

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

ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO: EFEITO SOBRE PERFIL LIPÍDICO E
COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATOS E HUMANOS

ADRIANA PRAIS BOTELHO
Mestre em Alimentos e Nutrição

PROF. DR. MARIO ROBERTO MARÓSTICA JUNIOR
Orientador

CAMPINAS – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B657a Botelho, Adriana Prais
Ácido linoléico conjugado: efeito sobre perfil lipídico e composição corporal em ratos e humanos / Adriana Prais Botelho. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Júnior
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Acido linoléico conjugado. 2. Perfil lipídico. 3. Composição corporal. 4. Ratos. 5. Humanos. I. Maróstica Júnior, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Conjugated linoleic acid: effect on lipid profile and body composition in rats and humans

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

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Mário Roberto Maróstica Júnior
Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Flávia Queiroga Aranha de Almeida
Gláucia Maria Pastore
Semíramis Martins Álvares Domene

Data da defesa: 16/09/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

ADRIANA PRAIS BOTELHO
Mestre em Alimentos e Nutrição

**ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO: EFEITO SOBRE PERFIL LIPÍDICO E
COMPOSIÇÃO CORPORAL EM RATOS E HUMANOS**

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

Orientador:
Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior

CAMPINAS – SP

2010

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Adriana Prais Botelho
aprovada pela Comissão Julgadora em 16/09/10

Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior
Orientador

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
FCA - UNICAMP

Profa. Dra. Flávia Queiroga Aranha de Almeida
UNESP

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
FEA - UNICAMP

Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene
UNIFESP

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra
FCA - UNICAMP

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan
FEA - UNICAMP

Profa. Dra. Lilia Zago Ferreira dos Santos
UNIFESP

Ao saudoso *Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira (in memorian)*, pelos ensinamentos e experiências compartilhados e também por ter acreditado que esta idéia valeria a pena.

Aos dois homens da minha vida, por quem hoje sou a mulher mais feliz e realizada do mundo, meu marido *Luciano* e nosso filho *Marcelo*. Amo vocês mais que tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior, pela continuidade da orientação e oportunidade de trabalharmos juntos.

À Banca Examinadora, pela solicitude e 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 06/60978-0).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº 142452/2005-0).

À Cognis Brasil por todo suporte e auxílio durante a execução deste trabalho, e também pela doação dos suplementos de ácido linoléico conjugado e óleo de cártamo, para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Grupo Perdigão, Divisão Elegê Alimentos, pela doação dos leites semi-desnatados e do leite em pó utilizados durante a pesquisa.

À equipe do Grupo Perdigão, Divisão Elegê Alimentos, em especial a engenheira de alimentos Fernanda Wiebusch Camara, pelo desenvolvimento das matérias-primas utilizadas.

À M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda., pela doação da mistura vitamínica.

Ao Ramon Vargas Fernandez, pela luta em nos ajudar de alguma maneira. Muito obrigada!

À Dra. Soely Maria Pissini Machado Reis, pela ajuda constante que ultrapassou as bancadas e transformou-se em amizade.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pelo apoio técnico durante a execução do ensaio biológico.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, em especial Cidinha, Sônia, Fátima, Francisco, Eliana, Carla, Yara 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 Hematologia do Hemocentro – UNICAMP, nas pessoas da coordenadora Mônica e das técnicas Juliana e Camila pela parceria e execução dos exames hematológicos.

Ao Laboratório de Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, na pessoa da Profa. Nelci Fenalti Höehr, pela execução das análises de perfil bioquímico.

Ao Laboratório de Sorologia, da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, na pessoa da Profa. Neiva Sellan Lopes Gonçalves, pela parceria e execução das análises de sorologia.

Ao Laboratório de Pâncreas, Endócrino e Metabolismo do Instituto de Biologia – UNICAMP, em especial a Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira e a aluna de doutorado e amiga Helena Raposo, pelo auxílio nas análises de perfil hormonal.

Ao Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Biologia – UNICAMP, na pessoa do Prof. Dr. Francesco Langone (*in memoriam*) e de seus alunos, pela assistência nas análises de expressão gênica.

À aluna de mestrado Daniela Micotto Bernardi pela ajuda durante a coleta dos dados de avaliação antropométrica dos voluntários.

Às alunas do Curso de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Fernanda Pozza, Luiza Pardo, Rafaela Marineli e Sabrina Alves, pela ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade construída. Sucesso à todas vocês!

Às alunas do Curso Técnico em Nutrição do Colégio Bento Quirino, Camila da Silva Vilas Bôas e Thais Vitória Paiva, pela ajuda durante o ensaio biológico.

Ao amigo Gustavo Facchini, pela ajuda na coleta de sangue dos voluntários e na análise de expressão gênica.

Às queridas amigas Lucia Maranhã e Josiane Santos, por toda compreensão nos momentos mais difíceis e pela torcida constante.

Às SUPERS AMIGAS: Elisa, Giovana, Helena, Lilia e Mônica, por todos os almoços, jantares, cafés, encontros, enfim, por todos os momentos, conversas, conselhos e risadas especiais e inesquecíveis que passamos juntas. Amo todas vocês!

A mais do que parceira nestes anos de trabalho, Lilia Zago, por todos os momentos divididos, pelas alegrias das conquistas e pelo ombro amigo nos momentos mais difíceis. Sentirei saudade!

Aos meus pais, pelo incentivo e oportunidades ao longo desta trajetória. Muito obrigada!

Ao meu irmão, Marcos, pelos conselhos, bom senso e por ter aberto meus horizontes.

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

À minha “família estendida”, Aparecida, Priscilla, Silas, Bruno e André, pelas orações e torcida.

A todos os voluntários que participaram da execução deste trabalho. Sem vocês certamente nada disto teria sido possível. Meus sinceros agradecimentos!

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

Não há nada como um sonho para criar o futuro. (Victor Hugo)

RESUMO

O ácido linoléico conjugado (CLA), conjunto de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas, origina-se no rúmen por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta e pela dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans-11*. O CLA parece exercer os seguintes efeitos benéficos no organismo humano: 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. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação em cápsula com ácido linoléico conjugado e do consumo de leite enriquecido com este mesmo composto sobre o perfil lipídico e a composição corporal por meio de ensaio biológico com ratos Wistar machos saudáveis em crescimento e por meio de ensaio clínico em indivíduos do sexo masculino com sobrepeso e obesidade grau I. Para o ensaio biológico foram utilizados 100 ratos. Destes, 20 animais foram destinados ao grupo de referência (T0) e os demais, divididos em 4 grupos. Os animais foram suplementados diariamente ou consumiram dieta enriquecida com óleo de cártamo e CLA na concentração de 2 % sobre o consumo diário de dieta, constituindo respectivamente os grupos SP (suplementado placebo), SE (suplementado experimental), EP (enriquecido placebo) e EE (enriquecido experimental). As análises foram realizadas no início (T0) e ao final de 4 e 8 semanas, caracterizando T1 e T2, respectivamente. Para o ensaio clínico 53 indivíduos foram divididos em 4 grupos, que receberam 3 cápsulas ao dia de óleo de cártamo ou CLA, constituindo os grupos suplementado placebo (SP) e suplementado experimental (SE), respectivamente; ou consumiram 500 mL de leite semi-desnatado ao dia, sem adição de CLA ou enriquecido com 0,6 % de CLA, constituindo os grupos enriquecido placebo (EP) e enriquecido experimental (EE), respectivamente. As análises foram realizadas no início (T0), ao final de 6 (T1) e 12 (T2) semanas. A aceitação e a intenção de compra do leite enriquecido com CLA foram realizadas por meio de escala hedônica não estruturada de 9 cm e escala de 5 pontos, respectivamente. A ingestão de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar, assim como o peso do fígado, coração e rins dos ratos não foram alterados após o consumo de CLA. O consumo de CLA não alterou os valores de triacilglicerol e

colesterol total séricos após 4 e 8 semanas. Já os teores de HDL-colesterol dos animais aumentaram em 56 % após 4 semanas de suplementação com ácido linoléico conjugado. Com relação aos valores de glicemia e insulina plasmáticas dos ratos, houve redução de 23,7 % e 10,4 %, respectivamente, após 4 semanas de experimentação nos grupos que receberam CLA por meio de entubação orogástrica, em comparação ao consumo deste composto por meio de dieta. O consumo de CLA também não alterou a carga máxima e o conteúdo de Ca e P dos ratos. A densidade óssea dos animais cujo consumo de CLA foi advindo da dieta, aumentou em 17 % quando comparado ao grupo que consumiu o composto por meio entubação orogástrica após 4 semanas. Com relação a composição corporal, seja no ensaio biológico ou no ensaio clínico, o consumo de ácido linoléico conjugado, seja na forma de suplementação ou por meio da dieta/leite enriquecido, não apresentou resultados favoráveis, os quais são compatíveis aos resultados de perfil hormonal e expressão gênica. Houve redução das concentrações de glicose e insulina plasmáticas e dos valores de HOMA-IR dos voluntários que receberam cápsulas de CLA em comparação com os que receberam placebo. Os resultados a respeito do perfil bioquímico e hemograma não apresentaram diferenças significativas. Os leites semi-desnatados com e sem adição de CLA não diferiram sensorialmente, segundo os atributos: aparência, aroma, sabor e impressão global. Este resultado foi confirmado pela positiva intenção de compra demonstrada pelos provadores. Tendo em vista os resultados encontrados, pôde-se concluir que o consumo de ácido linoléico conjugado não apresentou efeito sobre a composição corporal e sobre os teores de triacilglicerol e colesterol total séricos, mas atuou positivamente sobre os valores de glicemia e insulina plasmáticas nos ensaios biológico e clínico.

ABSTRACT

The conjugated linoleic acid (CLA), a set of geometric and positional isomers of linoleic acid with conjugated double bonds, can originate in the rumen by biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids from the diet and also by desaturation of C18:1 *trans*-11 fatty acid. Consumption of CLA exert beneficial effects in humans: modulation of the immune system, enhancement of bone mineralization, prevention and treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus, reduction of atherosclerosis and changes in body composition. The aim of this study was to assess the effects of of supplementing the diet of with conjugated linoleic acid capsule and the consumption of milk fortified with the same compound on lipid profile and body composition by means of biological assay with male healthy growing Wistar rats through testing clinical males overweight and obese grade I. For the biological assay were used 100 rats. Of these, 20 animals were used as reference group (T0) and the others divided into four groups. The animals were supplemented daily or fed diet enriched with safflower oil and CLA concentration of 2 % of your daily diet, constituting respectively the groups SP (placebo supplemented), SE (supplemented experimental), EP (enriched placebo) and EE (enriched experimental). Analyses were performed at baseline (T0) and at the end of 4 and 8 weeks, featuring T1 and T2, respectively. For the clinical assay 53 individuals were divided into four groups and received three capsules per day of safflower oil or CLA, providing the following groups: supplemented placebo (SP) and supplemented experimental (SE), respectively, or consumed 500 mL of semi-skimmed milk daily without the addition of CLA, or enriched with 0.6 % of CLA constituting the groups enriched placebo (EP) and experimental enrichment (EE), respectively. Analyses were performed at baseline (T0), after 6 (T1) and 12 (T2) weeks. Acceptance and purchase intent of milk enriched with CLA were performed using an unstructured hedonic scale of 9 cm and a 5-point scale, respectively. The dietary intake, weight gain and feed efficiency, as well as liver weight, heart and kidneys of mice were not altered after consumption of CLA. The consumption of CLA did not alter the values of serum triglyceride and total cholesterol after 4 and 8 weeks, whereas the levels of HDL-cholesterol of the animals increased by 56 % after 4 weeks of supplementation with conjugated linoleic acid. With respect to blood glucose and plasma insulin of the mice,

a reduction of 23.7 % and 10.4 % respectively after 4 weeks of experimentation in the groups receiving CLA by orogastric intubation, compared with the dietary consumption of this compound. The consumption of CLA did not alter the maximum load and the Ca and P contents of the rats. The bone density of animals whose consumption of CLA was coming from the diet increased by 17 % compared to the group that consumed the compound through orogastric intubation after 4 weeks. Regarding body composition, either in biological assay or clinical trial, consumption of conjugated linoleic acid, either as supplements or through diet/enriched milk did not show favorable results, in agreement with the results of hormonal and gene expression. There was a reduction in the concentrations of glucose and plasma insulin and HOMA-IR values of volunteers given capsules of CLA compared with those receiving placebo. The results regarding the biochemical and blood count did not change significantly. The semi-skimmed milk with and without addition of CLA did not differ according to the sensory attributes of appearance, aroma, flavor and overall impression. This result was confirmed by positive purchase intent demonstrated by the panelists. In view of these results, it was concluded that consumption of conjugated linoleic acid had no effect on body composition and on the levels of serum triglyceride and total cholesterol, but acted positively on levels of blood glucose and plasma insulin in biological and clinical assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido linoléico (<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12) e dos isômeros do CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 e <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12.....	08
Figura 2. Esquema metabólico proposto para biossíntese de <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2.	13
Figura 3. Possíveis mecanismos de ação do ácido linoléico conjugado (CLA) relacionados à composição corporal, em adipócitos e músculo esquelético.	38
Figura 4. Modelo dos efeitos do isômero <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 CLA em adipócitos e pré-adipócitos	39
Figura 5. Esquema do delineamento experimental do ensaio biológico.....	58
Figura 6. Esquema do delineamento experimental do ensaio clínico.....	82
Figura 7. Composição corporal centesimal em base úmida dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	132
Figura 8. Expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II (CPT) e ácido graxo sintase (FAS) no tecido hepático de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	136
Figura 9. Expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II (CPT) e ácido graxo sintase (FAS) no tecido adiposo epididimal de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	137
Figura 10. Expressão gênica do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) α no tecido hepático de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	138
Figura 11. Expressão gênica do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) γ no tecido hepático de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	139
Figura 12. Expressão gênica do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) α no tecido adiposo epididimal de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	140

Figura 13. Expressão de receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) γ no tecido adiposo epididimal de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	141
Figura 14. Histograma de intenção de compra dos leites semi-desnatados com e sem a adição de CLA.....	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de CLA em diferentes alimentos expressos em mg/g de gordura.....	15
Tabela 2. Mistura mineral AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).	60
Tabela 3. Mistura vitamínica AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).....	61
Tabela 4. Composição da dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).	62
Tabela 5. Composição centesimal (g/100g) dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e do leite em pó desnatado.	96
Tabela 6. Perfil dos ácidos graxos dos suplementos (óleo de cártamo e CLA), dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e das dietas experimentais.	97
Tabela 7. Composição dos ácidos graxos linoléico (C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12) e dos isômeros de CLA (C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 e <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12) dos suplementos (óleo de cártamo e CLA), dos leites semi-denatados com e sem adição de CLA e das dietas experimentais.....	101
Tabela 8. Valores médios \pm desvio-padrão de índice de peróxido e malondialdeído dos suplementos (óleo de cártamo e ácido linoléico conjugado) e das dietas (padrão, enriquecida com óleo de cártamo e enriquecida com ácido linoléico conjugado).....	103
Tabela 9. Valores do período de indução à oxidação e estimativa da vida de prateleira dos suplementos (óleo de cártamo e ácido linoléico conjugado), dos leites (sem adição e com adição de ácido linoléico conjugado) e das dietas (padrão, enriquecida com óleo de cártamo e enriquecida com ácido linoléico conjugado).....	107
Tabela 10. Composição centesimal (g/100g) da dieta padrão e dietas enriquecidas.....	109
Tabela 11. Valores médios \pm desvio-padrão de peso inicial (g) e peso final (g) dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	112
Tabela 12. Valores médios \pm desvio-padrão de consumo de dieta (g/dia), ganho de peso (g/dia) e eficiência alimentar dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	113

Tabela 13. Valores médios \pm desvio-padrão dos pesos do fígado, coração e rins (g de órgão/100 g de peso corporal) nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	116
Tabela 14. Valores médios \pm desvio padrão de triacilglicerol (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e HDL-colesterol (mg/dL) séricos e glicemia plasmática (mg/dL) dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	119
Tabela 15. Valores médios \pm desvio padrão de carga máxima (N) medida em teste biomecânico nos fêmures dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	125
Tabela 16. Valores médios \pm desvio padrão de cálcio (Ca) e fósforo (P), expressos em %, das tíbias dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	126
Tabela 17. Valores médios \pm desvio padrão da densidade óssea dos fêmures expressa em g/cm ³ dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	127
Tabela 18. Valores médios \pm desvio padrão da concentração de adiponectina, grelina e leptina séricos (ng/mL), insulina plasmática (ng/mL) e HOMA-IR dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).....	134
Tabela 19. Caracterização da população de indivíduos do sexo masculino que participou do Projeto de Pesquisa.....	143
Tabela 20. Ingestão diária média \pm desvio padrão de energia e nutrientes dos sujeitos da pesquisa durante o período de intervenção.....	144
Tabela 21. Valores diários de referência, valores de <i>z</i> e valores de <i>p</i> para energia e nutrientes dos grupos placebo e experimentais.....	146
Tabela 22. Valores médios \pm desvio padrão dos teores de glicemia (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL), colesterol total (mg/dL), LDL-colesterol (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), cálcio sérico (mg/dL), fósforo inorgânico (mg/dL), fosfatase alcalina (U/L), uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), TGP (U/L) e TGO (U/L) dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).....	154

Tabela 23. Valores médios \pm desvio padrão dos teores de hemoglobina (g/mL), hematócrito (%), neutrófilo (%), linfócito (%), monócito (%), eosinófilo (%) e basófilo (%) dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).....	156
Tabela 24. Valores médios \pm desvio padrão dos indicadores peso (Kg), altura (cm), IMC (Kg/m ²), CB (cm), CQ (cm), CA (cm), PCT (mm), PCB (mm), PSE (mm), PSI (mm), somatória de dobras cutâneas (mm), massa gorda (Kg) e massa magra (Kg) dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).....	158
Tabela 25. Valores médios \pm desvio padrão da concentração de adiponectina, grelina, leptina e resistina séricos (ng/mL), insulina plasmática (ng/mL) e HOMA-IR dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).....	160
Tabela 26. Valores médios \pm desvio-padrão (n = 55) de aceitação dos leites semi-desnatados com e sem a adição de CLA.....	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HETE – 5-ácido hidroxieicosatetraenóico

ACC – Acetil CoA carboxilase

AG – Ácido graxo

AGM – Ácido graxo monoinsaturado

AGP – Ácido graxo poliinsaturado

AGS – Ácido graxo saturado

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ATP – Adenosina trifosfato

bFGF – Fator de crescimento dos fibroblastos

C/EBP α – Enhancer-binding protein

Cbfa1 – Core binding factor a1

CEMIB – Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CLA – Conjugated linoleic acid/ Ácido linoléico conjugado

COX-2 – Cicloxigenase 2

CPT – Carnitina palmitoil transferase

DENS – Densidade corporal

DEPC – Dimetil pirocarbonato

DEXA – Dual energy X-Ray absorptiometry/ Absorção de duplo feixe de energia

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTA – Etilenodiaminotetracético

EE – Enriquecido Experimental

EP – Enriquecido Placebo

FAS – Fatty acid sintase/ Ácido graxo sintase

GLUT4 – Transportador de glucose dependente de insulina

HDL – High density lipoprotein/ Lipoproteína de alta densidade

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HOMA-IR – Homeostasis model assessment of insulin resistance/ Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina

HTST – High temperature short time/ Alta temperatura em pouco tempo

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-3 – Interleucina 3

IL-6 – Interleucina

IP – Índice de peróxido

IMC – Índice de massa corporal

LDL – Low density lipoprotein/ Lipoproteína de baixa densidade

LHS – Lípase hormônio sensível

LPL – Lípase lipoprotéica

LTB₄ – Leucotrieno B₄

MDA - Malondialdeído

NF-Kappa β – Fator nuclear Kappa β

OETF – Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

OPG – Osteoprotegerina

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PPAR γ – Peroxisome proliferator activated receptor γ / Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ

RANK – Receptor activator of nuclear factor kappa β

RANKL – Receptor activator of nuclear factor kappa β ligand

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

SCD – Stearoil - CoA desaturase/ Estearoil - CoA dessaturase

SE – Suplementado Experimental

SP – Suplementado Placebo

SREBP-1 – Sterol regulatory element binding protein-1

TGF- β – Transforming growth factor β / Fator β de transformação do crescimento

TGP – Alanina aminotransferase

TNF – Tumor necrose factor/ Fator de necrose tumoral

TGO – Aspartato aminotransferase

UCP – Uncoupling proteins/ Proteínas de desacoplamento

UHT – Ultra high temperature/ Temperatura ultra alta

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

VTIS – Vaccum thermal instant sterilizer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	.01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	.06
3 SUJEITOS E MÉTODOS.....	.49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO95
5 CONCLUSÕES.....	.180
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	.183
7 ANEXOS.....	.231

ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO.....	.01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	.06
2.1 Ácido Linoléico Conjugado.....	.07
2.1.1 Histórico.....	.07
2.1.2 Caracterização da Molécula.....	.08
2.1.3 Isômeros.....	.09
2.1.4 Síntese do CLA.....	.10
2.1.4.1 Síntese Biológica.....	.10
2.1.4.1a Síntese via Δ^9 dessaturase.....	.10
2.1.4.1b Biohidrogenação.....	.12
2.1.4.2 Síntese Química.....	.14
2.1.5 Fontes Alimentares e Consumo Humano de CLA.....	.15
2.2 Efeitos Biológicos do CLA.....	.19
2.2.1 Anti-carcinogênico.....	.19
2.2.2 Doenças Cardiovasculares.....	.23
2.2.3 Alteração da Composição Corporal.....	.28
2.2.4 Resposta Imune e Anti-inflamatória.....	.42
2.2.5 Composição Óssea.....	.44
3 SUJEITOS E MÉTODOS.....	.49
3.1 Aprovação dos Protocolos Experimentais pelos Comitês de Ética.....	.50
3.2 Matérias-primas.....	.50
3.2.1 Suplementos.....	.50
3.2.2 Leites Semi-desnatados.....	.50

3.2.3 Leite em Pó.....	51
3.3 Determinação da Composição Centesimal dos Leites Semi-desnatados e do Leite em Pó Desnatado.....	51
3.4 Determinação dos Indicadores de Autoxidação Lipídica dos Suplementos e Dieta. .52	
3.4.1 Determinação do Índice de Peróxido das Amostras (Produto Primário da Autoxidação Lipídica).....	52
3.4.1.1 Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA)	52
3.4.1.2 Dietas (Padrão, Enriquecida com Óleo e Cártamo e Enriquecida com CLA) .	53
3.4.2 Determinação de Malondialdeído – Valor TBA nas Matérias-primas (Produto Secundário da Autoxidação Lipídica).....	54
3.5 Avaliação da Estabilidade Oxidativa dos Suplementos e dos Leites Semi-desnatados.....	55
3.6 Ensaio Biológico	55
3.6.1 Animais Experimentais.....	55
3.6.2 Desenho Experimental.....	56
3.6.3 Dieta	59
3.6.4 Suplementação	62
3.6.5 Obtenção do Soro e Plasma do Sangue dos Animais para a Determinação do Perfil Lipídico e Glicemia	63
3.6.6 Preparo da Carcaça dos Animais para a Determinação da Composição Corporal Centesimal.....	64
3.7 Padronização das Técnicas Analíticas.....	65
3.7.1 Determinação da Composição Centesimal das Dietas Experimentais.....	65
3.7.2 Determinação do Triacilglicerol, Colesterol Total e HDL-Colesterol Séricos e Glicemia Plasmática	65
3.7.3 Determinação do Perfil Ósseo dos Ratos.....	68
3.7.3.1 Ensaio Biomecânico.....	68

3.7.3.2 Determinação de Cálcio e Fósforo	69
3.7.3.3 Determinação da Densidade Óssea.....	69
3.7.4 Determinação da Composição Centesimal	70
3.7.4.1 Proteína Bruta.....	70
3.7.4.2 Umidade	70
3.7.4.3 Cinzas.....	71
3.7.4.4 Extrato Etéreo	71
3.7.5 Determinação do Perfil Hormonal	72
3.7.5.1 Adiponectina Sérica	72
3.7.5.2 Grelina Sérica	73
3.7.5.3 Leptina Sérica	74
3.7.5.4 Insulina Plasmática	75
3.7.6 Determinação da Expressão Gênica das Enzimas Carnitina Palmitoil Transferase II, Ácido Graxo Sintase e dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR) α e γ	76
3.8 Ensaio Clínico.....	78
3.8.1 Seleção do Grupo de Voluntários.....	78
3.8.1.1 Critérios de Inclusão	79
3.8.1.2 Critérios de Exclusão	80
3.8.1.3 Critérios para Suspensão da Pesquisa	80
3.8.2 Desenho Experimental.....	81
3.8.3 Obtenção do Soro e Plasma do Sangue dos Indivíduos para a Determinação da Sorologia, Perfil Bioquímico, Hemograma e Perfil Hormonal	83
3.8.4 Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Consumo Alimentar	84
3.8.5 Determinação da Sorologia, Perfil Bioquímico Sanguíneo e Hemograma.....	84
3.8.6 Determinação da Composição Corporal.....	85

3.8.7 Determinação do Perfil Hormonal	86
3.8.7.1 Adiponectina Sérica	87
3.8.7.2 Grelina Sérica	88
3.8.7.3 Leptina Sérica	89
3.8.7.4 Resistina Sérica	90
3.8.7.5 Insulina Plasmática	91
3.9 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos dos Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA), dos Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA e das Dietas Experimentais.....	92
3.10 Avaliação da Aceitação e da Intenção de Compra dos Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA	93
3.11 Análise Estatística.....	94
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1 Caracterização das Matérias-primas.....	96
4.1.1 Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA e Leite em Pó Desnatado ..	96
4.1.2 Perfil de Ácidos Graxos dos Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA), dos Leites Semi-desnatados com e sem a Adição de CLA e das Dietas Experimentais	97
4.1.3 Estabilidade Oxidativa dos Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA), dos Leites (sem Adição e com Adição de CLA) e das Dietas (Padrão, Enriquecida com Óleo de Cártamo e Enriquecida com CLA).....	102
4.2 Ensaio Biológico.....	108
4.2.1 Dietas Experimentais.....	108
4.2.2 Ganho de Peso e Consumo de Dieta dos Animais Experimentais.....	109
4.2.3 Peso dos Órgãos dos Animais Experimentais.....	114
4.2.4 Perfil Lipídico Sérico e Glicemia Plasmática dos Animais Experimentais.....	117
4.2.5 Perfil Ósseo dos Animais Experimentais.....	123

4.2.6 Composição Corporal Centesimal dos Animais Experimentais.....	131
4.2.7 Perfil Hormonal dos Animais Experimentais.....	133
4.2.8 Expressão Gênica das Enzimas Carnitina Palmitoil Transferase II, Ácido Graxo Sintase e das Isoformas α e γ dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR α e PPAR γ) no Fígado e Tecido Adiposo.....	135
4.3 Ensaio Clínico.....	143
4.3.1 Caracterização da População.....	143
4.3.2 Consumo Alimentar.....	143
4.3.3 Perfil Bioquímico.....	151
4.3.4 Hemograma Completo.....	152
4.3.5 Avaliação da Composição Corporal.....	152
4.3.6 Perfil Hormonal.....	153
4.4 Avaliação da Aceitação e Intenção de Compra das Amostras de Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA.....	174
5 CONCLUSÕES.....	180
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	183
7 ANEXOS.....	231

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 (CHOUIRNAD; 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 Δ^{12} e Δ^{11} *trans*-isomerase. Em seguida, ocorrem reduções das ligações *cis*, até C18:1 *trans-11*, que podem ainda ser reduzidas até C18:0 (CHOUIRNAD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999). Na outra via de produção do CLA o ácido graxo C18:1 *trans-11* sofre dessaturação pela enzima Δ^9 dessaturase presente na glândula mamária e no tecido adiposo (CORL; BAUMGARD; PARIZA, 2000). Sendo assim, pequenas concentrações de CLA estão presentes 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 anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas, 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 (PARK, 2009; BAWA, 2003; CHOUIRNAD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999).

