 15 semanas (MUNDAY; THOMPSON; JAMES, 1999). Resultados similares foram apresentados por Benito e colaboradores (2001), quando humanos suplementados com 3,9 g de CLA por dia não tiveram seus níveis de triacilgliceróis e colesterol séricos diminuídos após 63 dias de experimento.

### **5.5 Composição corporal centesimal**

Os resultados da determinação da composição corporal centesimal dos animais do primeiro ensaio biológico (Figura 10), mostraram que os grupos AE2 e AE4 apresentaram teores de gordura corporal de  $11,17 \pm 0,79$  % e  $11,62 \pm 0,93$  % respectivamente, e que o grupo

controle apresentou  $13,90 \pm 1,23$  %. Esta diferença corresponde a uma redução média de 18,0 % da gordura corporal dos grupos que foram suplementados com 2 % e 4 % de CLA, sobre o consumo médio diário de dieta. Estes resultados foram confirmados no segundo ensaio biológico, no qual o grupo controle apresentou teores de gordura corporal de  $21,22 \pm 2,67$  % e os grupos AE e CO apresentaram  $18,14 \pm 3,07$  % e  $16,68 \pm 0,80$  %, respectivamente (Figura 13). Novamente, esta diferença representou uma redução média de 18,0 % da gordura corporal dos grupos que receberam CLA. Estes dados são similares aos resultados obtidos por Delany e outros (1999) que relataram uma redução de 30 % da gordura corporal de camundongos após a suplementação com CLA por 39 dias. Mais recentemente, Azain e colaboradores (2000) também observaram redução de 13 a 30 % da gordura retroperitoneal em ratas suplementadas com CLA por 35 dias. Outros trabalhos relataram reduções mais expressivas da gordura corporal, como o estudo realizado por Park e outros (1997), em que camundongos apresentaram uma redução de 60 % da gordura corporal quando suplementados com 0,5 % de CLA durante 32 dias. Vale ressaltar que os modelos experimentais utilizados por estes pesquisadores, são caracterizados por acúmulo de gordura visceral e uma leve obesidade, diferentemente dos animais deste estudo.

No segundo ensaio biológico, os teores de cinzas dos ratos suplementados com CLA foram estatisticamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) ( $3,43 \pm 0,19$  e  $3,36 \pm 0,19$ , para os grupos AE e CO respectivamente), em relação ao teor do grupo controle ( $3,16 \pm 0,15$ ) (Figura 13). Estes valores resultaram em um aumento de 7,5 % do conteúdo de cinzas destes animais. Resultados semelhantes foram relatados por Park e outros (1997), quando camundongos suplementados com 0,5 % de CLA por 32 dias, demonstraram aumento significativo dos teores de cinzas. Este mesmo grupo de pesquisadores, encontraram um aumento de 14,5 % dos teores de cinzas em camundongos alimentados com 0,5 % de uma mistura de isômeros de CLA durante 4 semanas (PARK *et al.*, 1999).

Alguns estudos têm sugerido que a suplementação com CLA seja capaz de potencializar a mineralização óssea (LI *et al.*, 1999; LI; WATKINS, 1998; PARK, *et al.*, 1997). A prostagladina E<sub>2</sub> é capaz de reduzir a síntese do fator de crescimento mediado pela insulina e conseqüentemente dificultar a formação óssea. O CLA atua competindo com outros ácidos graxos poliinsaturados, e dessa maneira inibindo a formação da PGE<sub>2</sub> via ciclooxigenase. (LI *et al.*, 1999; LI; WATKINS, 1998). Os resultados obtidos neste trabalho, sugerem, de maneira indireta, que a suplementação com CLA durante 42 dias, tenha potencializado a mineralização óssea dos animais dos grupos AE e CO, visto que estes apresentaram teores de cinzas superiores ao grupo controle.