Os resultados a respeito destes efeitos fisiológicos obtidos por nosso grupo de pesquisa nos últimos três anos têm demonstrado que este composto é capaz de reduzir significativamente a gordura corporal, além de promover aumento do conteúdo de minerais em ratos, o que pode indicar aumento da mineralização óssea (BOTELHO *et al.*, 2005a). Embora estes resultados tenham sido observados por vários grupos de pesquisa, os mecanismos pelos quais esta alteração acontece ainda não estão completamente esclarecidos (KAMPHUIS *et al.*, 2003). É importante ressaltar que estes resultados mencionados acima foram obtidos a partir do consumo de CLA na forma de suplemento e, portanto, em quantidades significativamente superiores às aquelas encontradas nos alimentos fontes do composto.

No contexto dos alimentos funcionais, este novo conceito que resgata a relação da alimentação com o processo saúde-doença, o enriquecimento de alimentos com compostos bioativos vem despertando interesse dos pesquisadores da área (OHR, 2005; PSZCZOLA, 2005; SLOAN, 2005). A legislação nacional, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, considera um alimento com alegação de propriedade funcional aquele que possui componentes nutrientes ou não nutrientes com papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano e, um alimento com alegação de propriedade de saúde aquele que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999). Sabe-se que a função biológica de um determinado componente é dependente de inúmeros fatores, dentre eles da maneira como este é veiculado. Um componente administrado por meio de suplementação pode ser utilizado pelo organismo de forma diferente quando comparado com um componente administrado por meio de um alimento enriquecido com o mesmo.

Este último por estar introduzido em um sistema complexo pode sofrer interferências que determinarão sua biodisponibilidade (HOAG; HUSSAIN, 2001; KREBS, 2001).

Ao considerar o exposto acima é de extrema importância uma proposta de avaliação das propriedades biológicas do CLA por meio de alimento enriquecido com este composto, contemplando a legislação nacional de alimentos funcionais. O leite, por ser um alimento de importância fundamental quanto ao seu alto valor nutricional, em especial no que diz respeito ao fornecimento de cálcio e, fazer parte da alimentação habitual humana em todas as etapas da vida, desperta grande interesse para a indústria de alimentos, no sentido de modificá-lo visando o desenvolvimento de um alimento funcional (JONES *et al.*, 2005).

Com o objetivo geral de verificar os efeitos da suplementação em cápsula com ácido linoléico conjugado e do consumo de leite enriquecido com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico e a composição corporal por meio de ensaio biológico com ratos Wistar machos saudáveis em crescimento e por meio de ensaio clínico em indivíduos do gênero masculino com sobrepeso e obesidade grau I, foram enfocados neste trabalho, os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a composição química do leite enriquecido com CLA e das dietas experimentais;
- Determinar o perfil de ácidos graxos do suplemento de CLA, do leite enriquecido e da dieta contendo CLA a fim de obter a concentração dos isômeros predominantes *trans-10*, *cis-12* e *cis-9*, *trans-11*;

- Determinar os indicadores de autoxidação lipídica dos suplementos e das dietas experimentais;
- Avaliar a estabilidade oxidativa dos suplementos e dos leites semi-desnatados;
- Avaliar a aceitação e a intenção de compra do leite enriquecido com CLA;
- Monitorar o ganho de peso e consumo de dieta dos ratos durante o experimento para observação do crescimento;
- Avaliar a ingestão dietética dos sujeitos do estudo;
- Determinar o perfil lipídico dos animais experimentais e dos sujeitos do estudo;
- Determinar o perfil bioquímico e hemograma completo dos sujeitos do estudo;
- Determinar a composição corporal dos animais experimentais e dos sujeitos do estudo;
- Determinar o perfil ósseo dos animais experimentais;
- Determinar o perfil hormonal (leptina, grelina, adiponectina, resistina e insulina) dos animais experimentais e dos sujeitos do estudo;
- Determinar a expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II e ácido graxo sintase e dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) α e γ dos animais experimentais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ácido Linoléico Conjugado

2.1.1 Histórico

Ao final da década de 70, baseado em informações de que carnes grelhadas continham substâncias mutagênicas, Pariza e colaboradores, utilizando carne moída, buscaram a correlação entre a formação destas substâncias, o tempo e a temperatura de cozimento. No entanto, para surpresa destes pesquisadores, além da confirmação da existência de substâncias mutagênicas no extrato da carne, foram encontrados também componentes que apresentavam atividade anti-mutagênica, sendo que estes estavam presentes mesmo quando não eram submetidos à cocção (PARIZA *et al.*, 1983; PARIZA *et al.*, 1979).

Alguns anos depois, 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. Em 1987, Ha; Grimm; Pariza, por meio de técnicas de espectrofotometria e cromatografia, conseguiram isolar e caracterizar estes componentes anti-mutagênicos desconhecidos da fração lipídica da carne. Neste momento, 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) (PARIZA; HARGRAVES, 1985).

2.1.2 Caracterização da Molécula de CLA

O ácido linoléico conjugado (CLA) corresponde a uma série de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienóico (ácido linoléico, 18:2 ω -6), com duplas ligações conjugadas, ou seja, separadas somente por uma ligação simples carbono-carbono, em vez de existirem na configuração interrompida metilênica típicas (Figura 1). Essas configurações podem ser do tipo *cis* ou *trans*, e as duplas ligações estão presentes predominantemente nas posições 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13 (BHATTACHARYA *et al.*, 2006; MOURÃO *et al.*, 2005). O CLA aparece como componente minoritário da fração lipídica, principalmente encontrado na carne bovina, ovina, leite e derivados (YURAWEZ *et al.*, 1999).

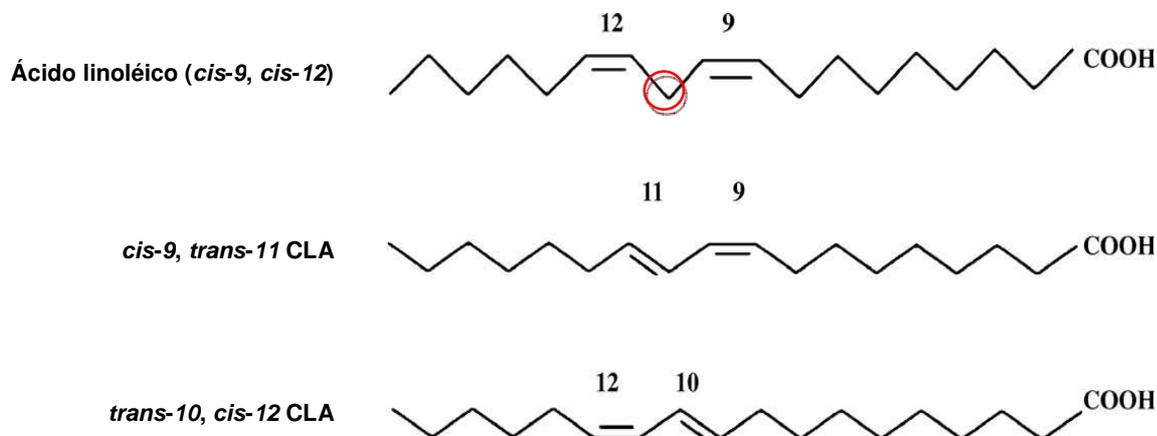


Figura 1. Estrutura do ácido linoléico (*cis*-9, *cis*-12) e dos isômeros do CLA *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12. Adaptado de Pariza, Park e Cook (2001).

2.1.3 Isômeros

Estima-se a existência de 56 possíveis isômeros de CLA. Dentre estes, os isômeros *cis-9, trans-11* e o *trans-10, cis-12* possuem sua atividade identificada e conferem os principais efeitos biológicos benéficos do CLA (FUENTE; LUNA; JUÁREZ, 2006). O isômero *cis-9, trans-11*, mais abundante na natureza com cerca de 80%, é incorporado à membrana plasmática e um potente agente anti-carcinogênico natural (IP *et al.*, 1991; PARIZA; HA, 1990). Já o isômero *trans-10, cis-12* parece estar relacionado ao metabolismo energético e atua como um efetivo agente repartidor de nutrientes (MOURÃO *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 1997). Entretanto, o CLA disponível no mercado é geralmente uma mistura dos isômeros *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12*, na proporção de 1:1, além de outros em menor quantidade (BHATTACHARYA *et al.*, 2006).

Desde seu descobrimento, inúmeros estudos utilizando-se de diferentes modelos experimentais, relacionaram o CLA a outros efeitos positivos que favoreceriam a saúde humana, entre eles: proteção contra doenças cardiovasculares, prevenção e tratamento do diabetes mellitus não insulino dependente, modulação do sistema imune, redução dos efeitos adversos promovidos por imuno-estimulação, potencialização da mineralização óssea, entre outros (PARK, 2009).

2.1.4 Síntese do CLA

2.1.4.1 Síntese Biológica

O CLA pode ser produzido de forma endógena por meio de dois processos: pela dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans-11*, por ação da enzima Δ^9 dessaturase ou estearoil - CoA dessaturase (SCD), presente na glândula mamária e no tecido adiposo e também, no rúmen de animais pela biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta, envolvendo a bactéria *Butyrovibrio fibrisolvens* (CORL *et al.*, 2001).

2.1.4.1a Síntese via Δ^9 dessaturase

Estudos recentes mostram que 90 % do CLA presente na gordura do leite de ruminantes é proveniente da atividade da enzima Δ^9 dessaturase (KAY *et al.*, 2004; CORL *et al.*, 2001). Nesta via o ácido graxo C18:1 *trans-11* (ácido vacênico), um dos intermediários da biohidrogenação no rúmen dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico, sofre incorporação de uma dupla ligação *cis* na posição 9, por meio da dessaturação ocasionada pela enzima Δ^9 dessaturase, presente no intestino, na glândula mamária e no tecido adiposo, originando o isômero *cis-9, trans-11* CLA. Ao considerarmos que nos mamíferos as dessaturações ocorrem até o carbono 9, não

podendo ocorrer além deste, devido à ausência das dessaturases Δ^{12} e Δ^{15} , presente somente nos vegetais, o ácido vacênico não pode ser transformado no isômero *trans-10, cis-12* CLA. Sendo assim, dentre os isômeros de CLA, o *cis-9, trans-11* ocorre em maiores concentrações nos alimentos. 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.

Com o objetivo de certificar a hipótese de que o C18:1 *trans-11* produzido no rúmen, poderia ser transformado em CLA na glândula mamária e no tecido adiposo pela ação da Δ^9 dessaturase, Griinari e colaboradores (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. Para verificar a importância da síntese endógena de CLA por esta via, foi realizado um segundo experimento no qual se infundiu óleo de esterculina, um potente inibidor da Δ^9 dessaturase, no abomaso de vacas. Verificou-se redução de 45 % na concentração da gordura do leite e de outros produtos resultantes da ação da Δ^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 Δ^9 dessaturase, os autores estimaram que 64 % do CLA na gordura do leite de ruminantes foi produzido de forma endógena, confirmando esta via como responsável pela produção da maior parte do CLA no leite (GRIINARI *et al.*, 2000).

Corroborando com estes resultados, Corl *et al.* (2001), apresentaram redução de 60 - 65 % no CLA *cis*-9, *trans*-11 quando vacas receberam dieta adicionada com óleo de esterculina. Também foram observadas reduções de 84 %, 59 % e 46 % para o C14:1 *cis*-9, C16:1 *cis*-9 e C18:1 *cis*-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 avaliar 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 Δ^9 dessaturase.

2.1.4.1b Biohidrogenação

Outra forma de síntese de CLA é por meio da biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados oléico (*cis*-9 C18:1), linoléico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) e α -linolênico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3) pelas bactérias do rúmen. Dentre as bactérias envolvidas neste processo, a *Butyrivibrio fibrosolvens* é a mais comumente encontrada (MARTIN; JENKINS, 2002; KEPLER *et al.*, 1966), porém várias outras possuem a capacidade de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos, e portanto sintetizar CLA, entre elas estão a *Lactobacillus casei*, a *Lactobacillus acidophilus* (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003) e as bactérias do gênero *Propionibacter* (VERHULST *et al.*, 1987). Durante o processo de biohidrogenação, o isômero *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (ácido rumênico) é o primeiro intermediário formado pelas bactérias ruminais e o mais abundante (Figura 2). O processo de isomerização inicial é catalisado pela Δ^{12} *cis*, Δ^{11} *trans*-isomerase. 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. Este ácido graxo pode ser absorvido e incorporado aos tecidos ou sofrer ação de uma redutase, originando a saturação da dupla ligação *cis-9* e, dessa maneira, formando o ácido vacênico (C18:1 *trans-11*). Seqüencialmente, ocorre uma nova redução, resultando na formação do ácido esteárico (C18:0) (CHOUINARD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999).

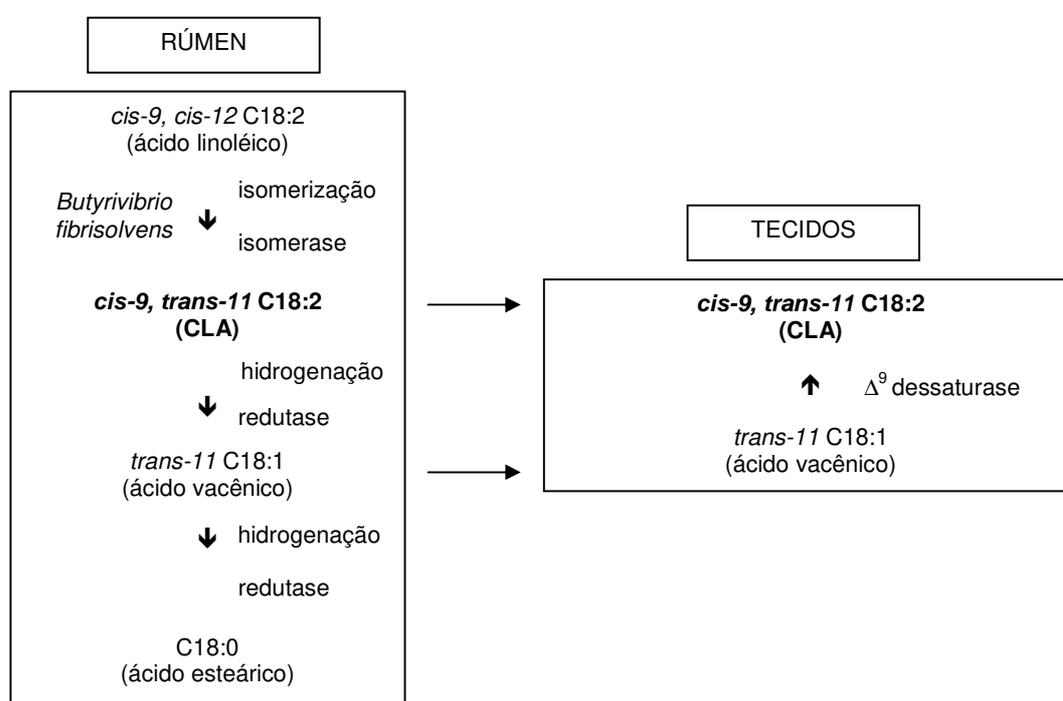


Figura 2. Esquema metabólico proposto para biossíntese de *cis-9, trans-11* C18:2. Adaptado de Chouirnad, Bauman e Baumgard (1999).

Normalmente o processo de 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 (GRILINARI *et al.*, 2000). Da mesma maneira, o *trans-11*

C18:1 (ácido vacênico), pode ser absorvido pelos tecidos, sendo este encontrado em maior quantidade na gordura do leite de ruminantes (MARTIN; JENKINS, 2002).

A quantidade total, assim como a composição e proporção dos ácidos graxos insaturados disponíveis para a deposição no tecido adiposo ou para secreção na gordura do leite dependem de diversos fatores que, por sua vez influenciam a biohidrogenação. Entre eles estão as condições de alimentação, o tipo e a concentração dos ácidos graxos presentes. Estes fatores determinam a microbiota dos ruminantes e, conseqüentemente o pH, que para favorecer a produção de CLA, deve ser superior a 6,0 (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003; MARTIN; JENKINS, 2002).

2.1.4.2 Síntese Química

Outros isômeros de CLA podem ser sintetizados quimicamente a partir do ácido linoléico (C18:2), originando produtos com diferentes composições de ácidos graxos. 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). Em condições alcalinas, com a utilização de álcalis fortes a altas pressões ou soluções concentradas de hidróxido de potássio em propileno glicol e também por meio da hidrogenação parcial o óleo de rícino, assim como o óleo de cártamo, podem ser utilizados como fonte para a produção de misturas de isômeros de CLA (MEDEIROS, 2002).

2.1.5 Fontes Alimentares e Consumo Humano de CLA

Pelo fato do CLA ser sintetizado via Δ^9 dessaturase na glândula mamária e no tecido adiposo e também, pela biohidrogenação incompleta de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais, os alimentos derivados dos ruminantes, particularmente a carne, o leite e os derivados, são as maiores fontes deste composto (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003). Alguns óleos de origem vegetal, como o óleo de cártamo, soja e girassol, também podem conter pequenas quantidades de CLA (Tabela 1). No entanto, devido à escassez de informações disponíveis sobre o conteúdo de CLA nos alimentos, torna-se difícil determinar o consumo dietético do mesmo pela população.

Tabela 1. Valores médios de CLA em diferentes alimentos expressos em mg/g de gordura.

Alimento	Total de CLA (mg/g de gordura)
Leite condensado	7,0
Leite homogeneizado	5,5
Leite semi-desnatado (2%)	4,1
Manteiga (porção lipídica)	6,1
Manteiga (soro)	5,4
Ricota	5,6
Queijo mussarela	4,9
Queijo fundido	5,0
Queijo cheddar	4,1
Queijo parmesão	3,0
logurte natural	4,8
logurte desnatado	4,4

Nata	4,6
Requeijão	4,5
Sorvete	3,6
Carne de vaca	4,3
Carne de cordeiro	5,8
Carne suína	2,6
Carne de frango	0,9
Carne de peru	2,6
Gema de ovo	0,6
Salmão	0,3
Óleo de girassol	0,4
Óleo de amendoim	0,2
Óleo de oliva	0,0

Fonte: Adaptado de GÓMEZ (2004).

O conteúdo de CLA nos alimentos varia em decorrência de numerosos fatores e difere de forma considerável de um alimento para outro. Dentre estes fatores, além dos já mencionados anteriormente como a atividade enzimática e bacteriana, o teor de CLA varia também devido a fatores externos (ALONSO; CUESTA; GILILAND, 2003).

Dessa maneira, 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). O tipo de dieta oferecida ao ruminante não apenas é capaz de aumentar o teor de CLA nos alimentos, como alterar a proporção dos diferentes isômeros. Comparando diferentes condições de alimentação, Dhiman *et al.* (1999) observaram que animais nutridos exclusivamente com pastejo podem atingir

concentrações de CLA na carne superiores daqueles que consumiram forragem e concentrados. 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. Palmquist; 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). Da mesma maneira observou-se maior conteúdo de CLA no leite de animais quando estes receberam dietas enriquecidas com óleos de origem vegetal, como soja e girassol, do que daqueles alimentados com cereais (BANNI, 2002).

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). O conteúdo de CLA pode variar de 3,9 mg/g de lípides no inverno a 22,7 mg/g de lípides no verão (KAMPHUIS *et al.*, 2003). Além da manipulação dietética e condições climáticas, outros fatores relacionados ao animal como raça e seleção genética, assim como as condições de obtenção dos produtos e manipulação, 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).

Embora os seres humanos sejam capazes de sintetizar quantidades muito pequenas de CLA, por meio da ação da Δ^9 dessaturase, os níveis deste composto presentes na corrente sanguínea, assim como incorporados aos tecidos, correspondem a somatória da produção endógena e principalmente da dieta (BANNI, 2002; VAN DEN BERG; COOK; TRIBBLE, 1995).

Estudos científicos realizados com seres humanos estabeleceram como seguro o consumo de 3 g/dia de CLA para obter-se resultados benéficos em relação à saúde (STANTON *et al.*, 1997). Dessa maneira, algumas pesquisas têm sido realizadas a fim de estimar o consumo de CLA pela população (SHAHIN *et al.*, 2003; RITZENTHALER *et al.*, 2001; JIANG; WOLK; VESSBY, 1999; FRITSCHKE; STEINHART, 1998). Um grupo de 51 homens e 51 mulheres foi acompanhado 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). Estes resultados demonstram diferentes valores segundo o sexo, idade e país em que a pesquisa foi realizada. No

entanto, na maioria dos casos a maior porcentagem corresponde ao isômero *cis-9, trans-11* CLA. Considerando os valores encontrados nestes estudos, verifica-se que o consumo de CLA está distante da ingestão recomendada pelos pesquisadores (3 g/dia) para que se observe efeito benéfico (STANTON *et al.*, 1997).

2.2 Efeitos Biológicos do CLA

2.2.1 Efeito Anti-carcinogênico

Dentre os efeitos benéficos do ácido linoléico conjugado, podemos destacar sua atividade anti-tumoral (IP *et al.*, 1999; 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), o cutâneo (BELURY *et al.*, 1996) e o prostático (SONG *et al.*, 2006; OCHOA *et al.*, 2004), os tumores da glândula mamária parecem ser particularmente sensíveis à intervenção deste composto (MAJUMDER *et al.*, 2002). O CLA parece atuar sobre o crescimento e desenvolvimento tumoral em seus diversos estágios (iniciação, promoção, progressão e metástase), por meio da diminuição ou retenção da multiplicação celular. O CLA também atua aumentando a morte celular programada (apoptose) e ainda, sobre a necrose. De forma complementar, o CLA atua sobre o sistema imune, reduz o acúmulo de gordura corporal, o que indiretamente influencia o surgimento de tumores e melhora a caquexia (FIELD; SCHLEY, 2004; PARIZA; PARK; COOK, 1999).

Estudos *in vitro* realizados com linhagens celulares de carcinoma de próstata mostraram que ambos os isômeros, *trans-10, cis-12* e *cis-9, trans-11* CLA, podem apresentar efeitos benéficos (OCHOA *et al.*, 2004; PALOMBO *et al.*, 2002). No entanto, estes diferem em sua atividade e mecanismos de ação, indicando o *trans-10, cis-12* CLA como o isômero mais potente. Dentre os mecanismos de ação propostos para este isômero, estão a modulação da apoptose e controle do ciclo celular. Já para o *cis-9, trans-11* CLA, considera-se sua ação sobre o metabolismo do ácido araquidônico, incluindo alterações na produção de eicosanóides, expressão das enzimas 5-lipoxigenase e cicloxigenase e inibição da ativação do fator nuclear KappaB (NF-kB) (SONG *et al.*, 2006; OCHOA *et al.*, 2004). Embora o CLA tenha demonstrado efeito anti-tumoral em animais experimentais, as pesquisas relacionadas ao câncer de próstata ainda são controversas. Os resultados obtidos até o momento não são conclusivos e sendo assim, não permitem estabelecer uma associação entre a ingestão de CLA e a redução de câncer de próstata em humanos (COHEN *et al.*, 2003; CESANO *et al.*, 1998).