São muitas as evidências de que o isômero trans-10, cis-12 seja o responsável pelas alterações na composição corporal (GAVINO *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 1999). Dessa maneira, foram correlacionados o consumo total deste isômero e a composição corporal dos animais no primeiro e segundo ensaios biológicos. Constatou-se uma correlação negativa significativa ( $r = - 0,54169$ ,  $p < 0,0001$ ) entre a crescente ingestão de trans-10, cis-12 e a redução da gordura corporal no primeiro ensaio biológico (Figura 11). Este comportamento também foi observado no segundo ensaio biológico, em que uma correlação negativa significativa ( $r = - 0,65929$ ,  $p < 0,0001$ ), foi encontrada (Figura 14). Pelo fato de terem sido utilizadas **misturas** de ácido linoléico conjugado, contendo os isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12, em proporções semelhantes, não é possível afirmar que as alterações na composição corporal demonstradas neste trabalho, tenham sido exclusivamente causadas pela ingestão do isômero trans-10, cis-12.

## 5.6 Concentração de leptina sérica

Com relação à concentração sérica de leptina (ng/mL) dos ratos do segundo ensaio biológico, foi constatado que os grupos experimentais AE e CO, que receberam suplementação com CLA, obtiveram valores estatisticamente menores ( $p \leq 0,05$ ) ( $3,45 \pm 0,46$  e  $3,08 \pm 0,19$ , respectivamente) em relação ao grupo controle ( $4,21 \pm 0,22$ ) que recebeu ácido linoléico (Tabela 10), resultando em uma diminuição de 22,4 %. Resultados similares foram encontrados por Rahman e colaboradores (2001), quando ratos OLETF alimentados com AIN-93G que receberam 1 % de uma mistura de isômeros de CLA na forma de triacilglicerol e na forma de ácidos graxos livres, apresentaram redução significativa da leptina sérica. Corroborando com estes resultados, Akahoshi e outros (2002), encontraram reduções significativas dos valores séricos de leptina de camundongos alimentados com 1 % de CLA por 8 semanas. Mais recentemente, ratos Sprague-Dawley tiveram os teores séricos de leptina reduzidos após suplementação com 1,5 % de uma mistura de CLA por 3 semanas (YAMASAKI *et al.*, 2003).

A leptina, um hormônio protéico produzido unicamente pelos adipócitos, reflete o conteúdo de gordura corporal existente no organismo. Sendo assim, indivíduos obesos possuem concentrações séricas de leptina mais elevadas do que indivíduos magros, havendo portanto, uma correlação positiva direta entre os teores de leptina sérica e a gordura corporal (OSTLUND *et al.*, 1996). Neste trabalho, os animais suplementados com 2 % de CLA sobre o consumo médio diário de dieta, durante 42 dias, demonstraram uma correlação positiva moderada entre os valores de leptina sérica e os teores de gordura corporal ( $r = 0,74672$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 15). Quando correlacionados os teores de gordura do tecido adiposo epididimal e leptina sérica, Akahoshi e outros (2002) encontraram a mesma correlação positiva de  $r = 0,74$ ,  $p < 0,0001$ , encontrada neste estudo.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir que:

- ❖ A suplementação com ácido linoléico conjugado não interferiu na eficiência alimentar dos ratos entre os grupos em estudos;
- ❖ A suplementação com ácido linoléico conjugado não exerceu efeito sobre os teores de triacilgliceróis séricos;
- ❖ Durante 21 dias de suplementação com CLA, houve uma redução dose dependente dos valores de colesterol séricos conforme aumentou a suplementação administrada. No entanto, com 42 dias de suplementação, o CLA ocasionou um aumento destes teores;
- ❖ A suplementação com ácido linoléico conjugado aumentou em 7,5 % os teores de cinzas dos animais após 42 dias de experimento, sugerindo de forma indireta uma potencialização da mineralização óssea;
- ❖ A suplementação com ácido linoléico conjugado durante 42 dias, reduziu em 22,4 % a concentração sérica de leptina dos ratos;
- ❖ **Como conclusão geral, pôde-se verificar que a suplementação com ácido linoléico conjugado na concentração de 2 % sobre o consumo médio diário de dieta, foi capaz de reduzir em média 18,0 % da gordura corporal dos ratos, tanto com 21 dias como com 42 dias de experimentação.**

**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ADAMS, S. H. Uncoupling protein homologs: emerging views of physiological function. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 4, p. 711-714, Apr., 2000.

AKAHOSHI, A.; GOTO, Y.; MURANO, K.; MIYAZAKI, T.; YAMASAKI, M.; NONAKA, M.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokine levels of mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, n. 4, p. 916-920, Apr., 2002.

ALDRIDGE, T. C.; TUGWOOD, J. D.; GREEN, S. Identification and characterization of DNA elements implicated in the regulation of CYP4A1 transcription. **The Biochemical Journal**, London, v. 306, n. 2, p. 473-479, Mar., 1995.

ALONSO, L.; CUESTA, E. P.; GILLILAND, S. E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1941-1946, June, 2003.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC 16. ed. International CUNNIF, P. ed., Virgínia: AOAC International, 1995. v. 1.

AZAIN, M. J.; HAUSMAN, D. B.; SISK, M. B.; FLATT, W. P.; JEWELL, D. E. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 6, p. 1548-1554, June, 2000.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 278, n. 1, p. R179-R184, Jan., 2000.

BAUMGARD, L. H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B. A.; DWLER, D. A.; BAUMAN, D. E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2155-2163, Sept., 2002.

BAWA, S. An update on the beneficial roles of conjugated linoleic acid (CLA) in modulating human health: mechanisms of action – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 12, n. 3, p. 3-13, July, 2003.

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 505-531, 2002.

BELURY, M. A.; BIRD, C.; NICKEL, K. P.; WU, B. Inhibition of mouse skin tumor promotion by dietary conjugated linoleate. **Nutrition Cancer**, v. 26, p. 149-157, 1996.

BELURY, M. A.; MAHON, A.; BANNI, S. The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 1, 257S-260S, Jan., 2003.

BELURY, M.; MOYA-CAMARENA, S. Y.; LIU, K. L.; VANDEN HEUVEL, J. P. Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, Stoneham, v. 8, n. 10, p. 579-584, Oct., 1997.

BENITO, P.; NELSON, G. J.; KELLY, D. S.; BARTOLINI, G.; SCHIMIDT, P. C.; SIMON, V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. **Lipids**, Champaign, v. 36, n. 3, p. 229-236, Mar., 2001.

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J. A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight obese humans. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 12, p. 2943-2948, Dec., 2000.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRETILLON, L.; CHARDIGNY, J. M.; GREGOIRE, S.; BERDEAUX, O.; SEBEDIO, J. L. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*. **Lipids**, Champaign, v. 34, n. 9, p. 965-969, Sept., 1999.

BRODIE, A. E.; MANNING, V. A.; FERGUSON, K. R.; JEWELL, D. E.; HU, C. Y. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in confluent cells. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 3, p. 602-606, Mar., 1999.

BROWN J. M.; BOYSEN, M. S.; JENSEN, S. S.; MORRISON, R. F.; STORKSON, J.; LEA-CURRIE, R.; PARIZA, M.; MANDRUP, S.; McINTOSH, M. K. Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, n. 7, p. 1287-1300, July, 2003.

BROWN, M.; EVANS, M.; McINTOSH, M. Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, Stoneham, v. 12, n. 7, p. 381-387, July, 2001.

CARVALHO, W.F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. 7 ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1999. 340p.

CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; HA, Y. L.; PARIZA, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition Analysis**, Blacksburg, v. 5, n. 3, p. 185-197, Sept., 1992.

CHIN, S. F.; STORKSON, J. M.; LIU, W.; ALBRIGHT, K. J.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid (9, 11 and 10, 12 octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 124, n. 5, p. 694-701, May, 1994.

CHOI, Y. J.; KIM, Y. C.; HAN, Y. B.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; NTAMBI, J. M. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulated stearoyl-CoA desaturase gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 8, p. 1920-1924, Aug., 2000.

CHOUINARD, P. Y.; BAUMAN, B. A.; BAUMGARD, M. A. An update on conjugated linoleic acid. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FEED MANUFACTORY, 1999, Ithaca. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1999, p. 93-101.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 23, n. 7, p. 1072-1074, Sept., 1982.

CLÉMENT, L.; POIRIER, H.; NIOT, I.; BOCHER, V.; GUERRE-MILLO, M.; KRIEF, S.; STAELS, B.; BESNARD, P. Dietary trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 43, n. 9, p. 1400-1409, Sept., 2002.

COOK, M. E.; JEROME, D. L.; PARIZA, M. Broilers fed conjugated linoleic acid had enhanced bone ash. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 11, n. 3, A418-A418, Feb., 1997. Abstract 162.5.