Os estudos que relacionam câncer gastrointestinal e de cólon com CLA, foram realizados em sua maioria por meio de ensaios *in vitro* e experimentação animal (BHATTACHARYA *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2006; OCHOA *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2003; PALOMBO *et al.*, 2002). Dentre os raros estudos em humanos, Larsson; Bergkvist; Wolk (2005) sugerem que a ingestão de produtos lácteos com alto teor de CLA reduza o risco de câncer retal em 13 % e de cólon em 34 %. Mais recentemente, Kuniyasu e colaboradores (2006), observaram inibição de metástase peritoneal de câncer gastrointestinal em humanos. São inúmeros os mecanismos propostos para explicar a ação anti-carcinogênica do CLA frente ao câncer do trato gastrointestinal. Entre eles está a inibição do ciclo celular, sendo o isômero *trans-10, cis-12*, o responsável por tal efeito

(CHO *et al.*, 2006). Um estudo realizado com o isômero *cis-9 trans-11*, apontou este como um potente inibidor do crescimento do câncer de cólon em humanos, relacionando sua atividade com o aumento da peroxidação lipídica e da apoptose celular (BEPPU *et al.*, 2006).

No tocante entre CLA e câncer de mama, resultados *in vitro* indicaram efeitos inibitórios das células MCF-7 de câncer mamário frente à administração deste ácido graxo (CUNNINGHAM; HARRISON; SHULTZ, 1997). Também foram descritos efeitos citotóxicos, de indução da peroxidação lipídica, alteração da atividade de enzimas antioxidantes e conseqüente diminuição das células cancerígenas (O'SHEA *et al.*, 2000; O'SHEA; STANTON; DEVERY, 1999). Outros estudos sugerem que os efeitos supressores poderiam estar relacionados ao ácido araquidônico e alteração do perfil de prostaglandinas (MILLER; STANTON; DEVERY, 2001). Dessa maneira, o CLA estaria vinculado a modulação da enzima 5-lipoxigenase por competição com seu substrato, o ácido araquidônico, provocando redução de seu produto, o 5-ácido hidroieicosatetraenóico (5-HETE) e da expressão de sua proteína ativadora (KIM *et al.*, 2005). O CLA também parece atuar sobre a atividade da cicloxigenase 2 (COX-2) em células MCF-7, cuja super-expressão está associada a tumores malignos. Além destes possíveis mecanismos de ação propostos acima, ao CLA também foi atribuída a capacidade de inibição da proliferação de linhagens celulares de câncer de mama, como a MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10a, sugerindo a regulação da expressão de genes apoptóticos (MAJUMDER *et al.*, 2002).

Estudos com a utilização de animais experimentais também indicaram um possível efeito protetor do consumo de CLA. Ip e colaboradores (1991), demonstraram que ratas ingerindo 10 mg de 7,12 dimetilbenzo-antraceno (substância indutora da

carcinogênese) tiveram 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 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 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 redução de 70 % do 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. Para verificar se manteiga produzida a partir de gordura de leite de vacas enriquecida com CLA, possuía a mesma atividade biológica da mistura de isômeros, Ip e colaboradores (1999) alimentaram ratas Sprague-Dawley durante todo o período da

puberdade. Os animais que consumiram a manteiga mostraram inibição de 53 % na progressão do tumor mamário. Também foi observado acúmulo de *cis-9, trans-11* na glândula mamária e em outros tecidos.

Embora resultados *in vitro* e com animais experimentais tenham indicado efeitos benéficos com a utilização de CLA sobre o câncer de mama, estudos realizados com mulheres não confirmaram esta associação (VOORRIPS *et al.*, 2002). Em estudo de coorte, no qual 209 pacientes com diagnóstico de câncer de mama receberam doses diárias de CLA, não foram encontrados resultados conclusivos de tal suplementação (CHAJES *et al.*, 2003). Da mesma maneira, não foi possível relacionar a ingestão de CLA ao risco de câncer de mama em mulheres pré-menopausa (McCANN *et al.*, 2004).

Verifica-se que independente do mecanismo de ação proposto para explicar o efeito anti-tumoral do CLA, este depende de fatores como tipo de isômero, dose, duração do tratamento, além do tecido e tipo de tumor. Dessa maneira, considerando os resultados expostos pode-se concluir que são necessários novos estudos de intervenção para estabelecer se a ingestão de CLA seria eficaz no tratamento de diferentes tipos de câncer.

2.2.2 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares representam a primeira causa de morte nos países desenvolvidos e vem tomando a mesma proporção nos países em desenvolvimento (LEE; KRITCHEVSKY; PARIZA, 1994). O ácido linoléico conjugado, tem

se mostrado capaz de reduzir o risco das cardiopatias de forma indireta, por meio do controle dos fatores de risco associados, como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e hipertensão, e também de forma direta, como por exemplo, por meio da redução de fatores pró-inflamatórios. A maioria dos estudos que investigam tal efeito benéfico foi realizada com a utilização de animais experimentais, enquanto que os estudos com humanos ainda são escassos e necessitam de maiores investigações.

Trabalhos com animais experimentais demonstraram que o CLA é capaz de reduzir a placa de ateroma. Um estudo realizado com coelhos mostrou que lesões arteriais induzidas experimentalmente foram inibidas após o consumo de CLA. Nesta pesquisa, coelhos foram alimentados com dieta contendo 14 % de lípides e 0,1% de colesterol, configurando uma dieta aterogênica. Posteriormente estes animais foram divididos em dois grupos, que passaram a receber dieta controle ou dieta contendo uma mistura de isômeros de CLA (0,5 g/dia) durante 22 semanas. Ao final, o grupo experimental, suplementado com CLA, apresentou menor nível de aterosclerose (LEE; KRITCHEVSKY; PARIZA, 1994). Da mesma maneira, observou-se regressão das lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas em coelhos que receberam 1 % de CLA durante 90 dias (KRITCHEVSKY *et al.*, 2000). Em subseqüente trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, uma mistura de CLA ou isômeros isolados, na concentração de 1 % em relação a ingestão de dieta, inibiu significativamente a aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol a 0,2 % por 90 dias. No entanto, não houve diferença entre os grupos que receberam CLA. Até mesmo com a utilização de quantidades pequenas, como 0,5 % de CLA em relação a dieta, observou-se redução das lesões ateroscleróticas em coelhos (KRITCHEVSKY *et al.*, 2004).

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 possuírem aterosclerose pré-estabelecida, apresentaram retardo no desenvolvimento de novas lesões, assim como regressão no tamanho das lesões já existentes. Análises imunológicas e químicas apontaram aumento na quantidade de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) 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 γ 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, e conseqüentemente na prevenção de doenças cardiovasculares (RAHMAN *et al.*, 2001; STANGL, 2000).

Estudos realizados com hamsters demonstraram que este modelo animal parece responder de forma diferente 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 anti-aterogênico 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).

Ainda que não haja estudos suficientes que confirmem um possível efeito anti-aterogênico do consumo de CLA em humanos, Mougios *et al.* (2001) mostraram que a suplementação com CLA (0,7 g/dia) durante 4 semanas, diminuiu os níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis. Da mesma maneira, alguns dados sugerem níveis plasmáticos significativamente mais baixos após a ingestão do isômero *cis-9, trans-11* CLA, quando comparados ao grupo controle, em pacientes com histórico de doença aterosclerótica (STACHOWSKA *et al.*, 2005). No entanto, a grande maioria das pesquisas não é satisfatória e demonstra resultados contraditórios. Benito e colaboradores (2001) suplementaram dezessete mulheres com 3,9 g de uma mistura de CLA por 63 dias. Ao

final, não foi observada mudança no perfil dos lípides plasmáticos ou lipoproteínas. 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. Sabe-se que é mais difícil observar reduções lipídicas em indivíduos normolipídicos do que em hiperlipídicos (NELSON *et al.*, 1997). Smedman e Vessby (2001) mostraram que a ingestão de 4,2 g de CLA/dia durante 12 semanas não afetou as concentrações de lípides séricos e lipoproteínas. Nenhum efeito sobre os teores de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-colesterol séricos foi relatado por Petridou; Mougios; Sagredos (2003), quando estes estudaram o efeito da suplementação com 2,1 g de CLA/dia durante 45 dias em mulheres jovens sedentárias.

Embora conflitantes, estudos realizados com a administração de CLA seja por meio de ensaio biológico ou ensaio clínico, tem demonstrado um possível efeito anti-aterogênico deste ácido graxo (STACHOWSKA *et al.*, 2005, PETRIDOU *et al.*, 2003, MOUGIOS *et al.*, 2001, STANGL, 2000; DECKERE *et al.*, 1999; LEE; KRITCHEVSKY; PARIZA, 1994). Algumas das possíveis teorias para explicar tal efeito, sugerem que exista declínio da produção de colesterol, assim como de sua secreção pelo fígado (SAKONO *et al.*, 1999), redução da síntese de triacilgliceróis, associada ao aumento de sua oxidação e maior ativação do PPAR γ (TOOMEY *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2001), inibição da produção de tromboxano e consequente diminuição da agregação plaquetária (STANGL, 2000; TRUITT; McNEILL; VADERHOEK, 1999), potencialização da ação da enzima oxidonítrico sintetase em nível endotelial, assim como atenuação da síntese de algumas prostaglandinas, como por exemplo, a prostaglandina I₂. De maneira geral, os resultados que indicam efeito anti-aterogênico do CLA estão relacionados à sua propriedade anti-inflamatória (ZULET *et al.*, 2005).

Acredita-se que estes resultados controversos sejam explicados pelos seguintes fatores: diferentes efeitos dos isômeros empregados, grande variação das espécies animais utilizadas como modelo experimental, dose, tempo de tratamento, entre outros. Segundo alguns pesquisadores, o isômero *cis-9, trans-11* parece exercer maior efeito anti-aterogênico, ainda que também não exista um consenso a este respeito (BANU *et al.*, 2006). Sendo assim, o aprofundamento do conhecimento sobre as vias de ação e os possíveis efeitos complementares ou antagonistas dos isômeros, merecem maiores investigações e correspondem a uma das principais linhas de investigação atual, para que dessa maneira, seja possível assegurar a utilização do CLA na redução das doenças cardiovasculares em humanos (BHATTACHARYA *et al.*, 2006; BELURY, 2002).

2.2.3 Alteração da Composição Corporal

Na busca por soluções para combater os perigos do excesso de peso frente às suas complicações, como diabetes mellitus, hipertensão, risco cardiovascular, entre outras, existe um crescente interesse a respeito dos benefícios que a suplementação com ácido linoléico conjugado proporciona sobre a composição corporal. Numerosos estudos realizados com animais experimentais e também com humanos, vem demonstrando a capacidade do CLA em reduzir a gordura corporal (BOTELHO *et al.*, 2005b; OSTROWSKA *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1997) e aumentar a massa magra (PARK *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1997), seja por meio do consumo de alimentos enriquecidos ou da suplementação com este composto. No entanto, vale ressaltar que

existe uma grande variação nos resultados observados, devido às diferenças metodológicas adotadas em cada uma das pesquisas realizadas.

Em geral, o CLA administrado nos grupos tratados (experimentais) está na forma de ácido graxo livre, encapsulado, em doses que variam entre 3 a 7,2 g/dia. Já para os grupos placebos (controle) são comumente utilizados óleo de oliva, girassol, soja ou ainda ácido oléico e/ou linoléico. Recentemente, alguns estudos observaram efeitos benéficos com a utilização do CLA após o consumo de alimentos enriquecidos com este ácido graxo, seja de forma intencional ou de maneira natural (DESROCHES *et al.*, 2005; MEINERT; TOUBRO; ASTRUP, 2003). Quanto à caracterização da população estudada, destaca-se que normalmente as pesquisas são realizadas com indivíduos saudáveis, sem que haja controle da ingestão alimentar. No entanto, alguns pesquisadores utilizam unidades metabólicas nas quais existe controle estrito da ingestão alimentar (TERPSTRA, 2004; BENITO *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2000; ZAMBELL *et al.*, 2000). Também vale ressaltar a existência de estudos realizados com indivíduos portadores de síndrome metabólica (RISÉRUS; BERGLUND; VESSBY, 2001). Ainda deve-se considerar o isômero utilizado durante o experimento. Alguns estudos são realizados com isômeros isolados, porém, em sua maioria, são empregadas misturas de isômeros compostas normalmente pelos *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* CLA na proporção de 1:1. Sabe-se que diferentes isômeros exercem atividades biológicas distintas, contribuindo de maneira diferente sobre os efeitos benéficos ou potencialmente adversos da suplementação com CLA. Existem evidências de que dentre estes dois ácidos graxos, o isômero *trans-10*, *cis-12* seja o responsável pelas alterações na composição corporal (PARK *et al.*, 1999). Além das diferenças metodológicas apresentadas, os estudos ainda divergem em relação

ao número de indivíduos, sexo, idade, duração da pesquisa, índice de massa corporal (IMC) adotado, assim como no método de avaliação corporal empregado.

Apesar de tantas variações nas metodologias empregadas nos estudos faz-se necessário reconhecer que o CLA responde de forma diferente dependendo do tecido adiposo em que ele atua (WANG; JONES, 2004). Da mesma maneira, o CLA pode ser influenciado pelo tipo e quantidade de outros componentes da dieta, como proteínas (AKAHOSHI *et al.*, 2004) e lípidos (WANG; JONES, 2004). Estudos recentes revelaram que o CLA tem sua ação diminuída, como agente redutor da massa gorda, quando foram administradas dietas pobres em lípidos (KIMBERLY *et al.*, 2005).

São vários os mecanismos propostos para explicar a alteração na composição corporal ocasionada pelo consumo de CLA, dentre eles estão: 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 envolvidas nos processos de oxidação e síntese de ácidos graxos, modificação da concentração de proteínas reguladoras do consumo alimentar e adipogênese, alteração da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, entre outros (WANG; JONES, 2004).

Os pré-adipócitos são células capazes de proliferar-se facilmente, e este é um dos mecanismos responsáveis por aumentar a deposição de gordura nos tecidos (BELURY, 2002). Várias pesquisas foram realizadas de forma a considerar que a diminuição da proliferação dos pré-adipócitos possa causar redução no acúmulo de gordura. Por meio da utilização de pré-adipócitos 3T3-L1 de roedores, inúmeros estudos demonstraram redução da proliferação das células tratadas com CLA (EVANS *et al.*,

2000; SATORY; SMITH, 1999). De maneira semelhante, pré-adipócitos humanos apresentaram diminuição de 30 a 35 % na proliferação celular quando se administrou CLA (McNELL; MERSMANN, 2001). No momento em que 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 mediada por uma série de fatores de transcrição, dentre eles, particularmente pelo *enhancer-binding protein* (C/EBP α) e pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) (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 estearoil - CoA dessaturase (SCD). Acredita-se que se menos pré-adipócitos diferenciarem-se até adipócitos maduros, pode haver diminuição do número de células potencialmente capazes de armazenar lípidos e conseqüentemente redução do tecido adiposo (PARIZA; PARK; COOK, 2000). Neste sentido, Brodie e colaboradores (1999), demonstraram que culturas de pré-adipócitos 3T3-L1, quando tratadas com uma mistura de CLA, apresentaram menores níveis de PPAR γ . De forma semelhante, pré-adipócitos 3T3-L1 suplementados com CLA também mostraram redução da expressão do C/EBP α (KANG *et al.*, 2003). Corroborando com estes resultados, vários estudos verificaram 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 indicam redução da proliferação celular como conseqüência da inibição de fatores de transcrição e genes envolvidos neste processo.

Do mesmo modo como a inibição da proliferação e diferenciação dos adipócitos, a diminuição do tamanho destas células também contribui para a redução 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 lípides presentes nos 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). Estes mesmos resultados foram reportados por Brown, Evans e McIntosh (2001), quando estes trataram culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 durante os seis 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 ao seu tamanho. Resultados similares foram observados em estudos *in vivo*. Quando ratos Sprague-Dawley foram alimentados com dietas contendo 0; 0,25; e 0,5 % de CLA (97 %) ou com 0,5 % de uma mistura de isômeros de CLA (55 %) por 5 semanas, verificou-se redução significativa ($p < 0,05$) do peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e parametrial dos animais pertencentes ao grupo experimental. Esta redução foi ocasionada pela diminuição no tamanho das células adiposas, uma vez que não foi observado decréscimo do 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 lipase lipoprotéica (LPL) é uma enzima sintetizada no adipócito cuja atuação ocorre na superfície do endotélio epitelial, onde ela atua clivando os ácidos graxos das lipoproteínas circulantes. Estes ácidos graxos então podem ser oxidados ou participarem da ressíntese lipídica pelos adipócitos. Dessa maneira, a síntese de triacilglicerol pode ser alterada pela atividade da LPL. Acredita-se que a diminuição da atividade desta enzima possa restringir os ácidos graxos disponíveis capazes de serem ressintetizados a triacilgliceróis e assim reduzir a deposição lipídica (PARIZA; PARK; COOK, 2001). Park *et al.*, (1997) encontraram redução linear da atividade da lipase lipoprotéica em culturas de adipócitos 3T3-L1 quando estas foram tratadas com uma quantidade crescente (20 a 200 $\mu\text{mol/L}$) de CLA. Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores, identificou redução significativa da atividade da LPL, assim como dos triacilgliceróis e gliceróis intracelulares quando adipócitos 3T3-L1 foram suplementados com o isômero *trans-10, cis-12* CLA (PARK *et al.*, 1999). Da mesma maneira, nosso Grupo de Pesquisa, em projeto anterior, verificou redução da atividade da LPL em cultura de adipócitos 3T3-L1, quando estes foram suplementados com misturas de CLA durante 7 dias (BOTELHO; SANTOS-ZAGO; OLIVEIRA, 2009).

Outras enzimas envolvidas na lipogênese, como a acetil CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) também apresentaram alterações frente a suplementação com CLA. Estas enzimas são responsáveis pela síntese *de novo* de triacilgliceróis 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 por 5 meses. Estes animais apresentaram diminuição de 72 % e 88 % dos níveis de RNAm das enzimas acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase, respectivamente. A expressão gênica de diversas enzimas

lipogênicas é controlada pelo fator de transcrição SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*). Sendo assim, o efeito da suplementação com CLA sobre a expressão do SREBP-1 foi avaliado em algumas pesquisas. A abundância do RNAm deste fator de transcrição reduziu com o tratamento e passou a representar um terço da abundância comparada ao grupo controle (SAKAI *et al.*, 1996). O PPAR γ , 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. Assim, alterações neste transportador resultam em mudanças na conversão de glicose em gordura, especificamente triacilglicerol. 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 (TAKAHASHI *et al.*, 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 α (TNF α). O TNF α é uma citocina capaz de causar apoptose nos adipócitos e dessa maneira reduzir o tecido adiposo (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000). Também

verificou-se aumento de cerca de quatro vezes na incidência de apoptose na gordura retroperitoneal em camundongos tratados com 2 % de CLA após catorze dias (MINER *et al.*, 2001)

Os ácidos graxos representam a principal fonte de energia para muitos tecidos, especialmente para o muscular e o hepático. Grande parte dos tecidos contém pequenas quantidades de lípidos estocados, portanto, o suprimento contínuo de ácidos graxos é proveniente do tecido adiposo. Os ácidos graxos são fornecidos por meio da lipólise, transportados pela corrente sanguínea e atingem as células, onde sofrem oxidação. Alguns estudos demonstraram aumento na razão lipolítica de células 3T3-L1 e em porcos após a administração de CLA (OSTROWSKA *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1997). Embora insuficientes, estes resultados sugerem que o aumento na lipólise possa contribuir para a redução da deposição lipídica.

O aumento da oxidação dos ácidos graxos parece 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, a mitocôndria e o peroxissomo (BELURY, 2002). Estudos indicam que o consumo dietético de CLA induz o aumento da oxidação. Quando ratos foram alimentados com 1 % de uma mistura de isômeros de CLA durante 2 semanas, estes produziram mais cetonas do que os animais controle, que receberam a mesma proporção de ácido linoléico (SAKONO *et al.*, 1999). Neste mesmo contexto, Evans; Brown; McIntosh (2002), verificaram aumento da razão β -hidroxibutirato/acetoacetato, sugerindo que o consumo de CLA teria sido capaz de aumentar a β -oxidação dos ácidos graxos. Estes mesmos pesquisadores observaram aumento da oxidação do ácido oléico em culturas de adipócitos 3T3-L1 que

receberam 50 $\mu\text{mol/L}$ de *trans-10, cis-12* CLA durante 6 dias. A carnitina palmitoiltransferase (CPT) é a enzima responsável pelo transporte inicial de ácidos graxos para o interior da mitocôndria para serem oxidados, assim sendo uma enzima limitante na β -oxidação. Martin e outros (2000) observaram aumento na atividade da CPT no fígado e no tecido adiposo de ratos que consumiram dieta contendo 1 % de *trans-10, cis-12* CLA por 6 semanas. Rahman e colaboradores (2001) também demonstraram aumento da atividade da CPT no tecido adiposo marrom, tecido adiposo perirenal, tecido muscular e fígado em ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLEFT) suplementados com 1 % de CLA na forma de triacilglicerol e na forma de ácidos graxos livres.

O aumento do gasto energético pode ser outro possível mecanismo capaz de diminuir a deposição de gordura em 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 diminuição significativa da deposição de gordura, independente do tipo de dieta consumida e aumento na razão metabólica, sugerindo aumento do gasto energético. Resultados semelhantes 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 subsequentemente redução do tecido adiposo branco.

O tecido adiposo, seja na forma de pré-adipócitos ou adipócitos maduros, é capaz de secretar inúmeros fatores regulatórios (ROMERO; ZANESCO, 2006; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). A leptina, um hormônio sintetizado exclusivamente pelos adipócitos e secretado no plasma, é responsável por sinalizar a saciedade ao hipotálamo. A quantidade de leptina produzida e sua concentração plasmática é

dependente do tamanho do adipócito e do tecido adiposo (HERMSDORFF; VIEIRA; MONTEIRO, 2006; MEDINA *et al.*, 2000). A grelina, um hormônio secretado predominantemente pelo trato gastrointestinal, também é responsável por sinalizar aos centros hipotalâmicos a ingestão alimentar. Desta maneira, estes hormônios regulam o balanço energético, tornado-se um importante mecanismo de manutenção do peso corporal e prevenção da obesidade (ROMERO; ZANESCO, 2006). A resistina e adiponectina são adipocinas secretadas pelos pré-adipócitos e adipócitos maduros, respectivamente. Estas proteínas controlam a utilização de glicose e ácidos graxos pelas células e desta forma, regulam a adipogênese (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Considerando a importância do perfil hormonal no desenvolvimento da obesidade, alguns estudos estão sendo realizados, no sentido de verificar a ação do CLA sobre estes fatores (POIRIER *et al.*, 2005; YAMASAKI *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2001). Ratos 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 similares foram encontrados por Yamasaki e outros (2003), quando níveis de leptina sérica inferiores foram observados em ratos Sprague-Dawley que receberam 0,2 % de CLA por 8 semanas. Mais recentemente, este Grupo de Pesquisa, também observou redução da leptina sérica em ratos Wistar suplementados com 2 % de misturas comerciais de CLA após 42 dias (BOTELHO; SANTOS-ZAGO; OLIVEIRA, 2008). Entretanto, outras espécies, como coelhos e humanos, não apresentaram alterações nos teores de leptina, após o consumo de CLA (CORINO *et al.*, 2002; MEDINA *et al.*, 2000). A suplementação com CLA mostrou-se capaz de inibir a atividade do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) e este, por sua vez, reduziu a expressão dos genes para leptina em roedores e adipócitos (KALLEN; LAZAR, 1996; ZHANG *et al.*, 1996).

Concomitantemente, a incorporação do CLA na fração fosfolipídica das membranas celulares, alterou os sinais de transdução e conseqüentemente a produção de leptina (IP; SCIMECA; THOMPSON, 1994). Estes resultados indicam 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 (Figuras 3 e 4). Contudo, verifica-se que todas as alterações metabólicas que ocorrem propiciam simultaneamente a diminuição da lipogênese e/ou a potencialização da lipólise (PARK *et al.*, 1997).

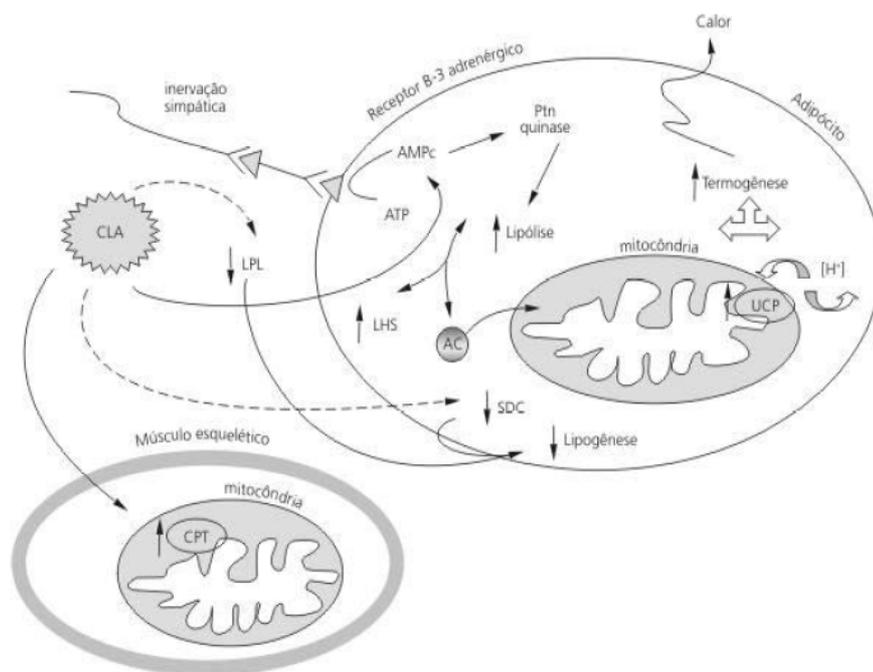


Figura 3. Possíveis mecanismos de ação do ácido linoléico conjugado (CLA) relacionados à composição corporal, em adipócitos e músculo esquelético. Adaptado de Pariza *et al.*, (2001).