COOK, M. E.; MILLER, C. C.; PARK, Y.; PARIZA, M. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, n. 7, p. 1301-1305, July, 1993.

CORINO, C.; MOUROT, J.; MAGNI, S.; PASTORELLI, G.; ROSI, F. Influence of dietary linoleic acid in growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 4, p. 1020-1028, Apr., 2002.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D. A.; GRIINARI, J. M.; PHILIPS, B. S.; BAUMAN, D. E. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.12, p. 622-630, 2001.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; PARIZA, M. W. Derivatives of conjugated linoleic acid (CLA) and fat reduction. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 14, n. 4, A525-A525, Mar., 2000. Abstract 366.8.

DAUN, J. M.; McCARTHY, D. O. The role of cholecystinin in interleukin-1 induced anorexia. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 54, n. 2, p. 237-241, Aug., 1993.

DECKERE, E. A. M.; AMELSVOORT, J. M. M. V.; McNEILL, G. P.; JONES, P. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 82, n. 4, p. 309-317, Apr., 1999.

DELANY, J. P.; BLOHM, F.; TRUETT, A. A.; SCIMECA, J. A.; WEST, D. B. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 276, n. 3, p. R1172-R1179, Sept., 1999.

DHIMAN, T. T.; ANAND, G. R.; SATTER, L. D.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 820, n. 10, p. 2146-2156, Oct., 1999.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. 91-95, 1984.

EVANS, M. E.; BROWN, J. M.; McINTOSH, M. K. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, n. 9, p. 508-516, Sept., 2002.

EVANS, M.; GEIGERMAN, C.; COOK, J.; CURTIS, L.; KUEBLER, B.; McINTOSH, M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 8, p. 899-910, Aug., 2000.

FRITSCHÉ, J.; STEINHART, H. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. **European Food Research and Technology**, Springer, v. 206, n. 2, p. 77-82, Mar.-Apr., 1998.

GAVINO, V. C.; GAVINO, G.; LEBLANC, M. J.; TUCHWEBER, B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body composition weight gain and plasma lipids in hamsters. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 1, p. 27-29, Jan., 2000.

GOENA, M.; MARZO, F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, L.; TOSAR, A.; FRÜHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiología**, Pamplona, v. 45, n. 1, p. 55-60, Apr., 1989.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 78, n. 3, p. 783-809, July, 1998.

GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$  desaturase. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, Sept., 2000.

HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1881-1887, Sept., 1987.

HA, Y. L.; STORKSON, J.; PARIZA, M. W. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. **Cancer Research**, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 1097-1101, Feb., 1990.

HARGRAVE, K. M.; AZAIN, M. J.; KACHMAN, S. D.; MINER, J. L. Conjugated linoleic acid does not improve insulin tolerance in mice. **Obesity Research**, Silver Spring, v. 11, n. 9, p. 1104-1115, Sept., 2003.

HAYASHI, A. P. **Efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado (CLA) na composição do leite, no perfil de ácidos graxos e na atividade de enzimas lipogênicas em ratos lactantes**. 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

HOUSEKNECHT, K. L.; VANDEN HEUVEL, J. P.; MOYA-CAMARENA, S. Y.; PORTOCARRERO, C. P.; PECK, L. W.; NICKEL, K. P.; BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 244, n. 3, p. 911-917, Mar., 1998.

HUANG, Y.; BRADFORD, B.; HEIG, N.; YOUNG, J.; BEITZ, D. Feeding dairy cattle to increase the content of conjugated linoleic acid in milk. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p. 310, 2001. Supplement 1.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

IP, C. CLA and cancer prevention. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1. Alesund, 2001. **Proceedings**. Alesund: NATURAL ASA, 2001, p. 8.



IP, C.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; MCGINLEY, J.; THOMPSON, H. J.; BARBANO, D.; BAUMAN, D. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.129, n. 12, p. 2135-2142, Dec., 1999a.

IP, C.; BELURY, M.; LAMMI-KEEFE, C. **Conjugated Linoleic Acid: recent advances in disease, prevention and management**. Disponível em: [http://www.beef.org/documents/CLA\\_advances.pdf](http://www.beef.org/documents/CLA_advances.pdf)>. Acesso em: 23 abr. 2003.