AG=ácido graxo; AMPc=adenosina monofosfato cíclico; ATP=adenosina trifosfato; CPT=carnitina palmitoil transferase; LHS=lípase hormônio sensível; LPL=lípase lipoprotéica; SDC=esteroil CoA dessaturase; UCP=Uncoupling proteins/Proteínas de desacoplamento. _____ ativação, - - - - - inibição.

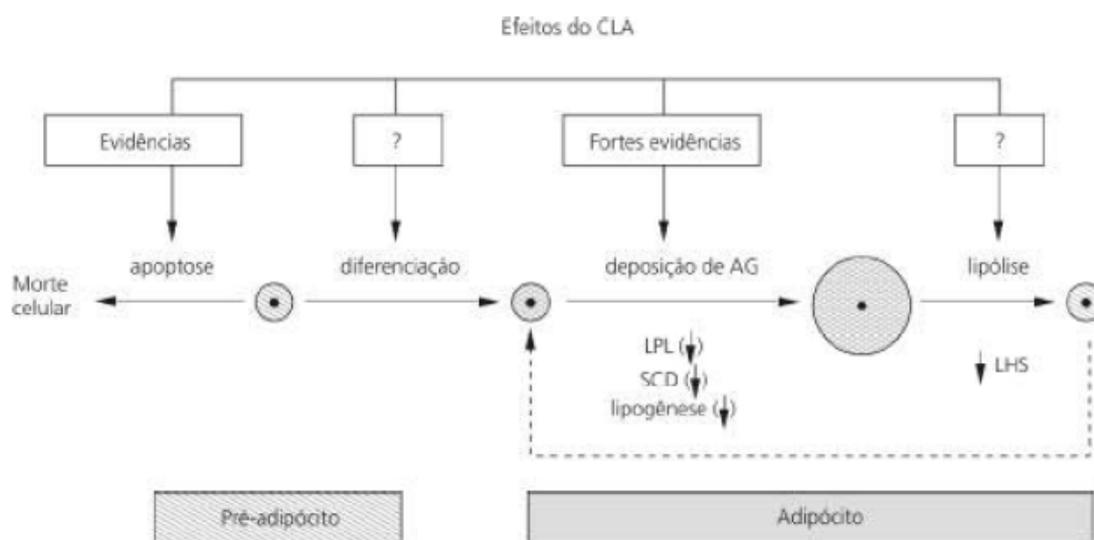


Figura 4. Modelo dos efeitos do isômero *trans-10, cis-12* CLA em adipócitos e pré-adipócitos. Adaptado de Pariza *et al.*, (2001).

AG=ácido graxo; LHS=lípase hormônio sensível; LPL=lípase lipoprotéica; SCD=esteróil CoA dessaturase.

Embora o ácido linoléico conjugado venha sendo cada vez mais utilizado em estudos clínicos que buscam comprovar a eficácia deste ácido graxo na perda de peso e gordura corporal, ainda são escassos os resultados obtidos frente aos inúmeros ensaios biológicos (BHATTACHARYA, 2006). Ainda que muitos destes trabalhos tenham apresentado resultados benéficos com o uso de suplementos de CLA, algumas pesquisas apontam dados não conclusivos sobre a redução de peso e alteração na composição corporal, especialmente quando a casuística é composta por indivíduos eutróficos ou com sobrepeso, classificados segundo o IMC (TRICON *et al.*, 2005).

Um dos primeiros estudos realizado com mulheres adultas saudáveis analisou os efeitos da ingestão de 3 g/dia de CLA durante 64 dias, sobre a massa magra, massa

gorda e percentual de gordura corporal, comparado ao grupo placebo, que recebeu óleo de girassol. Parâmetros como gasto energético, oxidação lipídica e relação de troca gasosa também foram mensurados. O estudo não relatou nenhuma diferença na composição corporal ou em qualquer dos parâmetros avaliados (ZAMBELL, 2000). Quando mulheres jovens sedentárias consumiram 2,1 g CLA/dia durante 45 dias, não foi observada qualquer alteração na composição corporal. A gordura corporal foi medida por meio da tomada das dobras cutâneas em dez diferentes locais (PETRIDOU, 2003). Da mesma maneira, não foi observado nenhum efeito sobre a massa corporal total, massa gorda e massa magra de indivíduos saudáveis e praticantes de atividade física (treinamento de resistência) após a suplementação com 6 g/dia de CLA durante 28 dias (KREIDER *et al.*, 2002).

Paralelamente, alguns estudos observaram resultados positivos após o consumo de suplementos de CLA. Em uma pesquisa realizada por Blankson e outros (2000), foram analisados 47 indivíduos obesos e com 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 diminuição da gordura corporal não dose dependente dos indivíduos pertencentes aos grupos suplementados com 3,4 e 6,8 g/dia de CLA. Contribuindo com estes resultados, Smedman; Vessby (2001) encontraram redução 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. Ainda em 2001, Riserus; Berglund; Vessby avaliou o efeito da ingestão de 4,2 g de CLA/dia durante 4 semanas sobre as mudanças no tecido adiposo e fatores de risco cardiovascular em homens obesos de meia idade com sinais de síndrome metabólica. Nenhum dos fatores foi alterado, exceto o diâmetro abdominal (como uma medida da obesidade abdominal), que diminuiu com o

consumo de CLA. O estudo concluiu que o CLA pode diminuir apenas a massa de gordura abdominal, sem afetar a obesidade global e fatores de risco cardiovasculares.

Alguns estudos buscaram identificar os efeitos benéficos do CLA após o consumo de alimentos enriquecidos com este ácido graxo. Não foi observada qualquer diferença na massa gorda ou massa magra de homens e mulheres obesos de meia-idade, que receberam durante 18 semanas, bebidas lácteas contendo os isômeros purificados de CLA na proporção de 1,5 e 3,0 g/dia (MALPUECH-BRUGERE; VERBOEKET-VAN DE VENNE; MENSINK, 2004). Corroborando com estes resultados, não foram encontradas diferenças no acúmulo de tecido adiposo abdominal e subcutâneo de homens obesos, após a ingestão de manteiga contendo alto ou baixo teor de CLA por 4 semanas (4,22 g/100 g e 0,38 g/100 g de lípidos de manteiga, respectivamente) (DESROCHES *et al.*, 2005).

Esta discrepância observada entre os ensaios biológicos e clínicos pode, em parte, ser explicada pela dose de CLA utilizada. Nos humanos, o teor de CLA administrado é muito inferior às doses utilizadas em animais experimentais. Além disso, vale ressaltar que a maioria dos estudos realizados com modelos experimentais utiliza-se de animais 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).

A variedade metodológica empregada nos ensaios clínicos pode proporcionar certa insegurança quanto aos efeitos da suplementação com CLA, frente à saúde. Neste

sentido, existe uma clara necessidade de mais estudos, principalmente a longo prazo, para determinar o tempo mais adequado de tratamento, a dose necessária para atingir os resultados desejados e fundamentalmente, para esclarecer o perfil metabólico dos indivíduos que podem se beneficiar desta suplementação de ácidos graxos. De forma complementar faz-se necessárias maiores investigações que nos permitam elucidar os mecanismos de ação dos diferentes isômeros bioativos para assim identificarmos as vantagens ou adversidades da utilização do CLA.

2.2.4 Resposta Imune e Anti-inflamatória

O sistema imune atua protegendo os indivíduos dos agentes infecciosos que existem no meio ambiente, como por exemplo, as bactérias e vírus. Este sistema está em constante atividade e pode ser dividido em sistema imune inato e adquirido. Existem importantes variações inter-individuais em muitas das funções imunitárias, que envolvem fatores genéticos, idade, gênero, tabagismo, consumo de álcool, nível de atividade física, ciclo menstrual, estresse, história prévia de vacinas e infecções, dieta, entre outros (BHATTACHARYA *et al.*, 2006; POIRIER *et al.*, 2006).

O estado nutricional é um fator muito importante em relação à imuno competência. Sabe-se que a nutrição inadequada, tanto pela ingestão deficiente de energia e macronutrientes, como por déficit de micronutrientes, ou pela associação de ambas situações, afeta o sistema imune, o que aumenta a susceptibilidade à infecções (CALDER; KEW, 2002). Atualmente, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas em

busca de uma correlação entre a modulação do sistema imune e os lípidos da dieta, destacando-se entre eles, os ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 e os ácidos graxos *trans* (WU, 2004; CALDER, 2001). Neste sentido, considera-se que os ácidos graxos da dieta podem potencialmente alterar as respostas imunes e inflamatórias. Dessa maneira, alguns aspectos das respostas imunes inatas e de adaptação, assim como os mecanismos pró-inflamatórios podem ser afetados tanto positiva quanto negativamente pela suplementação com CLA. No entanto, os mecanismos de ação pelos quais estes eventos ocorrem ainda não estão elucidados (BELURY, 2002).

Para tentar explicar o modo de ação do CLA, foram propostos diferentes mecanismos. O primeiro deles seria por meio da modulação do TNF- α , que por sua vez, seria capaz de alterar o efeito dos eicosanóides. Modificando este efeito seria possível afetar tanto a síntese de citocinas como a função imune. Esta teoria está embasada na capacidade do CLA em inibir a síntese de PGE₂. As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido linoléico via ciclooxigenases. O CLA seria capaz de competir com o ácido linoléico pela absorção e deste modo inibir a produção de PGE₂. Outro mecanismo está relacionado à inter-atuação sobre os PPARs. Os PPARs são receptores dos ácidos graxos que regulam a expressão dos genes, que por sua vez, afetam a homeostase energética e as funções imunes. Sabe-se que os isômeros de CLA são potentes reguladores dos PPARs. Um terceiro fator relevante diz respeito à inativação da transdução do NF- κ B. O CLA parece inibir alguns dos processos inflamatórios modulando dessa forma, a expressão de genes celulares específicos associados à resposta inflamatória e as respostas imunes. Por fim, o CLA seria capaz de apresentar propriedades anti-inflamatórias diretas, regulando a expressão dos mediadores bioquímicos (BHATTACHARYA *et al.*, 2006).

Buscando 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. As células dos animais tratados apresentaram atividade fagocitária duas vezes maior quando comparado às células do grupo controle. Resultados similares foram observados por Yamasaki e outros (2000). 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 aumento na produção de IgG, IgM e IgA pelo baço destes animais.

Em humanos, a atividade do CLA mostrou-se diferente da encontrada em modelos experimentais. Dezesete mulheres saudáveis permaneceram confinadas em uma unidade metabólica durante 93 dias, recebendo nos primeiros 30 dias cápsulas de óleo de girassol (6 g/dia) para adaptarem-se. Ao final deste período, 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. Após o 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).

2.2.5 Composição Óssea

O osso é formado por uma matriz óssea dura e densa composta predominantemente por colágeno (90 %) e outras proteínas (10 %) como a osteocalcina, osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, fatores de crescimento e proteínas séricas (ANDREW; ROSENBERG, 1995). Os demais componentes são células ósseas, que por

sua vez dividem-se em: osteogênicas, encarregadas de dar origem a outros tipos de células; osteoblastos, células responsáveis por sintetizar o componente orgânico da matriz óssea e sua posterior mineralização; osteoclastos, células multinucleares responsáveis por reabsorver as superfícies ósseas e osteócitos, células maduras responsáveis pela manutenção de matriz óssea (AUBIN; LIU, 1996).

O RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa β*), membro de uma família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), se une ao RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa β ligand*), uma citocina presente na membrana das células osteoblasticas e do estroma medular. Esta união estimula a proliferação e a atividade dos osteoclastos, inibindo, por sua vez, a apoptose (DOWNEY; SIEGEL, 2006). Por outro lado, os osteoblastos produzem um receptor solúvel, chamado osteoprotegerina (OPG), capaz de unir-se ao RANKL, impedindo a união RANK-RANKL, e assim sendo apto a inibir a atividade osteoclastica (RAISZ, 2005). O sistema OPG/RANK/RANKL é um dos mais importantes na biologia óssea. Essas proteínas regulam as atividades celulares na remodelação do tecido ósseo e dessa maneira, intervêm na diferenciação e ativação das células ósseas.

Estudos demonstraram que a administração via parenteral de OPG em roedores, produziu aumento da massa óssea e, dessa maneira preveniu a perda induzida pela ovariectomia. Esta mesma ação também é mediada pela leptina. Ratos que não produzem leptina (animais ob/ob e dB/dB, deficientes por mutação gênica e por mutação de receptor de leptina, respectivamente), evidenciaram aumento da massa óssea. No entanto, a massa óssea deveria estar diminuída, uma vez que a influência gonadal que estes animais apresentam, deveria gerar aumento do número de osteoclastos e, por

consequente, da reabsorção óssea, ao mesmo tempo que o excesso de cortisol inibiria a formação dos osteoblastos. Entretanto, ao contrário do esperado, estes animais apresentam ossos com mais trabéculas ósseas e mais resistentes às fraturas. A leptina parece atuar como um regulador específico da diferenciação das células ósseas. Neste sentido, alguns estudos demonstraram que este hormônio possui efeito osteogênico em células do estroma medular, favorecendo a função dos osteoblastos (THOMAS *et al.*, 1999).

Algumas evidências têm apontado que o ácido linoléico conjugado seria capaz de modular a mineralização óssea. Inúmeros estudos indicaram que o CLA altera a concentração de leptina, o que justificaria, de imediato, mudanças no metabolismo ósseo (CORINO *et al.*, 2002; THOMAS; BURGUERA, 2002). O CLA também atua sobre o PPAR γ , β e Δ (MAURIN; CHAVASSIEUX; MEUNIER, 2005), aumentando a atividade da fosfatase alcalina (CUSACK; JEWELL; CASHMAN, 2005), em conjunto com os ácidos graxos poliinsaturados ω -3, reduzindo a perda óssea em ratas ovariectomizadas (SCHLEMMER *et al.*, 1999; SAKAGUCHI; MORITA; MUROTA, 1994) e aumentando a formação óssea em ratas em crescimento (WATKINS; SEIFERT, 2000; LI; WATKINS, 1998). Estes resultados podem ser explicados pela regulação da gênese dos osteoclastos pela influência sobre o *Cbfa1* (*core binding factor a1*) (DUCY, 2000). Este fator de transcrição específico é necessário para a formação da matriz extracelular que posteriormente irá se mineralizar. Nestas duas situações citadas acima, as prostaglandinas, particularmente a PGE_2 , produzidas no tecido ósseo pela ação da COX-2, estimulam a RANKL e inibem a osteoprotegerina (PILBEAM; HARRISON; RAISZ, 2002).

A PGE₂ modula os efeitos da vitamina D₃ (COLLINS; CHAMBERS, 1992), das citocinas TNF- α (TASHJIAN *et al.*, 1987) e interleucina-3 (IL-3) (COLLINS; CHAMBERS, 1992) e dos fatores de crescimento TGF- β (TASHJIAN *et al.*, 1985), PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) (TASHJIAN *et al.*, 1982) e bFGF (fator de crescimento dos fibroblastos) (HURLEY *et al.*, 1998), facilitando a reabsorção óssea. A PGE₂ atua de duas formas distintas sobre os osteoclastos. Quando age de maneira direta, os osteoclastos são inibidos. No entanto, os precursores dos osteoclastos regulam a diminuição de seus próprios receptores, EP2 e EP4, durante sua diferenciação, e dessa maneira, não sofrem influência dos efeitos inibitórios da PGE₂ sobre a reabsorção óssea. A interleucina-6 (IL-6) é capaz de aumentar a produção de PGE₂ a partir da COX-2 e induzir a supressão da síntese de OPG pelos osteoblastos. No entanto, existe uma ação cruzada entre PGE₂ e IL-6 favorecendo a diferenciação dos osteoclastos via sistema OPG/RANK/RANKL em células ósseas (LIU *et al.*, 2005). Neste sentido, sabe-se que é possível regular a atividade e a expressão da COX-2 e a PGE₂, mediante intervenções dietéticas, por meio de um balanço adequado de ácidos graxos poliinsaturados ω -6 e ω -3, capazes por si só, de diminuir a expressão da COX-2 (ARNAL *et al.*, 2001).

A incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados ω -3 nas articulações produz redução da expressão e atividade das enzimas que degradam os proteoglicanos, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a expressão da COX-2 (CURTIS *et al.*, 2000), sugerindo que o perfil lipídico dietético tem impacto sobre a formação de cartilagem. O CLA diminui a concentração de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados ω -6 e aumenta a de ω -3 e saturados. Dessa forma, os efeitos de determinadas ações metabólicas ocorrem a partir dos ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (WATKINS; LI; SEIFERT, 2001).

Estudos demonstram que o CLA diminui a reabsorção óssea em ratos ovariectomizadas (KELLY; CASHMAN, 2004) e quando consumido de maneira conjunta com ácidos graxos poliinsaturados ω -3 melhora a absorção de cálcio (MURPHY *et al.*, 2006; KELLY *et al.*, 2003). Um estudo realizado com 136 mulheres pós-menopausa com idade média de 68,6 anos, observou que a ingestão de CLA associada a suplementação de cálcio, aumentou a massa óssea das mesmas, avaliada por meio de raio-X e DEXA. Vale destacar que o principal isômero de CLA relacionado a este estudo foi o *cis*-9, *trans*-11, e não o *trans*-10, *cis*-12. (BROWNBILL; PETROSIAN; ILICH, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados quando verificou-se o efeito do consumo de CLA em indivíduos praticantes de atividade física (BANU *et al.*, 2006). Outros estudos relataram que o CLA melhorou a absorção de cálcio *in vivo* e na linhagem celular adenocarcinoma CaCo2 de cólon humano, sugerindo que o CLA possa aumentar o efeito do cálcio na massa óssea (PARK; PARIZA; PARK, 2008; MURPHY *et al.*, 2006; JEWELL; CUSACK; CASHMAN, 2005; JEWELL; CASHMAN, 2003; KELLY *et al.*, 2003, ROCHE *et al.*, 2001). Contudo, outros estudos não observaram diferença após a suplementação com CLA em marcadores para a saúde óssea e densidade mineral óssea (DOYLE *et al.*, 2005; GAULLIER *et al.*, 2004; KREIDER *et al.*, 2002). Sendo assim, mais estudos de longa duração da interação entre cálcio e os isômeros do CLA tornam-se necessários para elucidar o efeito do CLA sobre a saúde óssea.

3 SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 Aprovação dos Protocolos Experimentais pelos Comitês de Ética

O ensaio biológico e o ensaio clínico seguiram todos os requisitos éticos e receberam aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP - Protocolo nº 1098-1 e do Comitê de Ética em Pesquisa/FCM/UNICAMP - Protocolo nº 493/2006 (Anexos 1 e 2, respectivamente).

3.2 Matérias-primas

3.2.1 Suplementos

Foram utilizados óleo de cártamo (óleo de sementes de *Carthamus tinctorius* L.) e mistura comercial de CLA Tonalin® fornecidos por doação pela Cognis Brasil Ltda.

3.2.2 Leites Semi-desnatados

Os lotes de leite semi-desnatado enriquecido com CLA e de leite semi-desnatado sem adição de CLA (placebo) foram produzidos e fornecidos pelo Grupo Perdigão, Divisão Elegê Alimentos. Para a elaboração do leite enriquecido com CLA, um

lote de leite desnatado (0,5 % de gordura) foi adicionado de 0,6 % da mistura comercial de CLA Tonalin® TG80 para a obtenção de um leite semi-desnatado com 1,1 % de gordura, caracterizando dessa forma, o leite semi-desnatado enriquecido com CLA. Já o lote de leite sem a adição de CLA (placebo) sofreu desnate até atingir o mesmo teor lipídico (1,1 % de gordura), caracterizando assim um leite semi-desnatado sem a adição de CLA. Ambos os lotes passaram por tratamento térmico UHT com injeção direta de vapor (VTIS – *Vacuum thermal instant sterilizer*) a 144°C, e foram envasados em embalagem branca Tetra Square.

3.2.3 Leite em Pó

A fonte protéica utilizada para a elaboração das dietas experimentais do ensaio biológico foi leite em pó desnatado fornecido pelo Grupo Perdigão, Divisão Elegê Alimentos cujo teor de proteína bruta era de $34,94 \pm 0,32$ %.

3.3 Determinação da Composição Centesimal dos Leites Semi-desnatados e do Leite em Pó Desnatado

As análises da composição centesimal dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e do leite em pó desnatado foram realizadas pelo Grupo Perdigão, Divisão Elegê Alimentos. As proteínas totais, lipídios e cinzas foram determinados segundo a

Instrução Normativa nº 68/06 (BRASIL, 2006). A lactose foi determinada segundo Pereira *et al.* (2001) e a umidade segundo o método FIL 9C (WHO, 1987).

3.4 Determinação dos Indicadores de Autoxidação Lipídica dos Suplementos e Dietas

3.4.1 Determinação do Índice de Peróxido das Amostras (Produto Primário da Autoxidação Lipídica)

3.4.1.1 Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA)

Realizou-se a determinação do índice de peróxido utilizando o método oficial da AOAC (1995), o qual é baseado na oxidação do iodo na presença de iodeto de potássio pelos peróxidos presentes na amostra, assumindo-se que todas as substâncias oxidantes presentes na amostra são peróxidos. Para esta análise, aproximadamente 4 g de amostra foram dissolvidos em 30 mL da solução de ácido acético:clorofórmio (3:2). Em seguida adicionou-se 0,5 mL da solução de iodeto de potássio saturada deixando a reação ocorrer por 1 minuto e então adicionou-se 30 mL de água destilada fervida. Utilizando 0,5 mL de solução de amido 1 % em água como indicador, realizou-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,02 N previamente padronizado. Os resultados foram expressos em mEq/kg de amostra. As determinações foram realizadas em sextuplicata.

3.4.1.2 Dietas (Padrão, Enriquecida com Óleo e Cártamo e Enriquecida com CLA)

Para a determinação do índice de peróxido, foi necessária a extração prévia dos lipídios totais de cada dieta, a qual foi feita utilizando o método de Bligh; Dyer (1959). Cerca de 3 g de amostra, em sextuplicata, foram homogeneizados em 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água, seguido de agitação rotativa e contínua durante 30 minutos. Após esta etapa adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio 1,5 % em água, seguida de agitação vigorosa e contínua durante 2 minutos. Após a diluição e separação completa das fases, a camada superior metanólica, contendo água e os compostos não lipídicos, foi succionada e a camada inferior clorofórmica, contendo os lipídios totais, foi filtrada em papel de filtro quantitativo para obtenção de uma solução límpida. Ao final desse procedimento obtiveram-se os lipídios diluídos em 20 mL de clorofórmio. Desse volume transferiu-se uma alíquota de 5 mL de cada repetição, para uma placa de Petri previamente tarada, que foi levada para a estufa a 100 °C para a evaporação do solvente. Após o resfriamento em dessecador, as placas foram pesadas e a porcentagem de lipídios totais foi calculada. Com o volume restante e imediatamente após a extração dos lipídios realizou-se a determinação do índice de peróxido utilizando o método oficial da AOAC (1995), já descrito acima. Para o cálculo do índice de peróxido foi considerada a quantidade de lipídios presente na solução clorofórmica resultante do procedimento de extração dos lipídios segundo Bligh; Dyer (1959).

3.4.2 Determinação de Malondialdeído – Valor TBA nas Matérias-primas (Produto Secundário da Autoxidação Lipídica)

A determinação de malondialdeído (MDA), uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, foi feita nos suplementos (controle e CLA) e nas dietas (padrão, enriquecida com óleo de cártamo e enriquecida com CLA) a partir de aproximadamente 0,1 g e cerca de 0,2 g de amostra, respectivamente, e em sextuplicata. O método utilizado para esta análise foi o proposto por Sinnhuber e Yu (1958), que tem como princípio básico a formação de um pigmento vermelho-róseo composto por 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico e 1 de malonaldeído, cuja absorbância pode ser lida em luz visível no comprimento de onda de 535 nm. O procedimento consistiu na administração das quantidades de amostra referidas acima em balões de fundo redondo de 250 mL, seguida da adição de 5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico 0,1 N, 5 mL de água, 5 mL de ácido clorídrico 0,6 N e 10 mL da solução de ácido tricloroacético 20 % em água. Os balões foram conectados aos condensadores e procedeu-se a destilação por refluxo durante 30 minutos em banho-maria fervente. Após esta etapa, acrescentou-se 75 mL de ácido clorídrico 0,6 N e continuou-se o refluxo por mais 10 minutos. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo e a absorbância foi determinada a 535 nm em espectrofotômetro Beckman CoulterTM, modelo DU-640 (utilizando a solução de ácido 2-tiobarbitúrico para calibração). Os resultados foram expressos em unidades de absorbância a 535 nm e em valor TBA, ou seja, mg de malonaldeído/kg de amostra.

3.5 Avaliação da Estabilidade Oxidativa dos Suplementos e dos Leites Semi-desnatados

A estabilidade oxidativa foi avaliada com base no consumo de oxigênio pela amostra em equipamento Oxipress™ (90°C, 5.00 bar) (TROJÁKOVÁ; RÉBLOVÁ; POKORNÝ, 2001).

3.6 Ensaio Biológico

3.6.1 Animais Experimentais

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizados ratos Wistar, albinos, machos, saudáveis, recém-desmamados com idade entre 21 e 23 dias, com peso médio de $56,7 \pm 11,4$ g, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Durante todo o período experimental os animais receberam dieta e água potável sob o sistema de livre acesso e permaneceram em ambiente com temperatura e umidade do ar controlada em uma faixa de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e 60-70 % respectivamente e, sob ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.6.2 Desenho Experimental

Cem ratos permaneceram em período de aclimação por 10 dias recebendo dieta padrão e água potável sob o sistema de livre acesso. Após este período os animais foram divididos em 4 grupos de 20 animais cada, objetivando a homogeneidade quanto ao peso corporal tanto intra quanto intergrupo. Os 20 animais restantes foram destinados ao grupo referência (Tempo 0). Durante o período experimental, a avaliação do consumo de dieta e água e a verificação do ganho de peso corporal foram realizadas a cada dois dias.