IP, C.; BRIGGS, S. P.; HAEGELE, A. D.; THOMPSON, H. J.; STORKSON, J.; SCIMECA, J. A. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1045-1050, May, 1996.

IP, C.; CHIN, S. F.; SCIMECA, J. A.; PARIZA, M. W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. **Cancer Research**, Baltimore, v. 51, n. 22, p. 6118-6124, Nov., 1991.

IP, C.; JIANG, C.; THOMPSON, H. J.; SCIMECA, J. A. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 6118-6124, Nov., 1997.

IP, M. M.; MASSO-WELCH, P. A.; IP, C.; ZANGANI, D.; LEE, P. Inhibition of angiogenesis by CLA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1., Alesund, 2001. **Proceedings**. Alesund: NATURAL ASA, 2001, p. 9.

IP, M. M.; MASSO-WELCH, P. A.; SHOEMAKER, S. F.; SHEA-EATON, W.; IP, C. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. **Experimental Cell Research**, New York, v. 250, n. 1, p. 22-34, July, 1999b.

IP, C.; SCIMECA, J. A.; THOMPSON, H. J. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. **Cancer**, Philadelphia, v. 74, n. 3, p. 1050-1054, Aug., 1994.

IP, C.; SCIMECA, J. A.; THOMPSON, H. J. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. **Nutrition Cancer**, v. 24, p. 241-247, 1995.

IP, C.; SINGH, M.; THOMPSON, H. J.; SCIMECA, J. A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 5, p.1212-1215, Mar., 1994.

JIANG, J.; WOLK, A.; VESSBY, B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, n. 1, p. 21-27, July, 1999.

KALLEN C. B.; LAZAR, M. A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 5793-5796, June, 1996.

KANG, K.; LIU, W.; ALBRIGHT, K. J.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. Trans-10, cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 303, n. 3, p. 795-799, Apr., 2003.

KAY, J. K.; MACKLE, T. R.; AULDIST, M. J.; THOMSON, N. A.; BAUMAN, D. E. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. **Proceedings of New Zealand Society Animal Production**, v. 62, p. 12-15, 2002.

KELLY, M. L.; BERRY, J. R.; DWYER, D. A.; GRIINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; VAN AMBURGH, M. E.; BAUMAN, D. E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 5, p. 881-855, May, 1998.

KELLY, D. S.; TAYLOR, P. C.; RUDOLPH, I. L.; BENITO, P.; NELSON, G. J.; MACKEY, B. E.; ERICKSON, K. L. Dietary conjugated linoleic acid did not alter immune status in young healthy women. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 10, p. 1065-1071, Oct., 2000.

KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; McNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 241, n. 6, p. 1350-1354, Mar., 1966.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, London, v. 405, n. 25, p. 421-424, May, 2000.

KRITCHEYSKY, D. Effect of CLA in experimental atherosclerosis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1., Alesund, 2001. **Proceedings**. Alesund: NATURAL ASA, 2001, p. 24.

LEE, K. N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 108, n. 1-2, p. 19-25, Jan., 1994.

LEES, R. Manual de análisis de alimentos. **Laboratory handbook of methods of food analysis**. Zaragoza: Acribia, 1979. p. 18-20, 183-185.

LEVIN, J. **Estatística Aplicada a Ciências Humanas**. São Paulo: Harper & Row, 1978. 211p.

LI, Y.; SEIFERT, M. F.; NEY, D. M.; GRAHN, M.; GRANT, A. L.; ALLEN, K. D. G.; WATKINS, B. A. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-1 and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, p. 1153-1162, 1999.

LI, Y.; WATKINS, B. A. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 33, n. 4, p. 417-425, Apr., 1998.

LIBBY, P. Atherosclerosis: the new view. **Scientific American**, New York, v. 286, n. 5, p. 29-37, May, 2002.

LIEW, C.; SHUT, H. A. J.; CHIN, S. F.; PARIZA, M. W.; DASHWOOD, R. H. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 3037-3043, Dec., 1995.

LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Independent effects of dietary linoleic and linoleic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1., Alesund, 2001. **Proceedings**. Alesund: NATURAL ASA, 2001, p. 41.

LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 12, p. 2411-2419, Dec., 1998.