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

- **Grupo SP (Suplementado Placebo):** recebeu dieta padrão + 2 % (m/v) em relação ao consumo diário de dieta de **óleo de cártamo** por meio de **entubação orogástrica**;
- **Grupo SE (Suplementado Experimental):** recebeu dieta padrão + 2 % (m/v) em relação ao consumo diário de dieta de **ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®)** por meio de **entubação orogástrica**;
- **Grupo EP (Enriquecido Placebo):** recebeu **dieta enriquecida** pela adição de 2 % de **óleo de cártamo**;
- **Grupo EE (Enriquecido Experimental):** recebeu **dieta enriquecida** pela adição de 2 % de **ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®)**.

As análises foram realizadas em três momentos do experimento: antes de iniciar os tratamentos; estas análises foram consideradas como **grupo de referência**

(Tempo 0), ao final de 4 semanas **(Tempo 1)** e ao final de 8 semanas **(Tempo 2)**. Ou seja, dos cem animais iniciais, após a divisão dos grupos, vinte foram mortos sem sofrer nenhum tipo de tratamento, caracterizando o Tempo 0 (T0). Os oitenta animais restantes permaneceram alojados individualmente durante todo o ensaio em gaiolas de crescimento. Dessa maneira, após 4 semanas, 40 animais (10 animais de cada grupo) foram mortos, caracterizando o Tempo 1 (T1) e ao final, os 40 animais restantes (10 animais de cada grupo) foram mortos após 8 semanas, caracterizando o Tempo 2 (T2), conforme a Figura 5.

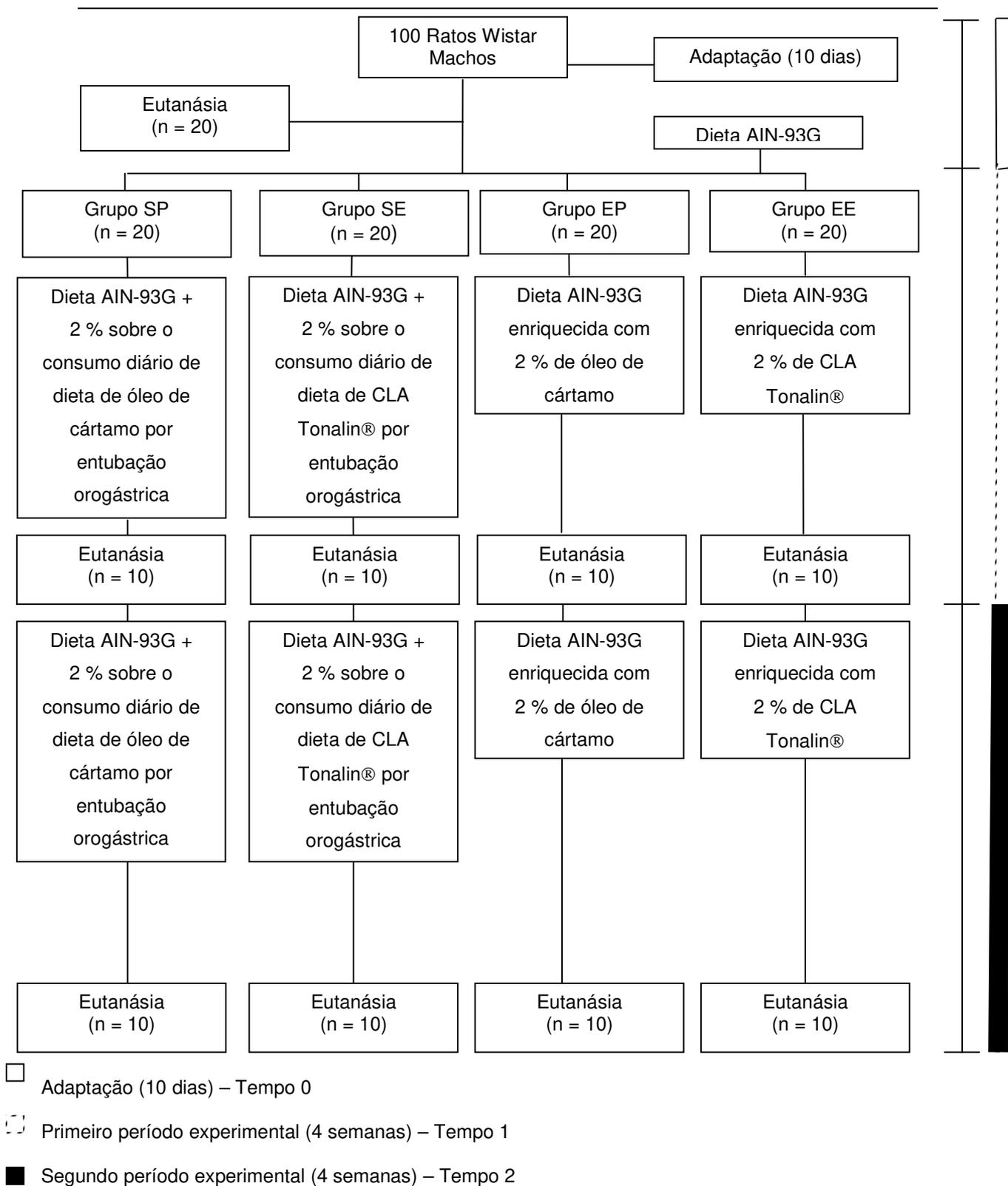


Figura 5. Esquema do delineamento experimental do ensaio biológico.

3.6.3 Dieta

A dieta utilizada foi a AIN-93G modificada elaborada conforme o *American Society for Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) com concentração de proteína bruta de 12 % (GOENA *et al.*, 1989). A fonte protéica utilizada foi leite em pó desnatado com conteúdo de 34,94 ± 0,32 % de proteína bruta. O amido de milho era proveniente de Corn Products Brasil 3408 e o amido dextrinizado de Corn Products Brasil 1910. Devido ao conteúdo de lactose (53,59 ± 0,42 %) naturalmente presente no leite em pó desnatado, utilizado como fonte protéica, não foi adicionado à dieta a fonte de dissacarídeo (sacarose) preconizada pela AIN-93G. O óleo de soja era da marca Lina; 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 2) e a mistura vitamínica (AIN-93G-VX) (Tabela 3) eram aquelas preconizadas pelo *American Society for Nutrition* para dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Durante o período de adaptação todos os animais receberam a mesma dieta (dieta padrão). Após a divisão dos grupos experimentais, os grupos SP e SE, permaneceram consumindo dieta padrão. Já os grupos EP e EE passaram a consumir dieta modificada acrescida de 2 % de óleo de cártamo ou CLA Tonalin®, respectivamente. As dietas experimentais foram formuladas conforme a Tabela 4.

Tabela 2. Mistura mineral AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Ingredientes	g/kg
Elementos minerais essenciais	
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 ₂ O – 54,34 % Mo	0,00795
Elementos minerais potencialmente benéficos	
Meta-silicato de sódio, 9H ₂ O – 9,88 % Si	1,45
Sulfato de potássio crômico, 12H ₂ 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 3. Mistura vitamínica AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Ingredientes	g/kg
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 ₁₂) (0,1 % em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- α -tocoferol (E) – 500 UI/g	15,00
Palmitato de all- <i>trans</i> -retinol (A) – 500.000 UI/g	0,800
Colicalciferol (D3) – 400.000 UI/g	0,250
Filoquinona (K)	0,075
Maltodextrina em pó (q.s.p.)	974,655

Tabela 4. Composição da dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Ingredientes	Dieta AIN-93G	Dieta AIN-93G	Dieta AIN-93G
	Padrão/ Grupos SP e SE (g/kg)*	Grupo EP (g/kg)	Grupo EE (g/kg)
Amido de milho	363,225	363,225	363,225
Amido de milho dextrinizado	120,528	120,528	120,528
Leite em pó desnatado (34,94 %)	345,720	345,720	345,720
Sacarose	-	-	-
Óleo de soja	70,000	70,000	70,000
Óleo de cártamo	-	20,000	-
CLA Tonalin®	-	-	20,000
Fibra	50,000	50,000	50,000
Mistura mineral	35,000	35,000	35,000
Mistura vitamínica	10,000	10,000	10,000
L-cistina	3,000	3,000	3,000
Bitartarato de colina	2,500	2,500	2,500
Tert-butil hidroquinona	0,014	0,014	0,014

* Animais dos grupos SP e SE receberam 2 % (m/v) sobre o consumo diário de dieta de óleo de cártamo e CLA, respectivamente, o que torna o consumo de energia similar entre os grupos.

3.6.4 Suplementação

Os grupos SP (Suplementado Placebo) e SE (Suplementado Experimental) 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 0,26 a 0,40 mL para o Grupo SP e de 0,28 a 0,40 mL para o Grupo SE. 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 foram suplementados. Este procedimento ocorria diariamente às 14h00, visto que os roedores possuem hábitos noturnos e neste horário estavam menos saciados.

3.6.5 Obtenção do Soro e Plasma do Sangue dos Animais para a Determinação do Perfil Lipídico e Glicemia

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 período do experimento (T0, T1 e T2). 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, para a obtenção do soro e com anticoagulante fluoreto de sódio e K₃EDTA, para a obtenção do plasma. Os tubos repousaram em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos (adaptado de CARVALHO, 1999). Posteriormente, o soro e o plasma sobrenadantes foram separados, utilizando uma pipeta e acondicionados em microtubos de polipropileno

até o momento das análises. Em seguida as amostras foram armazenadas em Freezer Ultra Low a -80 °C.

3.6.6 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 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 a - 80 °C.

No momento da eutanásia, fígado, coração e rins foram retirados, pesados em balança semi-analítica e devolvidos à carcaça limpa, com exceção do fígado que foi utilizado para a determinação da expressão gênica (item 3.7.6).

3.7 Padronização das Técnicas Analíticas

3.7.1 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 lípidios totais foram determinados segundo o método descrito por Bligh; Dyer (1959).

3.7.2 Determinação do Triacilglicerol, Colesterol Total e HDL-Colesterol Séricos e Glicemia Plasmática

As análises de triacilglicerol, colesterol total e HDL-colesterol do soro e glicemia do plasma foram realizadas utilizando-se kits enzimáticos comerciais, color AA, enzimático AA, reactivo precipitante e enzimático AA, respectivamente, provenientes do Laboratório *Wiener*.

Na determinação do triacilglicerol, o glicerol liberado da hidrólise dos triacilgliceróis, catalizada pela enzima lípase lipoproteína é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-1-fosfato. Este é oxidado pela glicerolfosfato oxidase a

dihidroxiacetonafosfato e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio acopla-se a 4-aminofenazona e ao clorofenol produzindo quinoneimina, que tem absorvidade máxima em 505 nm. As análises foram feitas em triplicata, adicionando-se 1 mL de reagente de trabalho a 10 µL de soro, incubando-se em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, sendo que uma concentração de triacilglicerol de 200 mg/dL foi usada como padrão. A absorvância dos testes e do padrão foi lida em luz visível no comprimento de onda de 505 nm, em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus, após calibração do equipamento 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 colesteno-3-ona e peróxido de hidrogênio. Este, na presença da peroxidase, oxida o fenol e a 4-aminofenazona formando a quinoneimina, que tem absorvidade máxima em 505 nm. As análises foram feitas em triplicata, adicionando-se 1 mL de reagente de trabalho a 10 µL de soro, incubando-se em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, sendo que uma concentração de colesterol de 200 mg/dL foi usada como padrão. A absorvância dos testes e do padrão foi lida em luz visível no comprimento de onda de 505 nm, em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus, após calibração do equipamento com o branco.

Na determinação do HDL-colesterol, as lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL-colesterol), precipitam-se seletivamente mediante o acréscimo de sulfato de dextrana e íons Mg^{+2} . O sobrenadante, separado por centrifugação, é utilizado para determinar o HDL-colesterol, empregando-se o sistema enzimático para a determinação de colesterol total. Inicialmente 50 µL de reagente precipitante foram adicionados a 500 µL de soro, permanecendo por 35 minutos sob refrigeração. Após

centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante limpo foi utilizado como amostra. As análises foram feitas em triplicata, adicionando-se 2 mL de reagente de trabalho a 100 µL de sobrenadante, incubando-se em banho-maria a 37 °C por 5 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 505 nm, em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus, após calibração do equipamento com o branco.

Na determinação da glicemia plasmática, a glicose foi oxidada pela glicose oxidase resultando em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este, na presença da peroxidase, oxida a 4-aminofenazona e a 4-hidroxibenzoato formando quinoneimina, que tem absorvidade máxima em 505 nm. As análises foram feitas em triplicata, adicionando-se 1 mL de reagente de trabalho a 10 µL de plasma, incubando-se em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, sendo que uma concentração de glicose de 100 mg/dL foi usada como padrão. A absorbância dos testes e do padrão foi lida em luz visível no comprimento de onda de 505 nm, em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus, após calibração do equipamento com o branco.

3.7.3 Determinação do Perfil Ósseo dos Ratos

3.7.3.1 Ensaio Biomecânico

Foram realizados ensaios biomecânicos de flexão de três pontos, nos diferentes grupos experimentais, para determinar as propriedades mecânicas dos ossos. Após a eutanásia, os fêmures direitos foram obtidos por meio da retirada dos tecidos moles com a utilização de bisturi e tesoura. Os ossos foram individualmente envoltos em gases umedecidas com solução salina (0,9 % de NaCl) e congelados em Freezer Ultra Low a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o ensaio, os ossos foram descongelados 12 horas antes e mergulhados em solução salina (0,9 % de NaCl), onde permaneceram por mais 4 horas aproximadamente (MELLO; GOMIDE, 2005; FONSECA; WARD, 2004).

No momento do ensaio utilizou-se o equipamento MTS modelo TestStar II, da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/UNICAMP), acoplado a uma célula de carga com a capacidade de medir até 100 Kgf. A carga foi aplicada na face ântero-posterior devido a melhor acomodação ao suporte. Os ossos foram apoiados sobre dois suportes distanciados em 15 mm. A força foi aplicada na porção medial óssea, a uma velocidade constante de 5 mm/minuto, até o momento da ruptura do osso. A cada incremento de carga aplicada registrou-se a deformação correspondente para a construção do gráfico carga x deformação, por meio de um *software* acoplado ao equipamento. A partir deste gráfico foi calculada a carga máxima (N), ou seja, maior carga aplicada durante o ensaio.

3.7.3.2 Determinação de Cálcio e Fósforo

A determinação do conteúdo de cálcio e fósforo foi realizada no Laboratório CBO - Assessoria & Análise. Após a eutanásia dos animais, as tíbias direitas foram obtidas por meio da retirada dos tecidos moles com a utilização de bisturi e tesoura previamente descontaminados com uma solução de EDTA 0,1 % por 24 horas. Os ossos foram individualmente armazenados em tubos de vidro previamente descontaminados com solução de ácido nítrico 10 % por 24 horas e congelados em Freezer Ultra Low a -80 °C. Foi realizada a calcinação da tíbia até a obtenção de cinzas brancas, e posteriormente as amostras foram solubilizadas em ácido clorídrico a 37 %. Em seguida, a amostra foi diluída até o volume final de 100 mL. O conteúdo de cálcio e fósforo foi determinado por meio de espectrometria de emissão atômica e método colorimétrico (420 nm), respectivamente (CARVALHO, 2001).

3.7.3.3 Determinação da Densidade Óssea

Após o ensaio biomecânico, os fêmures foram mantidos em provetas de 10 mL previamente identificadas, preenchidas com água destilada, e colocados em dessecador durante 24 horas para retirada do ar dos poros ósseos com o auxílio de uma bomba de vácuo. Ao considerar que o osso estava imerso por ocasião da retirada de ar dos poros, a água ocupou o espaço liberado. Pelo princípio de Arquimedes, obteve-se o volume do osso para cálculo da densidade óssea (MELLO; GOMIDE, 2005).

3.7.4 Determinação da Composição Centesimal

3.7.4.1 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.

3.7.4.2 Umidade

Cerca de 2 g de amostra eram pesados em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. As amostras eram levadas à estufa a 105 °C até peso constante e em seguida colocadas em dessecador para esfriar. Depois de frio, o conjunto

cadinho mais amostra seca foi 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.

3.7.4.3 Cinzas

Para esta determinação eram 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).

3.7.4.4 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 (LEES, 1979).

3.7.5 Determinação do Perfil Hormonal

As análises de adiponectina, grelina e leptina séricas, assim como de insulina plasmática foram realizadas utilizando-se os seguintes kits de método imunoenzimático (ELISA): EZRADP-62K, EZGAC-86K, EZRL-83K e EZRMI-13K, respectivamente, provenientes do Laboratório Linco Research. Neste método de detecção imunológica, anticorpos específicos ligam-se a enzimas, que por sua vez, unem-se a antígenos, os quais são detectados quantitativa e qualitativamente por meio de uma reação colorimétrica.

3.7.5.1 Adiponectina Sérica

Na determinação da adiponectina sérica, primeiramente todos os reagentes foram deixados em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *Assay Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Para a realização do kit, a amostra foi inicialmente diluída 500 vezes utilizando-se o *Assay Buffer*, preparado anteriormente. Posteriormente, a solução *Wash Buffer* foi diluída 10 vezes com água deionizada. Os pocinhos foram então lavados 3 vezes com 300 μ L de solução *Wash Buffer* diluída. Foram adicionados 100 μ L e 80 μ L de *Assay Running Buffer* nos pocinhos referentes ao Branco e nos demais, respectivamente. Em duplicata, foram adicionados 20 μ L de Padrão de Adiponectina para Ratos preparados anteriormente em concentrações ascendentes, Controle 1 e 2 e as amostras de soro. A placa foi coberta e

incubada por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a mesma foi novamente lavada 3 vezes com 300 μ L de solução *Wash Buffer*. Foram acrescentados 100 μ L da solução *Detection Antibody*, a placa foi novamente incubada a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora e em seguida lavada 3 vezes com 300 μ L de *Wash Buffer*. Na etapa seguinte, foram adicionados 100 μ L de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 novas lavagens com 300 μ L de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μ L de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 20 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μ L de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de adiponectina/mL de soro.

3.7.5.2 Grelina Sérica

Para a determinação da grelina sérica, os reagentes repousaram até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *HRP Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 μ L de solução *HRP Wash Buffer* diluída. Foram adicionados 20 μ L de Solução Matriz nos pocinhos referentes ao Branco, Padrões e Controles. Na etapa seguinte, foram acrescentados 30 μ L de solução *Assay Buffer* nos pocinhos referentes ao Branco e amostras e 10 μ L, nos pocinhos da Curva padrão e Controles 1 e 2. Posteriormente,

foram adicionados 20 μ L das concentrações crescentes da Curva Padrão, dos Controles 1 e 2 e das amostras de soro. Em seguida, acrescentou-se 50 μ L de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Novamente a placa foi lavada por 3 vezes com 300 μ L de *Wash Buffer*. Na etapa seguinte, foram adicionados 100 μ L de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 novas lavagens com 300 μ L de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μ L de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μ L de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de grelina/mL de soro.

3.7.5.3 Leptina Sérica

Na determinação da leptina sérica os reagentes ficaram em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *HRP Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 μ L de solução *Wash Buffer* diluída. Foram acrescentados 30 μ L de *Assay Buffer* nos pocinhos referentes a Curva Padrão e aos Controles, e 40 μ L da mesma solução nos pocinhos referentes ao Branco e as amostras. Em seguida, foram acrescentados 10 μ L da Solução Matriz nos pocinhos Branco, Curva Padrão e Controles 1 e 2. Na etapa seguinte, foram acrescentados 10 μ L de soluções com concentrações

crescentes dos Padrões e dos Controles 1 e 2. Também foram adicionados 10 μL de amostras de plasma em duplicata nos respectivos pocinhos. Na etapa seguinte, foram acrescentados 80 μL de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Novamente a placa foi lavada por 3 vezes com 300 μL de *Wash Buffer*. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 novas lavagens com 300 μL de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μL de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μL de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de leptina/mL de soro.

3.7.5.4 Insulina Plasmática

Na determinação da insulina plasmática, os reagentes permaneceram em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 μL de solução *Wash Buffer* diluída. Foram acrescentados 10 μL de *Assay Buffer* nos pocinhos referentes ao Branco e as amostras. Em seguida, foram acrescentados 10 μL de soluções com concentrações ascendentes dos Padrões e os Controles 1 e 2. Também foram adicionados 10 μL de amostras de plasma em duplicata

nos respectivos pocinhos. Na etapa seguinte, foram acrescentados 80 μL de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Novamente a placa foi lavada por 3 vezes com 300 μL de *Wash Buffer*. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 novas lavagens com 300 μL de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μL de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μL de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de insulina/mL de plasma.

3.7.6 Determinação da Expressão Gênica das Enzimas Carnitina Palmitoil Transferase II, Ácido Graxo Sintase e dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR) α e γ

Após a eutanásia dos animais, as amostras de fígado e tecido adiposo epididimal foram imediatamente retiradas, pesadas e congeladas em nitrogênio líquido para a extração de RNA total. Primeiramente as amostras foram homogeneizadas em Trizol (1 mL de Trizol/30 mg de amostra) utilizando gerador 20s Politron por 30 segundos em velocidade máxima. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e 12000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o pellet descartado. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Para a

separação das fases, foi adicionado clorofórmio (200 µL para cada 1 mL de Trizol utilizado), agitando-se os tubos por inversão durante 15 segundos e posteriormente incubando-os por 3 minutos a temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C para melhor distinção das fases: fase com fenol e clorofórmio, na qual encontram-se as proteínas (rosa clara), interfase e fase aquosa superior, na qual encontra-se o RNA. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL previamente identificados. Foi realizada uma nova centrifugação a 12000 g e 4 °C por 3 minutos, para separação de qualquer interfase que por ventura tenha permanecido. Do mesmo modo o sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 1,5 mL. Adicionou-se isopropanol (500 µL para cada 1 mL de Trizol utilizado) e incubou-se as amostras por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C tornando o pellet visível ao fundo do tubo. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se etanol 75 % ao pellet formado. Em seguida o pellet foi lavado duas vezes com etanol 75 %, centrifugando-os a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. Ao final o pellet foi armazenado em etanol 75 % a -80 °C.

Após o isolamento do RNA e seu armazenamento em etanol 75 %, as amostras foram centrifugadas a 7500 g a 4 °C por 5 minutos e colocadas em dessecador a vácuo por 10 minutos. Em seguida, os RNAs foram diluídos em água tratada com DEPC (Dimetil pirocarbonato - Invitrogen), utilizando 1 µL de água para cada 1 mg de tecido. O RNA dos espécimes foi quantificado através do Quant-iT™ RNA Assay Kit (Invitrogen – Q32852) e a leitura realizada no Quibit® Fluorometer (Invitrogen). Uma eletroforese em gel agarose foi realizada a fim de verificar a qualidade e integridade do RNA total coletado.

A partir de 1 µg de RNA realizou-se em um equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) os experimentos de Real-Time PCR. Para estes, um sistema de ensaio comercialmente disponível foi utilizado (TaqMan® Gene Expression Assay; PPAR α : Rn00566193_m1; PPAR γ : Rn00440945_m1; FASN: Rn0143550_m1; CPTII: Rn00667869; Applied Biosystems). O gene B2M (β -2-microglobulina; TaqMan® Gene Expression Assay: Rn00560865_m1) foi empregado como referência (endógeno). Fez-se uso do kit TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step (Applied Biosystems). As condições foram: 48 °C por 15 minutos para transcrição reversa, 95 °C por 10 minutos para ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure) e seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto para desnaturação e anelamento, respectivamente. A quantidade relativa de mRNA foi calculada a partir do $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak; Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001).

3.8 Ensaio Clínico

3.8.1 Seleção do Grupo de Voluntários

O recrutamento dos indivíduos foi realizado por meio de cartazes, e-mail e anúncio em jornal, os quais continham informações sobre o propósito da pesquisa, critérios de inclusão e exclusão e contato dos pesquisadores. Após manifestação de interesse por e-mail ou telefone, os voluntários eram convidados a participar de uma entrevista inicial com dia e hora marcados no Laboratório de Lípidos, do Departamento de

Alimentos e Nutrição da Universidade Estadual de Campinas. Nesta primeira entrevista, eram feitos esclarecimentos sobre os objetivos e desenvolvimento da pesquisa e apenas após a anuência dos indivíduos, os mesmos assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3). Em seguida, era preenchida a Ficha de Identificação (Anexo 4) e entregues as fichas de Registro Alimentar (Anexo 5) para preenchimento durante 7 dias. Neste momento, eram fornecidas informações quanto ao preenchimento das fichas e procedimento para jejum, e então, agendava-se o retorno do voluntário para coleta de sangue e antropometria. Um total de cento e cinqüenta e quatro indivíduos compareceu para a entrevista inicial. Destes, 57 indivíduos (37%) não atenderam aos critérios de inclusão em relação aos parâmetros bioquímicos, principalmente ao perfil lipídico e/ou glicemia e 44 indivíduos (28,6%) desistiram em alguma fase do experimento e 53 indivíduos (34,4%) participaram do estudo integralmente.

3.8.1.1 Critérios de inclusão

Participaram da pesquisa indivíduos do sexo masculino, com idade entre 25 e 55 anos, com índice de massa corporal (IMC) de 25 a 35 kg/m², perfil bioquímico sanguíneo e hemograma normais, limite de pressão arterial de 140 x 90 mmHg, sorologia negativa para hepatite e HIV, ausência de história de doença pancreática e esteatorréia, sem uso de medicação contínua e suplemento nutricional.

3.8.1.2 Critérios de exclusão

Foram descartados os indivíduos que durante a entrevista relataram doenças cardiovasculares, resistência à insulina e/ou diabetes, neoplasias, distúrbios neurológicos, intolerância à lactose, alergia a proteína do leite de vaca, alteração do peso corporal de 3 kg nos últimos 3 meses, uso de medicamento com objetivo de perda de peso, uso de suplemento nutricional com objetivo de ganho muscular ou perda de gordura corporal, antecedentes de consumo de álcool e narcóticos e fumantes.

3.8.1.3 Critérios para suspensão da pesquisa

Conforme os critérios de suspensão da pesquisa propostos inicialmente, não houve necessidade de interrupção da mesma. Estes critérios foram: surto de problemas gastrointestinais entre os participantes, caracterizado por 3 ou mais evacuações semi-líquidas dentro de um período de 24 horas acompanhadas de vômito e dores abdominais intensos.

3.8.2 Desenho Experimental

O ensaio clínico caracterizou-se por um estudo de coorte prospectiva duplo-cego, no qual cinquenta e três indivíduos do sexo masculino foram alocados aleatoriamente por meio de randomização restrita em blocos de 3 com razão de alocação de 1:1 utilizando o *software* Excel do pacote *Microsoft Office* para *Windows* (MICROSOFT, 2003). Após alocação, os indivíduos formaram 4 grupos, caracterizando os seguintes grupos experimentais:

- **Grupo SP (Suplementado Placebo):** recebeu **cápsula de óleo de cártamo**;
- **Grupo SE (Suplementado Experimental):** recebeu **cápsula de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®)**;
- **Grupo EP (Enriquecido Placebo):** recebeu **leite semi-desnatado (1,1 % de gordura) sem adição de CLA**;
- **Grupo EE (Enriquecido Experimental):** recebeu **leite semi-desnatado (0,5 % de gordura + 0,6 % de ácido linoléico conjugado CLA Tonalin® TG80)**.

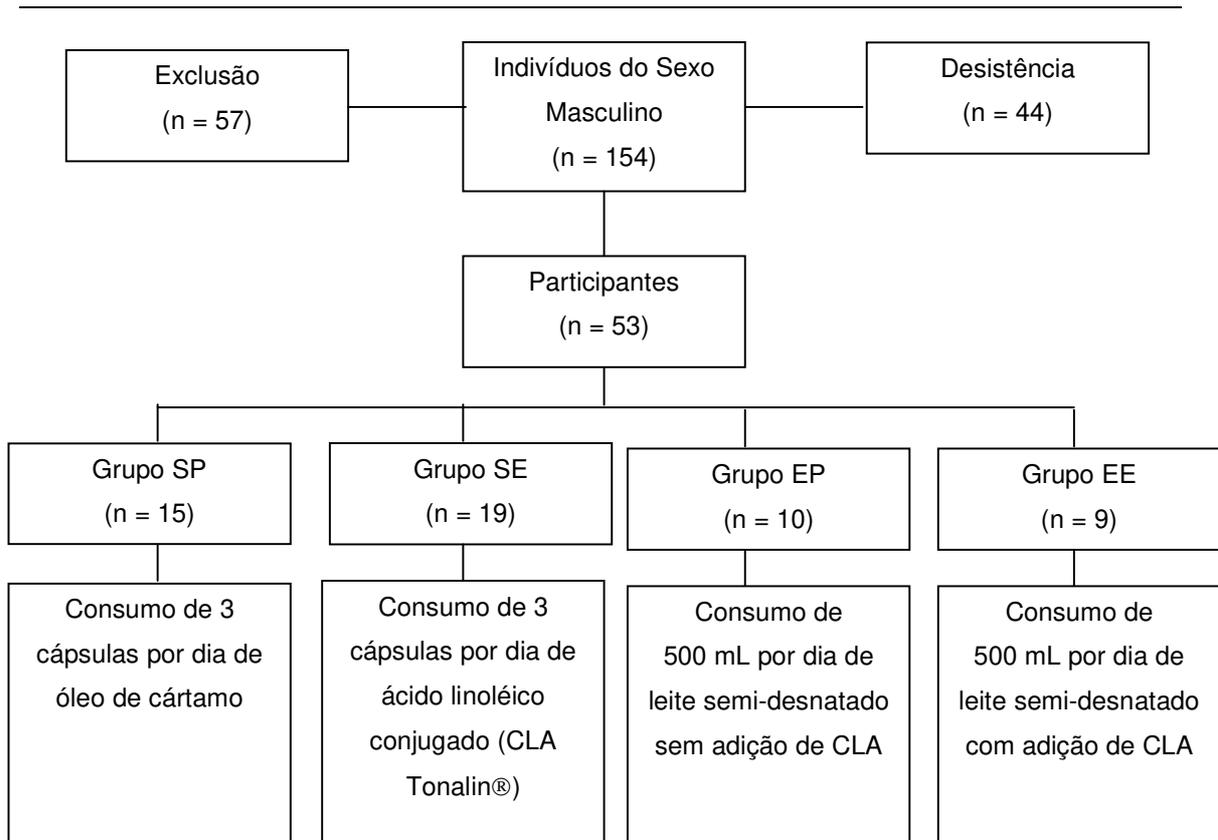


Figura 6. Esquema do delineamento experimental do ensaio clínico.

Os grupos suplementados placebo e experimental receberam cápsulas de óleo de cártamo e CLA Tonalin®, respectivamente, que representasse um consumo diário de 3 g dos respectivos compostos. As cápsulas foram consumidas 3 vezes ao dia (após café da manhã, almoço e jantar) totalizando 3 unidades de 1 g cada. O grupo enriquecido controle recebeu porções de 500 mL de leite semi-desnatado sem adição de CLA e o grupo enriquecido experimental recebeu as mesmas porções de leite semi-desnatado enriquecido com CLA, de modo a totalizar um consumo diário de 3 g de CLA. Tanto as cápsulas quanto o leite foram fornecidos mensalmente aos participantes do estudo que

foram devidamente orientados quanto ao consumo e armazenamento dos mesmos e, também orientados a devolver as cápsulas e o leite que por algum motivo não tenham sido consumidos durante o período, bem como, as embalagens de leite vazias daqueles que foram consumidos. As determinações bioquímicas e antropométricas foram realizadas em três momentos do experimento: antes de iniciar os tratamentos (**Tempo 0**), ao final de 6 semanas (**Tempo 1**) e ao final de 12 semanas (**Tempo 2**) (Figura 6).

3.8.3 Obtenção do Soro e Plasma do Sangue dos Indivíduos para a Determinação da Sorologia, Perfil Bioquímico, Hemograma e Perfil Hormonal

O sangue dos voluntários foi coletado por profissional técnico utilizando material estéril e descartável, por meio de punção venosa, após jejum de 12 horas ao final de cada período do experimento (T0, T1 e T2). As amostras de sangue foram coletadas com tubos Vacuette® de volumes específicos sem anticoagulante, para a obtenção do soro, com anticoagulante K3E K₃EDTA, para a obtenção do plasma e com EDTA e fluoreto de sódio para glicemia. Os tubos para as análises do perfil bioquímico e perfil hormonal eram centrifugados sob refrigeração a 4 °C por 15 minutos a 4500 rpm. Posteriormente, o soro e o plasma sobrenadantes foram separados, utilizando uma pipeta descartável e acondicionados em micro tubos de polipropileno, e imediatamente encaminhados aos laboratórios responsáveis pelas análises. As amostras para as determinações do perfil hormonal foram armazenadas em Freezer Ultra Low a -80 °C até o momento das análises.

3.8.4 Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Consumo Alimentar

O inquérito dietético utilizado para obtenção e o acompanhamento da ingestão de energia e nutrientes durante o período de intervenção foi o Registro Alimentar (Anexo 5) feito semanalmente; os sujeitos da pesquisa foram orientados a preencher sete dias de Registro Alimentar antes da intervenção e três dias de Registro Alimentar a cada semana durante todo o período de intervenção, sendo dois dias da semana e um dia do final de semana (MEDLIN; SKINNER, 1998). O *software* utilizado para o cálculo do consumo de energia e nutrientes foi o Programa Dietpro desenvolvido pela A. S. Sistemas da Incubadora de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A avaliação da adequação do consumo foi feita de acordo com a *Dietary Reference Intakes* utilizando a metodologia para grupos (IOM, 2001).

3.8.5 Determinação da Sorologia, Perfil Bioquímico Sanguíneo e Hemograma

A sorologia para HIV e hepatite A e C foi realizada no Laboratório de Sorologia do Hemocentro/UNICAMP. As análises referentes ao perfil lipídico (triacilglicerol, colesterol total e frações), glicemia de jejum, cálcio sérico, fósforo inorgânico, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP) foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP. O hemograma completo foi realizado no Laboratório de Hematologia do Hemocentro/UNICAMP. Todas as determinações

sanguíneas foram realizadas de acordo com as recomendações e metodologias dos laboratórios supracitados.

3.8.6 Determinação da Composição Corporal

Os indivíduos tiveram sua composição corporal determinada por meio da tomada de peso (balança digital portátil com registro ao 0,1 kg, marca Líder P150m), altura (estadiômetro portátil para adulto com campo de uso de 0,8 a 2,2 m com registro ao 0,1 cm, marca Altorexata), circunferências do braço, abdome e quadril (fita métrica inelástica e flexível com registro ao 0,1 cm, marca TBW), dobras cutâneas tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca (adipômetro científico ao 0,2 mm, marca Lange) e impedância bioelétrica tetrapolar (marca Biodynamics Modelo 310). As medidas antropométricas foram tomadas conforme protocolo (Anexo 6). Realizou-se uma série de três medidas sucessivas num mesmo local, considerando-se a média das três, como sendo o valor adotado. As medidas de espessura das dobras cutâneas foram realizadas sempre do lado direito do indivíduo. Para análise da impedância bioelétrica quatro eletrodos foram colocados de forma precisa em locais bem definidos, com o indivíduo deitado em decúbito dorsal. Após o comando emitido pelo equipamento, uma corrente indolor de baixa intensidade (800 mA) a uma frequência fixa de 50 kHz foi introduzida passando do eletrodo fonte para o eletrodo de captação. A queda de voltagem percebida por este último eletrodo era registrada segundo o valor ohm (W) mais próximo. Os eletrodos foram colocados nos pontos anatômicos conforme a padronização sugerida por Heyward; Stolarczyk (1996) e Lukaski *et al.* (1986).

Para estimativa da porcentagem de gordura corporal por meio da utilização das dobras cutâneas, foi utilizada a equação de Siri (1961), na qual se utiliza a densidade corporal (DENS), conforme a fórmula:

$$\% \text{ Gordura} = ((4,95 / \text{DENS}) - 4,50) \times 100$$

Quanto a densidade corporal, esta foi estimada pela fórmula de Durnin e Womersley, citada por Petroski; Pires Neto (1996):

$$\text{DENS} = 1,1620 - 0,0700 \text{ Log } (\Sigma 4\text{DC})$$

Onde:

$\Sigma 4\text{DC}$ = somatório das dobras cutâneas subescapular, tricípital, bicípital e suprailíaca.

3.8.7 Determinação do Perfil Hormonal

As análises de adiponectina, grelina, leptina e resistina séricas, assim como de insulina plasmática foram realizadas utilizando-se os seguintes kits de método imunoenzimático (ELISA): EZHADP-61K, EZGRT-89K, EZHL-80SK, EZHR-95K e EZHI-14K, respectivamente, provenientes do Laboratório Linco Research.

3.8.7.1 Adiponectina Sérica

Na determinação da adiponectina sérica, primeiramente todos os reagentes repousaram até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *HRP Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Para a realização do kit, a amostra foi inicialmente diluída 500 vezes utilizando-se o *Assay Buffer*, preparado anteriormente. Os pocinhos foram então lavados 3 vezes com 300 μ L de solução *HRP Wash Buffer* diluída. Foram adicionados 60 μ L de *Assay Buffer* em todos os pocinhos. Posteriormente acrescentou-se 20 μ L em duplicata nos pocinhos referentes ao Branco. Do mesmo modo, 20 μ L foram adicionados em duplicata nos pocinhos referentes a Curva Padrão, aos Controles 1 e 2 e as amostras de soro. Foram acrescentados 20 μ L da solução *Detection Antibody* em todos os pocinhos, a placa incubada a temperatura ambiente sob agitação por 2 horas e em seguida lavada 3 vezes com 300 μ L de *Wash Buffer*. Na etapa seguinte, foram adicionados 100 μ L de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 5 novas lavagens com 300 μ L de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μ L de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μ L de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de adiponectina/mL de soro.

3.8.7.2 Grelina Sérica

Para a determinação da grelina sérica, os reagentes permaneceram em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *HRP Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 μL de solução *HRP Wash Buffer* diluída. Foram adicionados 20 μL de Solução Matriz nos pocinhos referentes ao Branco, Padrões e Controles. Na etapa seguinte, foram acrescentados 30 μL de solução *Assay Buffer* nos pocinhos referentes ao Branco e amostras e 10 μL , nos pocinhos da Curva padrão e Controles 1 e 2. Posteriormente, adicionou-se em duplicata 20 μL das concentrações crescentes da Curva Padrão, dos Controles 1 e 2 e das amostras de soro. Em seguida, acrescentou-se 50 μL de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Novamente a placa foi lavada por 3 vezes com 300 μL de *Wash Buffer*. Na etapa seguinte, foram adicionados 100 μL de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 6 novas lavagens com 300 μL de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μL de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 25 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μL de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de grelina/mL de soro.

3.8.7.3 Leptina Sérica

Na determinação da leptina sérica os reagentes ficaram em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 µL de solução *Wash Buffer* diluída. Foram acrescentados 50 µL de *Assay Buffer* em todos os pocinhos. Do mesmo modo, 50 µL de *Assay Buffer* foram acrescentados nos pocinhos referentes ao Branco. Novamente, adicionou-se 50 µL das respectivas soluções nos pocinhos referentes a Curva Padrão, aos Controles, e as amostras. A placa foi incubada por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foram acrescentados 100 µL de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa incubada sob agitação a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 5 lavagens com 300 µL de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 µL de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 µL de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de leptina/mL de soro.

3.8.7.4 Resistina Sérica

Para a determinação da resistina sérica, os reagentes permaneceram em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 μL de solução *Wash Buffer* diluída. Foram adicionados 60 μL de *Assay Buffer* em todos os pocinhos e outros 20 μL da mesma solução nos pocinhos referentes ao Branco. Da mesma maneira, adicionou-se em duplicata 20 μL das concentrações crescentes da Curva Padrão, dos Controles 1 e 2 e das amostras de soro. Em seguida, a placa foi incubada por 1 hora e 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente e lavada 3 vezes com 300 μL de *Wash Buffer*. Acrescentou-se 80 μL de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Novamente a placa foi lavada por 3 vezes com 300 μL de *Wash Buffer*. Na etapa seguinte, foram adicionados 80 μL de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 novas lavagens com 300 μL de *Wash Buffer*. Em seguida, 80 μL de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 80 μL de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de resistina/mL de soro.

3.8.7.5 Insulina Plasmática

Na determinação da insulina plasmática, os reagentes permaneceram em repouso até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, a solução *HRP Wash Buffer* foi diluída 10 vezes utilizando água deionizada. Inicialmente, todos os pocinhos foram lavados 3 vezes com 300 μL de solução *HRP Wash Buffer* diluída. Foram acrescentados 20 μL de *Assay Buffer* nos pocinhos referentes ao Branco e as amostras. Posteriormente adicionou-se 20 μL de Solução Matriz nos pocinhos referentes ao Branco, a Curva Padrão e aos Controles 1 e 2. Em seguida, foram acrescentados 20 μL de soluções com concentrações ascendentes dos Padrões e os Controles 1 e 2. Também foram adicionados 20 μL de amostras de plasma em duplicata nos respectivos pocinhos. Na etapa seguinte, foram acrescentados 20 μL de *Detection Antibody* em todos os pocinhos e a placa foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Novamente a placa foi lavada por 3 vezes com 300 μL de *Wash Buffer*. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de *Enzyme Solution* e a placa incubada por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Foram realizadas 5 novas lavagens com 300 μL de *Wash Buffer*. Em seguida, 100 μL de *Substrate* foram adicionados em todos os pocinhos e a placa incubada por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Ao final, 100 μL de *Stop Solution* foram adicionados e a leitura realizada no comprimento de onda de 450 nm e 590 nm em equipamento *Tunable Microplate Reader VERSAmax, Molecular Devices*. Os valores obtidos foram então comparados a uma curva padrão e os resultados expressos em ng de insulina/mL de plasma.

3.9 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos dos Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA), dos Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA e das Dietas Experimentais

A metilação dos ácidos graxos 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 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), utilizado 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 (g/100 g ácidos graxos totais).

3.10 Avaliação da Aceitação e da Intenção de Compra dos Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA

As amostras de leite semi-desnatado com e sem adição de CLA foram avaliadas em relação aos atributos aparência, aroma, sabor e impressão global por meio de teste de aceitação, utilizando escala hedônica não estruturada de 9 cm. Na mesma ficha (Anexo 7) foi avaliada a atitude do consumidor em relação à compra desses produtos. Para tal, foi utilizada uma escala de 5 pontos para avaliação da atitude de compra (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). As amostras foram servidas aos

provadores em cabines individuais, de forma monádica e ordem balanceada, em copos plásticos descartáveis de 50 mL e codificados com algarismos de 3 dígitos.

Após terem assinado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 8), cinquenta e cinco indivíduos participaram voluntariamente do teste.

3.11 Análise estatística

Os dados de composição centesimal das dietas experimentais foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida de teste de Tukey. Para análise dos resultados do ensaio biológico foi empregado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, também conhecido como teste de Mann-Whitney. Para a análise dos dados do ensaio clínico foram empregados os testes de Mann-Whitney, para a comparação entre os tratamentos no mesmo tempo, e o teste de Sinal de Wilcoxon para a comparação entre os tempos. A hipótese nula é a de que a mediana dos grupos são iguais e a hipótese alternativa é a de que elas são diferentes. O nível de significância adotado foi de 5%, para todas as análises. O programa utilizado para a análise foi o *Statistical Analysis System* (SAS) (1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das Matérias-primas

4.1.1 Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA e Leite em Pó Desnatado

Os resultados da determinação da composição centesimal dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e do leite em pó desnatado estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Composição centesimal (g/100g) dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e do leite em pó desnatado.

Componente	Leite semi-desnatado	Leite semi-desnatado	Leite em pó desnatado
	com adição de CLA (g/100g)	sem adição de CLA (g/100g)	(g/100g)
Proteínas	3,12 ± 0,02	3,05 ± 0,00	34,94 ± 0,32
Lípides	1,10 ± 0,00	1,20 ± 0,00	0,56 ± 0,00
Cinzas	0,81 ± 0,00	0,79 ± 0,00	7,95 ± 0,00
Umidade	90,34 ± 0,00	90,54 ± 0,00	2,95 ± 0,10
Lactose	4,62 ± 0,01	4,40 ± 0,00	53,59 ± 0,42

4.1.2 Perfil de Ácidos Graxos dos Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA), dos Leites Semi-desnatados com e sem a Adição de CLA e das Dietas Experimentais

A composição dos ácidos graxos do suplemento de óleo de cártamo e da mistura de isômeros de CLA, assim como dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e das dietas experimentais, expressos em g/100 g de ácidos graxos totais, pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6. Perfil dos ácidos graxos dos suplementos (óleo de cártamo e CLA), dos leites semi-desnatados com e sem adição de CLA e das dietas experimentais.

Ácidos graxos	Óleo de cártamo	Ácido linoléico conjugado Tonalin®	Leite semi-desnatado com adição de CLA	Leite semi-desnatado sem adição de CLA	Dieta AIN93G padrão*	Dieta AIN93G enriquecida com óleo de cártamo**	Dieta AIN93G enriquecida com CLA Tonalin®***
g/100g							
C4:0	-	-	0,892	2,913	0,020	0,024	0,051
C6:0	0,004	-	0,863	1,975	0,013	0,017	0,023
C8:0	0,025	-	0,544	1,241	0,012	0,018	0,019
C10:0	0,021	0,029	1,167	2,871	0,026	0,042	0,057
C10:1	-	-	0,118	0,299	-	-	-
C11:0	-	-	0,021	0,045	-	-	-
C12:0	0,037	0,032	1,308	3,306	0,033	0,037	0,051
C12:1	-	-	0,033	0,113	-	-	-
C13:0	-	0,227	0,038	0,116	-	-	-

Resultados e Discussão

C13:0 iso	-	-	0,010	0,017	-	-	-
C13:0 anteiso	-	-	0,033	0,083	-	-	-
C14:0	0,146	-	4,539	11,424	0,169	0,189	0,258
C14:0 iso	-	-	0,044	0,095	-	-	-
C14:1 <i>cis-9</i>	-	-	0,559	1,511	0,009	0,003	0,009
C15:0	-	-	0,427	1,088	0,020	-	-
C15:0 iso	0,005	-	-	0,002	-	-	-
C15:0 anteiso	-	-	0,107	0,271	-	-	-
C15:1	-	-	-	-	-	-	-
C16:0	6,437	2,733	13,012	28,122	11,242	10,356	11,121
C16:0 iso	-	-	0,118	0,282	-	-	-
C16:1 <i>cis-9</i>	0,086	-	0,562	1,913	0,074	0,087	0,094
C17:0	0,029	0,035	0,255	0,713	0,071	0,065	0,079
C17:0 iso	-	-	-	0,169	-	-	-
C17:1	0,024	-	0,080	0,317	0,017	0,042	-
C18:0	2,191	2,767	6,376	11,866	4,136	3,641	4,115
C18:1 <i>trans-6</i>	-	-	0,013	0,244	-	-	-
C18:1 <i>trans-10</i>	-	-	0,167	1,083	-	-	-
C18:1 <i>trans-16</i>	0,068	0,240	0,121	0,100	0,144	0,131	0,256
C18:1 <i>cis-9</i>	12,147	10,148	15,631	21,364	20,811	19,015	19,669
C18:1 <i>cis-11</i>	0,528	1,511	0,818	1,313	1,189	1,087	1,542
C18:1 <i>cis-12</i>	0,239	0,787	0,498	0,532	0,670	0,520	0,786
C18:1 <i>cis-13</i>	0,100	0,474	0,246	0,238	0,295	0,238	0,384
C18:1 <i>cis-15</i>	-	-	-	0,308	-	-	-
C18:2 <i>trans-11,</i> <i>cis-15</i>	-	-	0,001	-	-	-	-
C18:2 <i>cis-9,</i> <i>cis-12</i>	77,757	-	0,965	1,419	52,914	59,719	51,185

C18:2	<i>cis-9,</i>	-	38,426	25,317	1,107	-	-	1,813
	<i>trans-11 CLA</i>							
C18:2		-	41,592	23,667	-	-	-	1,832
	<i>trans-10,</i>							
	<i>cis-12 CLA</i>							
C18:3		0,059	-	-	-	-	4,332	6,469
C20:1		-	-	-	-	0,159	0,123	-
C20:3		-	-	-	-	-	-	-
C20:4		-	-	-	-	0,258	0,136	-
C20:5		-	-	0,017	0,045	-	-	-
C22:0		-	-	0,037	0,066	-	-	-
C22:1		-	-	0,019	0,047	-	0,006	0,004
C22:5		0,016	-	-	0,031	-	0,018	-
C22:6		-	-	-	-	-	0,005	-
C24:0		-	-	-	-	-	-	-
C24:1		0,028	0,142	0,016	-	0,054	0,018	0,016
Total		99,948	99,142	98,863	99,102	98,709	99,868	99,833

* Dieta utilizada durante o período de adaptação e para os grupos SP e SE durante todo o período experimental

** Dieta utilizada para o grupo EP durante todo o período experimental

*** Dieta utilizada para o grupo EE durante todo o período experimental

Segundo o perfil de ácidos graxos apresentado na Tabela 6, o suplemento de óleo de cártamo, utilizado para a entubação orogástrica pelo grupo placebo SP, contém 77,75 g de ácido linoléico/100 g de ácidos graxos totais. Já o suplemento de ácido linoléico conjugado, utilizado para a entubação orogástrica pelo grupo SE, corresponde a uma mistura de isômeros de CLA, na qual os isômeros predominantes *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* estão na proporção de aproximadamente 1:1 e totalizam 80,01 g de

isômeros de CLA/100 g de ácidos graxos. A dieta padrão, utilizada durante o período de adaptação e ao longo de todo o período experimental para os grupos SP e SE, contém 52,91 g de ácido linoléico/100 g de ácidos graxos. As dietas enriquecidas com óleo de cártamo (utilizada pelo grupo LP) e CLA (utilizada pelo grupo EP), contêm 59,71 g e 3,64 g de ácido linoléico e isômeros de CLA/ 100 g de ácidos graxos, respectivamente. O leite semi-desnatado com a adição de CLA apresenta 48,98 g de isômeros de CLA/100 g de ácidos graxos, contra apenas 1,10 g destes isômeros no leite isento de adição.

Os isômeros *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12*, dentre os demais isômeros de CLA, são os que possuem sua atividade biológica conhecida. Sabe-se que o isômero *cis-9*, *trans-11* possui efeito anti-carcinogênico (IP *et al.*, 1999) e que o isômero *trans-10*, *cis-12* está particularmente envolvido na alteração da composição corporal (PARK *et al.*, 1999).

Isolar cada um destes isômeros é um processo difícil e caro. Por este motivo, a grande maioria dos estudos com CLA tem sido realizada utilizando uma mistura comercialmente produzida a partir de óleos vegetais, contendo predominantemente os isômeros *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* CLA na proporção de 1:1 (FUNCK; BARRERA-ARELLANO; BLOCK, 2007). Desta forma, não é possível atribuir a cada um dos isômeros de forma isolada, os resultados encontrados.