MARTIN, J.; GREGOIRE, S.; SIESS, M.; GENTY, M.; CHARDIGNY, J.; BERDEAUX, O.; JUANÉDA, P.; SEBÉDIO, J. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 1, p. 91-98, Jan., 2000.

MARTIN, S. A.; JENKINS, T. C. Factors affecting conjugated linoleic acid *trans*-C<sub>18:1</sub> fatty acid production by mixed ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. 3347-3352, 2002.

McCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M.; RAISZ, L. G.; CANALIS, E. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates insulin-like growth factor 1 synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 128, n. 6, p. 2895-2900, June, 1991.

McGUIRE, M.A.; McGUIRE, M. K. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v. 10, n. 8, p. 756-762, Aug., 1999.

McNEEL, R. L.; MERSMANN, H. J. Conjugated linoleic acid isomers influence porcine adipocyte differentiation in vitro. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 15, n. 5, p. A996, Mar., 2001. Abstract 759.11.

MEDEIROS, S. R. **Ácido linoléico conjugado: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado.** 2002. 98 p. Tese (Doutor em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MEDINA, E. A.; HORN, W. F.; KEIM, N. L.; HAVEL, P. J.; BENITO, P.; KELLY, D. S.; NELSON, G. J.; ERICKSON, K. L. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 7, p. 783-788, July, 2000.

MILLER, C. C.; PARK, Y.; PARIZA, M.; COOK, M. E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcame the catabolic responses due to endotoxin injection. **Biochemistry Biophysicol Research Community**, Orlando, v. 198, n. 3, p. 1107-1112, Feb., 1994.

MOUGIOS, V.; MATSAKAS, A.; PETRIDOU, A.; RING, S.; SAGREDOS, A.; MELISSOPOULOU, A.; TSIGILIS, N.; NIKOLAIDIS, M. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid in human serum lipids and body fat. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, Stoneham, v. 12, n. 10, p. 585-594, Oct., 2001.

MOYA-CAMARENA, S. Y.; VANDEN HEUVEL, J. P.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1436, n. 3, p. 331-342, Jan., 1999.

MUNDAY, J. S.; THOMPSON, K. G.; JAMES, K. A. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, p. 251-255, 1999.

NELSON, G. L.; SCHMIDT, P. C.; BARTOLINI, G.; KELLY, D. S.; PHINNEY, S. D.; KYLE, D.; SILBERMANN, S.; SCHAEFER, E. J. The effect of dietary arachidonic acid on plasma lipoprotein distributions, apoproteins, blood lipid levels, and tissue fatty acid composition in humans. **Lipids**, Champaign, v. 32, n. 4, p. 427-433, Apr., 1997.

NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte differentiation and gene expression. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 11, p. 2722-2731, Nov., 2000.

OHGO, S.; NAKATSURO, K.; ISHIKAWA, E.; SHIGERU, M. Stimulation of cholecystokinin (CCK) release from superfused rat hypothalamo-neurohypophyseal complexes by interleukin-1 (IL-1). **Brain Research**, Amsterdam, v. 593, n. 1, p. 25-31, Oct., 1992.

OHNUKI, K.; HARAMIZU, S.; OKI, K.; ISHIHARA, K.; FUSHIKI, T. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. **Lipids**, Champaign, v. 37, n. 4, p. 583-587, Apr., 2001.

OSTLUND, R. E.; YANG, J. W.; KLEIN, S.; GINGERICH, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 3909-3913, 1996.

OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R. F.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Dietary conjugated linoleic acid increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 11, p. 2037-2042, Nov., 1999.

PALMIQUIST, D. L.; GRIINARI, M. Dietary fish oil plus vegetable oil maximizes trans-18:1 and rumenic acid in milk fat. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, 2001. Abstract 1283. Supplement 1.

PARIZA, M. W.; ASHOOR, S. H.; CHU, F. S.; LUND, D. B. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 63, 1979.

PARIZA, M. W.; HA, Y. L. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of carcinogens. **Medical Oncology Tumor Pharmacology**, v. 7, p. 169-171, 1990.

PARIZA, M. W.; HARGRAVES, W. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 591-598, Apr., 1985.

PARIZA, M. W.; LORETZ, L. J.; STORKSON, J. M.; HOLLAND, N. C. Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. **Cancer Research**, Baltimore, v. 43, n. 5, p. 2444s-2446s, May, 1983.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 223, n. 1, p. 8-13, Jan., 2000.



PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 283-298, July, 2001.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, Champaign, v. 32, n. 8, p. 853-858, Aug., 1997.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; PARIZA, M. W. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, Champaign, v. 34, n. 3, p. 235-241, Mar., 1999.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; NTAMBI, J. M.; COOK, M. E.; SIH, C. J.; PARIZA, M. W. Inhibition on hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1486, n. 3, p. 285-292, July, 2000.

PARODI, P. W. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, n. 5, p. 1550-1553, May, 1977.

PETRIDOU, A.; MOUGIOS, V.; SAGREDOS, A. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum and effect on body fat of women. **Lipids**, Champaign, v. 38, n. 8, p. 805-811, Aug., 2003.

POULOS, S. P.; SISK, M.; HAUSMAN, D. B.; AZAIN, M. J.; HAUSMAN, G. J. Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 10, p. 2722-2731, Oct., 2001.

RAHMAN, S. M.; WANG, Y. M.; YOTSUMOTO, H.; CHA, J. Y.; HAN, S. Y.; INOUE, S.; YANAGITA, T. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. **Nutrition**, New York, v. 17, n. 5, p. 385-390, May., 2001.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov., 1993.

RISÉRUS, U.; VESSBY, B.; ÄRNLÖV, J.; BASU, S. Effects of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, n. 2, p. 279-283, Aug., 2004.

RITZENTHALER, K. L.; McGUIRE, M. K.; FALEN, R.; SHULTZ, T. D.; DASGUPTA, N.; McGUIRE, M. A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 5, p. 1548-1554, May, 2001.

RYDER, J. W.; PORTOCARRERO, C. P.; SONG, X. M.; CUI, L.; YU, M.; COMBATSIARIS, Y.; GALUSKA, D.; BAUMAN, D. E.; BARBANO, D. M.; CHARRON, M. J.; ZIERATH, J. R.; HOUSEKNECHT, K. L. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 5, p. 1149-1157, 2001.

SAKAI, J.; DUNCAN, E. A.; RAWSON, R. B.; HUA, X.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. **Cell**, Cambridge, v. 85, n. 7, p. 1037-1046, June, 1996.

SAKONO, M.; MIYANAGA, F.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; FUKUDA, N.; WATANABE, K.; IWATA, T.; SUGANO, S. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by rat liver. **Lipids**, Champaign, v. 34, n. 9, p. 997-1000, Sept., 1999.

SAS Institute (1993). **SAS User's Guide: statistics**, v.8.2. Cary, USA: SAS Inst.

SATORY, D. L.; SMITH, S. B. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 1, p. 92-97, Jan., 1999.

SEBEDIO, J. L.; GNAEDIG, S.; CHARDIGNY, J. Recent advances in conjugated linoleic acid research. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, v. 2, n. 6, p. 499-506, 1999.

SISK, M. B.; HAUSMAN, D. B.; MARTIN, R. J.; AZAIN, M. J. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 6, p. 1668-1674, June, 2001.

SMEDMAN, A.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans – metabolic effects. **Lipids**, Champaign, v. 36, n. 8, p. 773-781, Aug., 2001.

SNEDECOR, G. W. **Métodos de Estatística**: su Aplicación a Experimentos en Agriculture y Biología, Buenos Aires: Acme Agency, 1948, 179p.

STANGL, G. I. Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 1140-1146, May, 2000.

STANGL, G. I.; MULLER, H.; KIRCHGESSNER, M. Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine. **European Journal of Nutrition**, v. 38, p. 271-277, 1999.

STANTON, C.; LAWLESS, F.; MURPHY, J.; CONNOLLY, B. Conjugated linoleic acid (CLA) – a health-promoting component of dairy fats. **Farm & Food**, Dublin, v. 7, n. 2, p. 19-20, Feb., 1997.

TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M.; SHINOHARA, K.; IDE, T. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Vancouver, v. 133, n. 3, p. 395-404, Nov., 2002.

TEACHEY, M. K.; TAYLOR, Z.C.; MAIER, T.; SAENGSIKISUWAN, V.; SLONIGER, J. A.; JACOB, S.; KLATT, M. J.; PTOCK, A.; KRAEMER, K.; HASSELWANDER, O.; HENRIKSEN, E. J. Interactions of conjugated linoleic acid and lipoic acid on insulin actions in the obese Zucker rats. **Metabolism**, Orlando, v. 52, n. 9, p. 1167-1174, Sept., 2003.