Tabela 7. Composição dos ácidos graxos linoléico (C18:2 *cis-9, cis-12*) e dos isômeros de CLA (C18:2 *cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12*) dos suplementos (óleo de cártamo e CLA), dos leites semi-denatados com e sem adição de CLA e das dietas experimentais.

Ácidos graxos	Óleo de cártamo	Ácido linoléico conjugado Tonalin®	Leite semi-denatado com adição de CLA	Leite semi-denatado sem adição de CLA	Dieta AIN93G padrão*	Dieta AIN93G enriquecida com óleo de cártamo**	Dieta AIN93G enriquecida com CLA Tonalin®***
g/100g de amostra							
C18:2 <i>cis-9, cis-12</i>	77,757	-	0,010	0,017	3,751	5,213	4,371
C18:2 <i>cis-9, trans-11</i> CLA	-	38,426	0,278	0,013	-	-	0,154
C18:2 <i>trans-10, cis-12</i> CLA	-	41,592	0,260	-	-	-	0,156

* Dieta utilizada durante o período de adaptação e para os grupos SP e SE durante todo o período experimental

** Dieta utilizada para o grupo EP durante todo o período experimental

*** Dieta utilizada para o grupo EE durante todo o período experimental

Os suplementos de óleo de cártamo e CLA utilizados são compostos em sua totalidade por ácidos graxos. Desta maneira, podemos concluir que as quantidades de ácido linoléico e isômeros de CLA presentes, corresponde a 77,75 % e 80,01 % nas cápsulas de óleo de cártamo e CLA, respectivamente (Tabela 7).

Ao considerarmos as concentrações de lípidos do leite semi-denatado com e sem adição de CLA e das dietas, encontrados por meio da determinação da composição centesimal destas amostras, podemos estimar os teores dos ácidos graxos linoléico

(C18:2 *cis*-9, *cis*-12), assim como dos isômeros de CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) presentes, utilizando-se dos resultados do perfil de ácidos graxos (Tabela 6). O leite semi-desnatado com adição de CLA, possui 1,1 % de lípidos (Tabela 5). Com base no perfil de ácidos graxos apresentado na Tabela 7, podemos concluir que o conteúdo total de isômeros de CLA nesta amostra é de 0,54 %, ou seja, próximo ao valor adicionado em seu desenvolvimento (0,6 %). Já no leite sem adição de CLA a quantidade destes isômeros é insignificante (0,01 %). As dietas padrão, enriquecida com óleo de cártamo e enriquecida com CLA, possuem teores de lípidos totais de 7,09 %, 8,73 % e 8,54 %, respectivamente (Tabela 10). Considerando a composição dos ácidos graxos presentes (Tabela 7), é possível verificar que os teores de ácido linoléico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) presentes nas dietas padrão e enriquecida com óleo de cártamo são 3,75 % e 5,21 %, respectivamente. Estes resultados são coerentes com a adição de 2 % de óleo de cártamo na dieta enriquecida, em relação à dieta padrão. Já a dieta enriquecida com CLA, apresenta valores abaixo do esperado para estes isômeros, uma vez que o teor total é de 0,31 %.

4.1.3 Estabilidade Oxidativa dos Suplementos (Óleo de Cártamo e CLA), dos Leites (sem Adição e com Adição de CLA) e das Dietas (Padrão, Enriquecida com Óleo de Cártamo e Enriquecida com CLA)

Na Tabela 8 estão descritos os resultados de índice de peróxido (IP) e malondialdeído (MDA) dos suplementos e das dietas. Observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de IP entre o suplemento placebo (óleo de cártamo) e suplemento

de CLA; sendo os maiores valores de IP nas amostras de óleo de cártamo. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de TBA entre as amostras de suplemento de óleo de cártamo e CLA.

Tabela 8. Valores médios \pm desvio-padrão de índice de peróxido e malondialdeído dos suplementos (óleo de cártamo e ácido linoléico conjugado) e das dietas (padrão, enriquecida com óleo de cártamo e enriquecida com ácido linoléico conjugado).

Suplemento ou Dieta	IP (mEq/kg)	MDA	
		Absorbância (530 nm)	Valor TBA (mg/kg)
Suplementos			
Óleo de Cártamo	22,35 \pm 0,45 ^a	0,0175 \pm 0,0014	81,45 \pm 6,14
CLA	6,05 \pm 0,66 ^b	0,0214 \pm 0,0070	100,70 \pm 35,62
Dietas			
Padrão	ND	0,0215 \pm 0,0079	42,93 \pm 15,95
Enriquecida com Óleo de Cártamo	Tr	0,0253 \pm 0,0119	50,38 \pm 23,89
Enriquecida com CLA	Tr	0,0207 \pm 0,0053	41,62 \pm 10,30

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

ND: não detectado; Tr: traço (valor inferior ao limite de quantificação).

IP: índice de peróxido; MDA: malondialdeído; CLA: ácido linoléico conjugado; TBA: ácido 2-tiobarbitúrico.

Levando em consideração a cinética do processo oxidativo dos lípidos, especula-se que os suplementos (óleo de cártamo e CLA) estejam em etapas distintas do processo de autoxidação. A partir dos resultados, é provável que o suplemento de óleo de cártamo esteja em sua fase inicial de autoxidação já que seu valor de IP (22,35 \pm 0,45 mEq/kg) foi maior em relação ao mesmo valor para o CLA. Os peróxidos são conhecidos como indicadores primários da autoxidação dos lípidos, já que são produzidos

nas fases de iniciação e de propagação do processo; na sequência os peróxidos são clivados, originando outros compostos, denominados indicadores secundários da autoxidação dos lípidos, dentre os quais pode-se citar o malondialdeído (MDA) (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Nesse contexto, é provável que o suplemento de CLA esteja em etapa mais avançada das reações de autoxidação, já que o valor de MDA encontrado para esse suplemento foi maior ($100,70 \pm 35,62$ mg/kg), embora não significativamente diferente do valor encontrado para o óleo de cártamo ($p > 0,05$). Esses resultados possibilitam a observação das possíveis diferenças da cinética da autoxidação dos suplementos, mas a conclusão sobre as possíveis diferenças de estabilidade oxidativa entre o óleo de cártamo e CLA não é óbvia.

Ao comparar os teores de IP e MDA dos suplementos com valores de referência pôde-se observar alguma diferença: segundo a Resolução RDC n°. 270 de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), por exemplo, o teor médio máximo de IP em óleos vegetais refinados ou não refinados é de 12,5 mEq/kg. Quanto aos valores esperados para MDA, embora sejam escassos na literatura, foi possível encontrar algumas referências em trabalhos que tiveram como objetivo investigar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras durante estocagem e processamento térmico, especialmente após o processo de fritura. Os resultados de MDA obtidos por meio do teste do ácido 2-tiobarbitúrico devem ser expressos em unidade de absorbância por unidade de peso de amostra ou em valor TBA (mg de MDA por kg de amostra), e por isso na Tabela 8 os resultados estão apresentados sob essas duas unidades. Valores de MDA encontrados em óleos vegetais refinados de diferentes sementes (canola, girassol, soja e milho) submetidos a testes de estocagem e de processamento térmico apresentam absorbância média de $0,6775 \pm 0,0050$ (estocagem acelerada a 65°C) ou $3883,47 \pm 1676,67$ mg/kg

(média de 12 horas de fritura de batatas) e $4474,02 \pm 2078,24$ mg/kg (22,5 horas de fritura de diversos alimentos) (DEL RÉ; JORGE, 2006; JORGE; JANIERI, 2005; HAWRYSH *et al.*, 1988). Dentro das limitações existentes, já que os óleos usados como suplementos no ensaio biológico a que se refere esse trabalho (óleo de cártamo e CLA) não foram analisados sob as mesmas condições das citações anteriores, a única conclusão a que se pode chegar é que os valores de MDA encontrados no óleo de cártamo e no CLA são drasticamente inferiores aos supracitados, como pode ser observado na Tabela 8. Tal conclusão não deixa de ser, além de necessária, muito relevante, pois permite a ciência da integridade dos ácidos graxos presentes nos suplementos.

Quanto aos resultados de IP e MDA das dietas padrão e enriquecidas, seria esperado observar maior estabilidade dos suplementos, já que esses são parte de uma matriz alimentar. A dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) é composta de macro e micronutrientes, que certamente influenciam a susceptibilidade à autoxidação dos suplementos adicionados à mesma, especialmente aqueles nutrientes relacionados diretamente ao processo oxidativo dos lípides alimentares, como as vitaminas e minerais com ação antioxidante presentes no mix vitamínico e no mix mineral da formulação original da AIN-93G. Tal hipótese poderia ser suportada pelos achados de IP, os quais não estão presentes ou estão em quantidades traço, e os achados de MDA, cujo conteúdo é mais baixo nas três dietas, quando comparado com o conteúdo desse indicador nos suplementos, especialmente o CLA, encapsulados. Teores de MDA encontrados na literatura em diferentes matrizes alimentares variam, em unidades de absorvância a 530 nm, entre $0,0500 \pm 0,0141$ e $0,2032 \pm 0,0575$ (leite de vaca e leite de vaca enriquecido com ferro, respectivamente) e variam, em valor TBA, entre $0,1105 \pm 0,0812$ mg/kg e $1,1750 \pm 0,3065$ mg/kg (cortes de frango, cortes suínos e embutidos de

carne ovina) (MENDES *et al.*, 2008; PASCHOAL *et al.*, 2007; TERRA; CICHOSKI; FREITAS, 2006; SOUZA *et al.*, 2005). O conteúdo médio de MDA das três dietas foi, em unidade de absorvância a 535 nm, de $0,0225 \pm 0,0083$ e, em valor TBA, de $44,97 \pm 16,71$ mg/kg, conteúdo esse maior que a média encontrada na literatura, provavelmente devido as diferenças de perfil de ácidos graxos poliinsaturados das dietas e das matrizes alimentares, particularmente quanto a presença de isômeros de CLA, o que influencia a susceptibilidade a autoxidação. É importante ressaltar que todos os cuidados referentes ao armazenamento e manipulação das dietas foram tomados no sentido de prevenir a autoxidação: as dietas foram armazenadas sob congelamento e ao abrigo da luz durante todo o período de ensaio e oferecidas aos animais a cada 48 horas.

Conforme Tabela 7, a dieta enriquecida com óleo de cártamo (usada como controle no ensaio biológico) não contém CLA, como esperado; quanto à dieta enriquecida com CLA, esta apresenta 0,31% dos isômeros *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* em iguais proporções entre eles. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de MDA das diferentes dietas.

Os resultados de estabilidade oxidativa estão descritos na Tabela 9. Pode-se observar que a estabilidade dos isômeros de ácido linoléico conjugado é dependente de muitas variáveis, particularmente, a matriz onde o composto será veiculado, processamento e embalagem.

Tabela 9. Valores do período de indução à oxidação e estimativa da vida de prateleira dos suplementos (óleo de cártamo e ácido linoléico conjugado), dos leites (sem adição e com adição de ácido linoléico conjugado) e das dietas (padrão, enriquecida com óleo de cártamo e enriquecida com ácido linoléico conjugado).

Suplemento/Leite/Dieta	Período de indução	Estimativa da vida de prateleira
	(horas)	(dias)
Suplementos		
Óleo de Cártamo	2,7	15
CLA	2,4	13
Leites		
Sem adição de CLA	4,3	11
Com adição de CLA	23,7	> 60
Dietas		
Padrão	5,7	30
Enriquecida com Óleo de Cártamo	4,8	26
Enriquecida com CLA	1,4	7

Os isômeros de CLA apresentam maior estabilidade à oxidação, e isso muito se deve ao fato de possuírem ligações do tipo *trans* em sua estrutura. No entanto, os resultados obtidos pela presente pesquisa permitem discutir que essa estabilidade do CLA é influenciada por vários fatores. Ao comparar a estabilidade de CLA quando esse está em cápsulas, incorporado ao leite ou incorporado à dieta, observa-se que o período de indução à oxidação do ácido graxo é muito maior quando o mesmo está incorporado ao leite, o que pode ser explicado pelas condições de processamento e embalagem, as quais preservam mais as características físicas e químicas do produto. Nota-se um período de indução à oxidação muito curto do CLA incorporado à dieta enriquecida (e que foi oferecida aos ratos), muito provavelmente pelas condições de elaboração da mesma

que por mais que tivessem sido controladas, não impedem que os componentes de sua formulação sejam extensamente manipulados e expostos a agentes pró-oxidantes.

Embora as pesquisas quanto à estabilidade oxidativa dos isômeros de CLA sejam um tanto quanto divergentes, é comum o fato de que o CLA seja mais estável que outros ácidos graxos poliinsaturados que não tenham ligações do tipo *trans*. Até mesmo dentre os isômeros de CLA, aqueles que possuem ligações do tipo *cis* são menos estáveis à oxidação em relação aos *trans*. A estabilidade oxidativa do CLA também é dependente da esterificação para formar acilgliceróis, especialmente os triacilgliceróis, de forma que a estabilidade é menor quando o CLA está em sua forma livre (MIYASAWA *et al.*, 2005; TSUZUKI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2000).

Os presentes resultados indicam que a estabilidade do CLA à oxidação foi diferente conforme a matriz e o processamento dos veículos desse ácido graxo, sendo o leite o veículo mais apropriado por promover as condições mais adequadas à preservação das características físico-químicas do produto, quando comparado à dieta.

4.2 Ensaio Biológico

4.2.1 Dietas Experimentais

Os resultados da determinação da composição centesimal das dietas padrão e enriquecidas podem ser visualizados na Tabela 10. Nota-se um aumento estatisticamente

significante ($p \leq 0,05$) entre o teor lipídico das dietas enriquecidas em relação à dieta padrão. Esta diferença era esperada, uma vez que houve um acréscimo de 2 % no conteúdo lipídico das dietas dos grupos EP (Enriquecido Placebo) e EE (Enriquecido Experimental) com óleo de cártamo e ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®), respectivamente.

Tabela 10. Composição centesimal (g/100g) da dieta padrão e dietas enriquecidas.

Componente	Dieta AIN93G padrão** (g/100g)	Dieta AIN93G enriquecida com óleo de cártamo*** (g/100g)	Dieta AIN93G enriquecida com CLA Tonalin®**** (g/100g)
Proteínas	12,7 ± 0,13	12,52 ± 0,18	12,65 ± 0,40
Lípides	7,09 ± 0,03 ^b	8,73 ± 0,21 ^a	8,54 ± 0,29 ^a
Cinzas	4,97 ± 0,10	4,95 ± 0,05	4,92 ± 0,05
Umidade	3,81 ± 0,03 ^b	3,65 ± 0,05 ^c	3,91 ± 0,08 ^a
Carboidratos*	71,43	70,16	69,98

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

* Determinação de carboidratos feita por diferença

** Dieta utilizada durante o período de adaptação e para os grupos SP e SE durante todo o período experimental

*** Dieta utilizada para o grupo EP durante todo o período experimental

**** Dieta utilizada para o grupo EE durante todo o período experimental

4.2.2 Ganho de Peso e Consumo de Dieta dos Animais Experimentais

Na Tabela 11, estão apresentados os valores de peso inicial (g) e peso final (g) dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), T1 (4 semanas) e T2 (8 semanas). É possível observar que após o período adaptação, quando os animais foram divididos, os grupos

formados não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) quanto ao peso corporal inicial, indicando homogeneidade tanto intra quanto intergrupo. Ao final do primeiro período (T1), assim como no início do segundo (T2) também não foi observada diferença no peso corporal dos animais entre os grupos ($p > 0,05$). No entanto, ao final das 8 semanas de experimentação, o grupo que foi suplementado com ácido linoléico conjugado administrado via entubação orogástrica (SE), apresentou peso final estatisticamente menor do que o grupo que recebeu dieta enriquecida com óleo de cártamo (EP).

Os resultados de consumo de dieta por grupo (g/dia), ganho de peso (g/dia) e eficiência alimentar dos ratos Wistar nos Tempos 0 (10 dias), T1 (4 semanas) e T2 (8 semanas), estão expressos na Tabela 12. Observa-se que para consumo de dieta, apenas os ratos do grupo de referência (T0) tiveram valor estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) em relação aos demais. Não houve diferença estatística entre os grupos ao longo do experimento. Já para ganho de peso e eficiência alimentar, houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os Tempos 1 e 2, porém, não houve diferença entre os grupos no mesmo tempo ($p > 0,05$). Estes resultados demonstram que o consumo de ácido linoléico conjugado, administrado via entubação orogástrica ou por meio de dieta enriquecida, não alterou o consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar. Resultados semelhantes foram observados em diferentes estudos com CLA (PURUSHOTHAM *et al.*, 2007; BISSONAUTH *et al.*, 2006; AKAHOSHI *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2004b). Quando ratos Sprague-Dawley consumiram dieta enriquecida com óleo de soja hidrogenado ao ácido linoléico conjugado nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 %, estes não apresentaram diferença no consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar, quando comparados ao grupo controle após 6 semanas de experimentação

(CHOI *et al.*, 2004). Corroborando estes resultados, Bissonauth *et al.* (2006), também não encontraram diferença no consumo de dieta e ganho de peso de hamsters que receberam separadamente os isômeros *trans-10, cis-12* CLA e *cis-9, trans-11* CLA em comparação ao grupo controle que recebeu ácido linoléico. Mais recentemente, ratos Wistar em idade adulta, após terem recebido dieta durante 3 semanas contendo 1,5 % de CLA, não apresentaram diferença de consumo, ganho de peso e eficiência alimentar quando comparados ao grupo controle (PURUSHOTHAM *et al.*, 2007). Sendo assim, as diferenças observadas neste estudo, entre os Tempos 1 e 2 são decorrentes da idade dos animais e não do tratamento. Sabe-se que animais adultos utilizam a dieta de forma menos eficiente que animais em crescimento (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995).

Tabela 11. Valores médios \pm desvio-padrão de peso inicial (g) e peso final (g) dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

	Grupos	Peso inicial (g)	Peso Final (g)
Tempo 0	(n = 20)	57,98 \pm 15,74 ^c	109,02 \pm 26,49 ^d
Tempo 1	SP (n = 20)	110,90 \pm 18,80 ^b	270,40 \pm 27,30 ^c
	SE (n = 20)	112,80 \pm 22,90 ^b	254,20 \pm 21,00 ^c
	EP (n = 20)	108,80 \pm 22,90 ^b	273,40 \pm 27,20 ^c
	EE (n = 20)	110,50 \pm 13,70 ^b	269,40 \pm 16,20 ^c
Tempo 2	SP (n = 10)	273,58 \pm 18,66 ^a	334,82 \pm 17,70 ^{a,b}
	SE (n = 10)	254,48 \pm 22,77 ^a	309,72 \pm 26,25 ^b
	EP (n = 10)	273,89 \pm 33,05 ^a	340,96 \pm 39,17 ^a
	EE (n = 10)	273,97 \pm 16,09 ^a	334,90 \pm 27,45 ^{a,b}

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

Tabela 12. Valores médios \pm desvio-padrão de consumo de dieta (g/dia), ganho de peso (g/dia) e eficiência alimentar dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	T0		T1			T2			
	(n=20)	SP (n=20)	SE (n=20)	EP (n=20)	EE (n=20)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)
Consumo de dieta (g/dia)	10,93 \pm 2,05 ^b	17,16 \pm 1,32 ^a	16,05 \pm 1,15 ^a	17,01 \pm 1,61 ^a	16,84 \pm 0,97 ^a	16,80 \pm 1,04 ^a	15,51 \pm 1,33 ^a	16,80 \pm 2,46 ^a	16,48 \pm 1,32 ^a
Ganho de peso (g/dia)	4,95 \pm 1,27 ^a	5,15 \pm 0,56 ^a	4,63 \pm 0,58 ^a	5,31 \pm 1,02 ^a	5,13 \pm 0,43 ^a	2,19 \pm 0,54 ^b	1,97 \pm 0,36 ^b	2,50 \pm 0,92 ^b	2,18 \pm 0,50 ^b
Eficiência Alimentar*	0,45 \pm 0,08 ^a	0,30 \pm 0,03 ^a	0,29 \pm 0,03 ^a	0,31 \pm 0,07 ^a	0,30 \pm 0,03 ^a	0,13 \pm 0,03 ^b	0,13 \pm 0,02 ^b	0,15 \pm 0,05 ^b	0,13 \pm 0,03 ^b

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

* Eficiência Alimentar: ganho de peso/consumo de dieta

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

4.2.3 Peso dos Órgãos dos Animais Experimentais

Na Tabela 13 estão os resultados de peso, expressos em g de órgão/100 g de peso corporal, do fígado, coração e rins nos três tempos de suplementação do ensaio biológico: T0, T1 (4 semanas) e T2 (8 semanas). Tanto no primeiro período quanto no segundo período de suplementação não houve diferença de peso entre os grupos para nenhum dos órgãos ($p > 0,05$). Diferenças foram observadas entre os tempos T0 e T1/T2 para os três órgãos; com exceção do peso do fígado dos grupos SP, SE e EE em T1, para todos os outros grupos em T1 e T2 o peso do fígado, coração e rins foi menor em comparação com T0. É importante ressaltar que os ratos iniciaram o ensaio com aproximadamente 21 dias de idade, estágio de vida em que a velocidade de crescimento é significativamente alta. Tal observação parece ser decorrente do processo fisiológico de crescimento dos ratos, já que os valores estão expressos em termos de peso relativo (g/100g) (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995).

Os efeitos fisiológicos do CLA são explicados por muitos mecanismos de inibição/ativação de enzimas envolvidas no metabolismo de lípidos e glicose, os quais resultam essencialmente em redução de lipogênese e/ou aumento de lipólise. As pesquisas recentes demonstram dados cada vez mais evidentes a respeito do possível papel do CLA na modulação da expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas na síntese e oxidação de lípidos biológicos, bem como no metabolismo de glicose e insulina. Dentro desse contexto, muitos grupos de pesquisa investigam possíveis efeitos adversos da suplementação com CLA, visto que a ação desses isômeros em etapas regulatórias da lipogênese e da lipólise pode resultar em efeitos

indesejados, a citar o acúmulo de triacilgliceróis e/ou ácidos graxos livres na corrente sanguínea e/ou órgãos vitais. Os efeitos adversos mais estudados como consequência dos efeitos metabólicos do CLA em diversos modelos experimentais, inclusive humanos, são esteatose hepática e resistência à insulina (LI; HUANG; XIE, 2008; SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2007; NAZARE *et al.*, 2007; INOUE *et al.*, 2006; HOUSE *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2003; PETERS *et al.*, 2001; SMEDMAN; VESSBY, 2001).

É parte do protocolo experimental da maioria dos estudos com CLA determinar indicadores que permitam avaliar a possibilidade desses efeitos adversos. Dentre esses indicadores, está o peso dos órgãos dos modelos experimentais, particularmente o fígado. As pesquisas com CLA, e que incluem a pesagem dos órgãos, são realizadas com diversos modelos experimentais com predominância para os roedores. Não há consenso, visto que os resultados são conflitantes. É importante ressaltar que a ampla diversidade de conclusões a respeito da influência do CLA no peso de órgãos vitais é em grande parte decorrente das diferenças de protocolo experimental (incluindo principalmente dose, proporção de isômeros de CLA e tempo de suplementação) e do animal empregado como modelo experimental. O que se observa com mais clareza é que os trabalhos feitos com roedores geralmente trazem conclusões de leve aumento ou nenhuma alteração de peso de órgãos (fígado principalmente), enquanto que trabalhos feitos com aves (modelo comum em estudos de CLA) demonstram aumento significativo de peso do fígado, provavelmente devido ao acúmulo de lípidos e já com comprometimento de funcionalidade do órgão (OIKAWA *et al.*, 2008; LASA *et al.*, 2007; PURUSHOTHAM *et al.*, 2007; SUKSOMBAT; BOONMEE; LOUNGLAWAN, 2007; NOTO *et al.*, 2006).