TERPSTRA, A. H. M.; BEYNEN, A. C.; EVERTS, H.; KOCSIS, S.; KATAN, M. B.; ZOCK, P. L. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 5, p. 940-945, May, 2002.

TOOMEY, S.; ROCHET, H.; FITZGERALD, D.; BELTON, O. Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE<sup>-/-</sup> mouse by conjugated linoleic acid. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 31, n. 5, p. 1075-1079, Oct., 2003.

TRUITT, A.; McNEILL, G.; VANDERHOEK, J. Y. Antiplatelet effect of conjugated linoleic acid isomers. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1438, n. 2, p. 239-246, May, 1999.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, M.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, New York, v. 49, n. 9, p. 1534-1542, 2000.

TUGWOOD, J. D.; ISSEMAN, I.; ANDERSON, R. G.; BUNDEL, K. R.; McPHEAT, W. L.; GREEN, S. The mouse peroxisome proliferators activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 433-439, Feb., 1992.

US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA). **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fat Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids.** Washington DC: National Academy Press, 2002. 936p. (Food and Nutrition Board).

VAN DEN BERG, J. J. M.; COOK, N. E.; TRIBBLE, D. L. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. **Lipids**, Champaign, v. 30, n. 7, p. 599-605, July, 1995.

VANDEN HEUVEL, J. P.; STERCHELE, P. F.; NESBIT, D. J.; PETERSON, R. E. Coordinate induction of acyl-CoA binding protein, fatty acid binding protein and peroxisomal  $\beta$ -oxidation by peroxisome proliferators. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1177, n. 2, p. 83-190, June, 1993.

WANG, Y. M.; JONES, P. J. H. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. **International Journal of Obesity**, London, v. 28, n. 8, p. 941-955, 2004.

WELSCH, C. W. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis. A review and critique. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 662-666, Feb., 1992.

WEST, D. B.; DELANY, J. P.; CAMET, P. M.; BLOHM, F.; TRUETT, A. A.; SCIMECA, J. Effects of conjugated linoleic acid on body composition fat and energy metabolism in the mouse. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 275, n. 3, p. R667-R672, Sept., 1998.

WHIGHAM, L. D.; COOK, M. E.; ATKINSON, R. L. Conjugated linoleic acid: implications for human health. **Pharmacological Research**, London, v. 42, n. 6, p. 503-510, June, 2000.

WUTHIER, R. E. Involvement of cellular metabolism of calcium and phosphate in calcification of avian growth plate cartilage. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 2, p. 301-309, Feb., 1993.

YAMASAKI, M.; IKEDA, A.; OJI, M.; TANAKA, O.; HIRAO, A.; KASAI, M.; IWATA, Y.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. **Nutrition**, New York, v. 19, n. 1, p. 30-35, Jan., 2003.

YAMASAKI, M.; KISHIHARA, K.; MANSHO, K.; OGINO, Y.; KASAI, M.; SUGANO, M.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n. 10, p. 2159-2164, Oct., 2000.

YURAWECZ, M. P.; SEHAT, N.; MOSSOBA, M. M.; ROACH, J. A. G.; KRAMER, J. K. G.; KU, Y. Variations in isomer distribution in commercially available conjugated linoleic acid. **Fett/Lipid**, Leinfelden, v. 101, n. 7, p. 277-282, July, 1999.

ZAMBELL, K. L.; KEIM, N. L.; LOAN, M. D. V.; GALE, B.; BENITO, P.; KELLEY, D. S.; NELSON, G. J. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 7, p. 777-782, July, 2000.

ZHANG, B.; GRAZIANO, M. P.; DOEBBER, T. W.; LEIBOWITZ, M. D.; WHITE-CARRINGTON, S.; SZALKOWSHI, D. M.; HEY, P. J.; WU, M.; CULLINAN, C. A.; BAILEY, P. Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and *db/db* mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 16, p. 9455-9459, Apr., 1996.

**8 ANEXOS**



**ANEXO 1**





**ANEXO 2**



**ANEXO 3**