Tabela 13. Valores médios \pm desvio-padrão dos pesos do fígado, coração e rins (g de órgão/100 g de peso corporal) nos Tempo 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	T0		T1			T2			
	Grupos (n=20)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)
Fígado (g)	3,29 \pm 0,25 ^a	3,18 \pm 0,19 ^{a,b,c}	3,29 \pm 0,60 ^{a,b}	2,93 \pm 0,14 ^{b,c,d}	3,28 \pm 0,22 ^{a,b}	2,74 \pm 0,20 ^d	2,85 \pm 0,20 ^{c,d}	2,75 \pm 0,26 ^d	2,85 \pm 0,15 ^{c,d}
Coração (g)	0,51 \pm 0,05 ^a	0,35 \pm 0,03 ^{b,c,d,e}	0,38 \pm 0,06 ^{b,e}	0,35 \pm 0,04 ^{b,c,d,e}	0,39 \pm 0,04 ^{b,d}	0,31 \pm 0,03 ^{c,d,e}	0,30 \pm 0,04 ^{c,d,e}	0,30 \pm 0,02 ^{d,e}	0,32 \pm 0,03 ^e
Rins (g)	0,98 \pm 0,06 ^a	0,68 \pm 0,04 ^{b,c,d}	0,77 \pm 0,15 ^b	0,70 \pm 0,02 ^{b,c}	0,75 \pm 0,03 ^b	0,59 \pm 0,04 ^d	0,61 \pm 0,05 ^d	0,62 \pm 0,04 ^{c,d}	0,63 \pm 0,04 ^{c,d}

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

4.2.4 Perfil Lipídico Sérico e Glicemia Plasmática dos Animais Experimentais

Os teores de triacilgliceróis (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e HDL-colesterol (mg/dL) séricos, assim como de glicemia plasmática (mg/dL) podem ser visualizados na Tabela 14. Os valores de triacilglicerol tiveram redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre o Tempo 0 e Tempos 1 e 2. Também foi observada redução de triacilglicerol ($p \leq 0,05$) nos grupos SP e SE entre os Tempos 1 e 2. Já para os grupos que receberam dieta enriquecida (EP e EE) não houve redução significativa ao longo do tempo de experimentação ($p > 0,05$). Comparando-se os grupos suplementados e enriquecidos em um mesmo período, não foi encontrada diferença significativa decorrente do tratamento e via de administração. Com relação aos valores de colesterol total não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos no mesmo período, assim como ao longo do período experimental (Tempos 0, 1 e 2). Apenas o grupo EE no primeiro período (T1), apresentou teores de colesterol total inferiores ($p \leq 0,05$) aos grupos SP e EP no segundo período (T2). Quanto aos valores de HDL-colesterol no Tempo 1, o grupo que recebeu CLA via entubação orogástrica apresentou valores superiores ($p \leq 0,05$) quando comparado ao seu controle. Já os grupos que receberam dieta enriquecida não diferiram entre si. No Tempo 2, os grupos suplementados não diferiram entre si, enquanto o grupo que recebeu dieta enriquecida com CLA (EE) apresentou valores de HDL-colesterol menores que o grupo EP. Comparando-se os grupos ao longo dos Tempos 1 e 2, apenas o grupo Suplementado Placebo (SP), apresentou aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) dos teores de HDL-colesterol após 8 semanas de experimentação. Em relação aos valores de glicemia

plasmática, no Tempo 1, os grupos Suplementado Experimental e Enriquecido Experimental, não diferiram de seus respectivos controles ($p > 0,05$). No entanto, o grupo que recebeu CLA por meio de entubação orogástrica, apresentou valores de glicemia estatisticamente menores que o grupo que recebeu dieta enriquecida com o mesmo composto. Este comportamento também foi verificado entre os grupos no Tempo 2. Ao longo do período experimental, apenas o grupo SP apresentou aumento dos valores de glicemia ($p \leq 0,05$).

Tabela 14. Valores médios \pm desvio padrão de triacilglicerol (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e HDL-colesterol (mg/dL) séricos e glicemia plasmática (mg/dL) dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	T0		T1			T2				
	Grupos	(n=20)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)
Triacilglicerol (mg/dL)		1013,10 \pm	231,81 \pm	220,85 \pm	165,13 \pm	150,65 \pm	108,87 \pm	115,85 \pm	114,40 \pm	105,07 \pm
		370,53 ^a	63,63 ^b	60,18 ^b	54,71 ^{b,c}	31,21 ^{b,c}	24,35 ^c	23,92 ^c	23,34 ^c	21,85 ^c
Colesterol Total (mg/dL)		138,38 \pm	96,17 \pm	89,82 \pm	91,48 \pm	78,32 \pm	139,61 \pm	129,38 \pm	131,39 \pm	102,29 \pm
		104,96 ^{a,b}	23,63 ^{a,b}	18,95 ^{a,b}	25,67 ^{a,b}	17,41 ^b	53,78 ^a	41,02 ^{a,b}	47,39 ^a	46,95 ^{a,b}
HDL-Colesterol (mg/dL)		51,81 \pm	61,13 \pm	95,70 \pm	90,94 \pm	109,59 \pm	124,27 \pm	120,57 \pm	111,06 \pm	77,02 \pm
		7,33 ^e	9,11 ^{b,e}	15,27 ^{a,d}	53,59 ^{b,d,f}	28,88 ^{a,d}	26,90 ^a	19,60 ^a	21,82 ^{a,f}	28,39 ^{d,e}
Glicemia (mg/dL)		155,69 \pm	102,92 \pm	100,93 \pm	120,50 \pm	132,45 \pm	142,62 \pm	126,31 \pm	147,59 \pm	154,16 \pm
		22,49 ^a	10,17 ^c	15,9 ^c	19,2 ^{b,c}	26,68 ^{a,b}	29,97 ^{a,b}	25,43 ^{b,c}	34,49 ^{a,b}	35,68 ^a

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

Os resultados observados neste estudo indicam que o consumo de ácido linoléico conjugado não interferiu nos valores de triacilglicerol e colesterol total séricos, independentemente da forma de administração, exceto para HDL-colesterol no grupo EE, uma vez que as diferenças observadas também ocorreram nos grupos placebos. Da mesma maneira, Azain e colaboradores (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. Após 39 dias de experimentação com ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta AIN-93G acrescida de 3 % de uma mistura de isômeros de CLA ou isenta de CLA, as concentrações de triacilgliceróis, colesterol total e fosfatidilcolina das lipoproteínas LDL e HDL não foram alteradas com o tratamento (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. 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 não apresentou redução ($p > 0,05$) nos teores séricos de triacilgliceróis. Corroborando 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). Mais recentemente, Bissonauth e colaboradores (2006), não observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de triacilgliceróis e colesterol total em hamsters suplementados durante 28 dias com os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 CLA, em relação ao controle. Em relação aos valores de HDL-colesterol,

o grupo que recebeu CLA via entubação orogástrica (SE) apresentou valores de HDL-colesterol superiores ($p \leq 0,05$) após 4 semanas de experimentação quando comparado ao seu controle (SP). No entanto, após 8 semanas de experimentação (T2), o grupo que recebeu CLA por meio da dieta (EE), apresentou teores de HDL-colesterol estatisticamente menores em relação ao seu controle (EP), resultado não observado no Tempo 1. Assim como observado em nossos estudos, grande parte das pesquisas com CLA, nas quais este composto é adicionado à dieta, os teores de HDL-colesterol tendem a diminuir ou não se alterarem (BISSONAUTH *et al.*, 2006; AKAHOSHI *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2004b; GAVINO *et al.*, 2000; SZYMCZYK *et al.*, 2000). No entanto, observamos que quando o mesmo foi consumido por meio de suplementação, o CLA atuou de forma positiva sobre estes valores. Estes resultados sugerem que para valores de HDL-colesterol, a forma de administração parece ser relevante. Neste caso, o consumo de CLA via suplementação atuou de maneira mais eficaz.

Diversos fatores de risco, como a diminuição da tolerância à glicose, etnia, idade, gênero e principalmente a obesidade, estão associados ao desenvolvimento do diabetes mellitus não insulino dependente. Embora controversos alguns estudos tem demonstrado efeito benéfico da suplementação com CLA sobre o controle glicêmico e, desta maneira, este composto tem se relacionado de forma positiva no controle do diabetes. Os resultados deste estudo não demonstraram redução dos teores de glicose plasmática dos grupos que receberam CLA em relação aos seus controles ($p > 0,05$). Entretanto, comparando-se a forma de administração, o grupo que recebeu CLA via entubação orogástrica apresentou valores de glicemia menores ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo que recebeu este composto por meio de dieta, após 4 e 8 semanas. Buscando identificar os efeitos do CLA na prevenção e tratamento do diabetes mellitus não insulino

dependente, Houseknecht 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 duas 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* CLA (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 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, se deve à ação antioxidante destes componentes quando consumidos em conjunto. Resultados semelhantes foram observados quando ratos Wistar adultos receberam, durante 3 semanas, dieta contendo 6,5 % de óleo de soja (grupo controle) ou 5 % de óleo de soja acrescido de 1,5 % de uma mistura de isômeros de CLA

(grupo experimental). Após 15 horas de jejum, o grupo experimental apresentou teores de glicose estatisticamente menores ($p \leq 0,05$) que o grupo controle (PURUSHOTHAM *et al.*, 2007).

Com base nos resultados observados neste estudo quanto ao perfil lipídico sérico e glicemia plasmática dos ratos que receberam óleo de cártamo ou ácido linoléico conjugado durante 4 e 8 semanas, é possível verificar que a quantidade administrada, assim como a forma de administração parecem influenciar a atuação do CLA no organismo (Tabela 14).

4.2.5 Perfil Ósseo dos Animais Experimentais

Os valores de carga máxima (N) obtidos por meio de ensaio de flexão de três pontos nos fêmures direitos dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas), estão expressos na Tabela 15. Observa-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o grupo de referência no Tempo 0 e os grupos no Tempo 1. No entanto, foi observado um aumento da carga máxima (N) necessária para a ruptura dos ossos nos grupos do Tempo 2, quando comparados ao Tempo 0 e 1. Estes resultados sugerem que a ingestão de ácido linoléico conjugado, independentemente da quantidade e forma de administração (entubação orogástrica ou dietética), não interferiu na força necessária para que os fêmures se rompessem.

Na Tabela 16 estão apresentados os valores de cálcio (%), fósforo (%) e a relação Ca:P das tíbias direitas dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas). É possível verificar que não houve influência do tratamento no conteúdo de cálcio e fósforo ósseo dos animais ($p > 0,05$).

Com relação aos resultados de densidade óssea dos animais ao longo do período experimental, apresentados na Tabela 17, nota-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o Tempo 0 (grupo de referência) e os Tempos 1 e 2 (grupos controle e experimentais), exceto para o grupo enriquecido experimental (EE) no Tempo 2, que mostrou-se igual ao Tempo 0. Este aumento observado na densidade óssea pode ser explicado pela idade dos animais. Sabe-se que a densidade óssea máxima é atingida na idade adulta, ou seja, após o Tempo 1. Considerando apenas o Tempo 1, verificou-se que houve diferença relativa a forma de administração do ácido linoléico conjugado, uma vez que os grupos SE e EE, diferiram entre si. A maior densidade óssea observada no grupo que recebeu leite enriquecido (EE) pode ser justificada pela presença no mineral cálcio, presente na matriz alimentar utilizada.

Tabela 15. Valores médios \pm desvio padrão de carga máxima (N) medida em teste biomecânico nos fêmures dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	T0		T1			T2			
Grupos	(n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)
Carga Máxima (N)	42,61 \pm 5,32 ^b	100,98 \pm 10,24 ^b	104,84 \pm 9,50 ^b	105,04 \pm 24,75 ^b	111,04 \pm 18,90 ^b	146,70 \pm 17,03 ^a	154,51 \pm 16,75 ^a	157,75 \pm 23,78 ^a	167,13 \pm 14,92 ^a

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

Tabela 16. Valores médios \pm desvio padrão de cálcio (Ca) e fósforo (P), expressos em %, das tíbias dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	T0		T1			T2			
	(n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)
Ca (%)	11,52 \pm 1,05 ^b	14,26 \pm 0,94 ^a	14,20 \pm 0,44 ^a	14,09 \pm 1,25 ^a	14,51 \pm 0,83 ^a	14,79 \pm 1,22 ^a	14,90 \pm 0,83 ^a	14,31 \pm 0,54 ^a	14,19 \pm 0,83 ^a
P (%)	5,72 \pm 0,39 ^b	7,10 \pm 0,32 ^a	7,20 \pm 0,20 ^a	7,16 \pm 0,44 ^a	7,15 \pm 0,23 ^a	7,17 \pm 0,60 ^a	7,31 \pm 0,42 ^a	7,32 \pm 0,27 ^a	7,30 \pm 0,44 ^a
Ca:P	2,01 \pm 0,08	2,01 \pm 0,09	1,97 \pm 0,05	1,97 \pm 0,07	2,03 \pm 0,08	2,06 \pm 0,06	2,04 \pm 0,06	1,96 \pm 0,07	1,95 \pm 0,05

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

Tabela 17. Valores médios \pm desvio padrão da densidade óssea dos fêmures expressa em g/cm^3 dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	T0		T1			T2			
Grupos	(n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)
Densidade Óssea (g/cm^3)	$1,30 \pm 0,15^b$	$2,81 \pm 1,79^{e,f,g}$	$2,25 \pm 0,66^{d,e}$	$3,08 \pm 1,08^f$	$2,65 \pm 0,15^{a,f}$	$3,17 \pm 0,84^{a,c,d}$	$2,67 \pm 1,03^{a,c,g}$	$3,60 \pm 0,35^{a,c,d}$	$2,51 \pm 1,52^{a,b,c,d,f}$

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

Sabe-se que a osteoporose, uma doença caracterizada pela perda progressiva da massa óssea e aumento na fragilidade do esqueleto é considerada um problema de saúde pública, atingindo principalmente mulheres na fase adulta. O tecido ósseo possui a capacidade de remodelar-se ao longo da vida, por meio do equilíbrio entre sua formação e degeneração, atividades controladas pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (MACKIE, 2003). Algumas evidências têm apontado que a composição dos ácidos graxos da dieta seja capaz de modular a mineralização óssea (LI; WATKINS, 1998; COOK, JEROME, PARIZA, 1997; McCARTHY *et al.*, 1991). Neste sentido, inúmeros estudos com CLA têm sido desenvolvidos a fim de verificar o efeito deste ácido graxo na formação do esqueleto e dessa forma atuar como aliado na prevenção e/ou tratamento da osteoporose.

Para determinar a influência do CLA na formação óssea, Cook, Jerome e Pariza (1997), suplementaram a dieta de 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. Resultados similares foram encontrados por Park e colaboradores (1997), quando camundongos foram suplementados com 0,5 % de CLA durante 32 dias. Este mesmo grupo de pesquisadores, observou aumento de 14,5 % no conteúdo de cinzas de camundongos suplementados com 0,5 % de uma mistura de isômeros de CLA durante 4 semanas (PARK *et al.*, 1999). Em projeto anterior desenvolvido por este Grupo de Pesquisa, foi verificado aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) no conteúdo de cinzas de ratos Wistar, suplementados por 42 dias com 2 % sobre o consumo diário de dieta utilizando duas misturas comerciais de CLA ($9,25 \pm 0,54$ g e $8,82 \pm 0,47$ g, grupos CLA *Advantage* e CLA *One*, respectivamente),

quando comparados ao grupo controle ($8,04 \pm 0,39$ g) (BOTELHO; SANTOS-ZAGO; OLIVEIRA, 2008).

Os mecanismos de ação propostos pelos quais o CLA atua sobre o metabolismo esquelético, incluem sua capacidade de alterar os fatores que influenciam a formação e reabsorção ósseas. O consumo de CLA tem se mostrado efetivo sobre a modulação de citocinas como a interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), leucotrieno B₄ (LTB₄) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) por meio da ativação de fatores nucleares, principalmente o NF κ B. Estas citocinas, quando liberadas pelos macrófagos regulam a atividade dos osteoblastos, aumentam a reabsorção óssea e dessa maneira enfraquecem o esqueleto (TROEN, 2003). Como consequência do aumento da interleucina-6, ocorre a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que por sua vez, também ativa os osteoclastos (SUDA; UDAGAWA; SATO, 2004; RAISZ, 1995). As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido linoléico via ciclooxigenases. O CLA tem se mostrado capaz de competir com o ácido linoléico pela absorção e com isto inibir a produção de PGE₂ (CUSACK; JEWELL; CASHMAN, 2005; KELLY; CASHMAN, 2004). Em estudo realizado com camundongos C57BL/6 durante 10 semanas, o grupo que recebeu CLA na concentração de 0,5 %, apresentou diminuição da atividade da IL-6 e TNF- α em comparação ao grupo controle. Estes resultados explicam a manutenção da densidade mineral óssea observada no grupo tratado (RAHMAN *et al.*, 2007). Objetivando verificar o efeito do CLA sobre a produção de PGE₂, Li e Watkins (1998) suplementaram ratos com 0,5 % de CLA durante 42 dias. Após o período de experimentação, os fêmures e tíbias foram retirados e a produção *ex vivo* de PGE₂ foi analisada. O grupo que recebeu CLA apresentou menores valores de PGE₂ ($p \leq 0,05$) quando comparado ao controle. Acredita-se que baixas

concentrações de PGE₂ estão associadas a melhora na formação óssea dos animais. Dessa maneira o CLA atuaria contribuindo positivamente para a saúde do esqueleto (HUR; PARK, 2007).

Embora inúmeros estudos demonstrem ação benéfica do CLA sobre o metabolismo ósseo, o efeito deste composto sobre o conteúdo mineral, densidade e massa óssea ainda é controverso (KELLY; CASHMAN, 2004; KELLY *et al.*, 2003). Neste presente estudo, a carga máxima (N) aplicada durante o ensaio biomecânico antes da ruptura dos ossos, o conteúdo mineral de cálcio e fósforo (%), assim como a densidade óssea dos fêmures (g/cm³) não foram modificados pelo consumo de 2 % de CLA administrado por meio de entubação orogástrica e dieta enriquecida. Resultados semelhantes foram observados por Kelly e colaboradores (2003). Ratos Wistar em crescimento receberam dieta AIN-93G contendo 1 % de CLA. Após 8 semanas de experimentação não foi observado efeito sobre a massa mineral óssea do grupo CLA em relação ao controle. Mais recentemente, Park; Pariza; Park (2008), relataram que esta inconsistência nos dados com relação a atuação do CLA sobre a massa óssea pode ser em parte devido à interação entre seus isômeros e o cálcio dietético. Alguns estudos relacionam o isômero *cis-9, trans-11*, e não o *trans-10, cis-12*, como sendo o responsável pela melhora no perfil ósseo dos animais (DOYLE *et al.*, 2005; GAULLIER *et al.*, 2004; KREIDER *et al.*, 2002). Nesta presente pesquisa, foram utilizadas misturas de isômeros de CLA, o que impossibilita uma análise em separado da sua atuação. O cenário atual sugere que os efeitos do CLA sobre a formação óssea dependem do isômero utilizado, da proporção de ácidos graxos poliinsaturados, dos minerais na dieta e do estágio de desenvolvimento dos animais.

4.2.6 Composição Corporal Centesimal dos Animais Experimentais

Na Figura 7 estão apresentados os valores de proteína, lípides e cinzas, correspondentes a composição corporal centesimal dos ratos nos Tempos 0, 1 e 2. Nota-se que houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do teor de lípides nos Tempos 1 e 2, em relação ao Tempo 0. Este aumento pode ser explicado pela idade dos ratos, uma vez que tecido adiposo tem seu crescimento entre as 12^a e 16^a semanas dos animais. Ainda com relação ao teor de lípides, nota-se que no Tempo 1 houve redução no grupo que recebeu dieta contendo ácido linoléico conjugado (EE) em relação ao grupo que recebeu dieta sem a adição deste composto (EP). No entanto, ao final das 8 semanas de experimentação (Tempo 2), o mesmo grupo EE, mostrou-se com teores de lípides maiores que o grupo EP. Possivelmente, ao final das 4 semanas (Tempo 1) o conteúdo de CLA contido na dieta, era suficiente para causar o efeito observado. Porém, ao final do Tempo 2, este composto pode ter sofrido oxidação e dessa maneira não mais exerceu efeito na redução da gordura corporal. Estes resultados podem ser justificados pelos dados apresentados na Tabela 9, na qual observa-se que a dieta enriquecida com CLA foi aquela que apresentou menor vida de prateleira em comparação as demais matrizes alimentares. Conforme mencionado anteriormente as condições de elaboração da dieta que por mais que tivessem sido controladas, não impediram que os componentes de sua formulação fossem manipulados e expostos a agentes pró-oxidantes.

Com relação aos teores de proteína, vale ressaltar que no Tempo 1, o grupo que recebeu CLA por meio de suplementação (SE), apresentou valores maiores do que o grupo que recebeu dieta enriquecida com este composto (EE).

Os teores de cinzas não diferiram entre os grupos ao longo do período experimental ($p > 0,05$). Este resultado confirma os dados obtidos no perfil ósseo dos animais (Tabelas 15, 16 e 17).

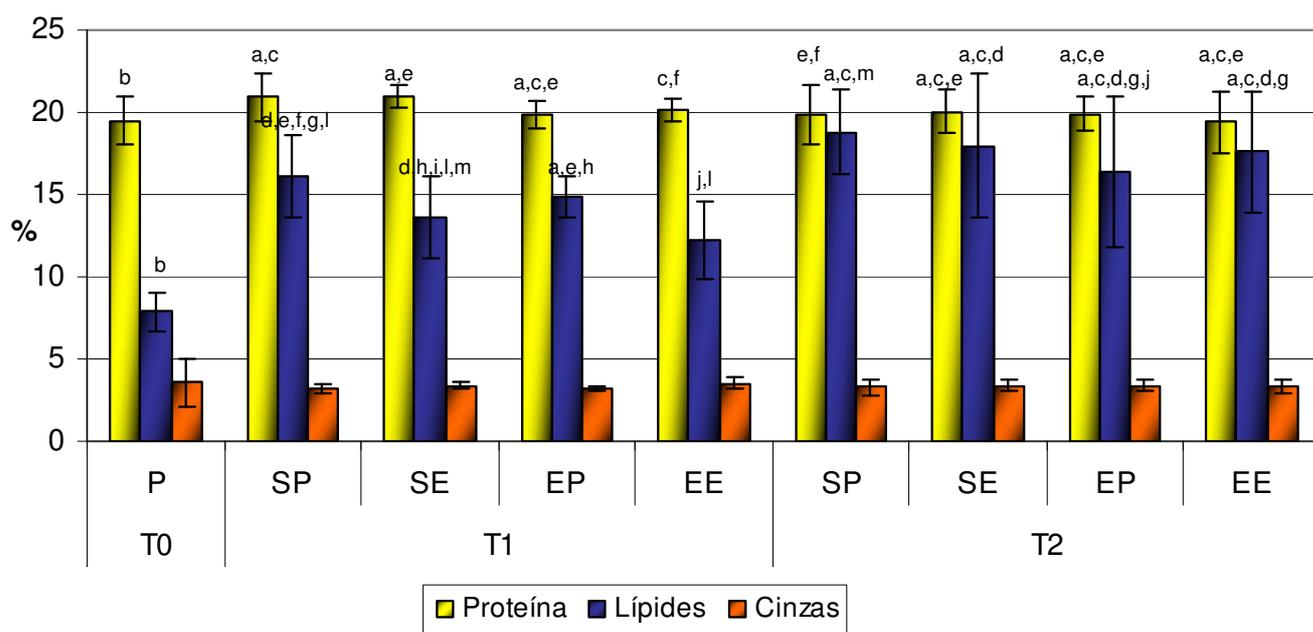


Figura 7. Composição corporal centesimal em base úmida dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística para barras de mesma cor, em relação aos grupos controle e experimental, nos Tempos 0, 1 e 2 segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

4.2.7 Perfil Hormonal dos Animais Experimentais

Na Tabela 18 estão apresentados os valores da concentração sérica de adiponectina, grelina e leptina, expressos em ng/mL e plasmáticos de insulina (ng/mL), assim como os valores de resistência à insulina, expressa pela fórmula HOMA-IR dos ratos nos Tempos 0, 1 e 2. Nota-se que nos Tempo 1 e 2 os hormônios leptina e adiponectina demonstraram aumento significativo em relação ao placebo para quase a totalidade dos grupos analisados. Ainda no Tempo 1 a leptina destaca-se por ter apresentado valores inferiores no grupo que recebeu CLA por meio de entubação orogástrica (SE) em relação ao grupo placebo (SP). Já os hormônios adiponectina e grelina apresentaram valores inferiores quando os animais receberam o CLA por meio de dieta enriquecida (EE), em relação aos seus respectivos controles (EP). No Tempo 2, a adiponectina confirmou esta tendência, sugerindo que este hormônio seja dependente da forma de administração.

Tabela 18. Valores médios \pm desvio padrão da concentração de adiponectina, grelina e leptina séricos (ng/mL), insulina plasmática (ng/mL) e HOMA-IR dos ratos nos Tempos 0 (10 dias), 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

Tempo	Tempo 0		Tempo 1			Tempo 2			
	Grupos	(n=20)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)	EE (n=10)	SP (n=10)	SE (n=10)	EP (n=10)
Adiponectina (ng/mL)	19546,87 \pm 3602,31 ^b	21951,43 \pm 4375,62 ^{a,b}	26607,96 \pm 6885,84 ^{a,d}	17165,52 \pm 2956,04 ^{a,b}	17963,14 \pm 3058,68 ^{b,c}	21555,36 \pm 4874,19 ^{b,d}	31242,83 \pm 7168,75 ^c	13834,5 \pm 2807,51 ^{c,d}	22484,84 \pm 4920,99 ^{b,e}
Grelina (ng/mL)	0,64 \pm 0,45 ^a	0,49 \pm 0,06 ^{a,b,c,d}	0,45 \pm 0,19 ^{a,b,d,f}	0,14 \pm 0,05 ^{b,c,d,f}	0,12 \pm 0,03 ^{c,e}	0,15 \pm 0,03 ^{e,f}	0,31 \pm 0,23 ^{b,c}	0,55 \pm 0,18 ^{a,b,c}	0,56 \pm 0,05 ^{a,b,d,e,f}
Leptina (ng/mL)	0,57 \pm 0,26 ^b	4,83 \pm 2,24 ^{a,d}	2,55 \pm 1,12 ^{c,f}	3,31 \pm 1,42 ^{a,c,d}	2,16 \pm 0,84 ^{a,c}	8,52 \pm 3,74 ^{c,e,f}	5,47 \pm 3,05 ^{a,d,e}	5,64 \pm 3,18 ^{a,c,d}	5,32 \pm 3,11 ^{d,f}
Insulina (ng/mL)	0,76 \pm 0,59 ^b	1,52 \pm 1,17 ^{a,c,d}	1,03 \pm 0,61 ^{b,d}	1,28 \pm 1,15 ^{a,c}	1,15 \pm 0,62 ^c	1,55 \pm 0,99 ^{a,c}	1,53 \pm 1,28 ^{a,c}	1,29 \pm 1,05 ^{b,d}	2,25 \pm 1,33 ^a
HOMA-IR	0,01 \pm 0,01 ^b	0,01 \pm 0,01 ^{b,d,f}	0,01 \pm 0,00 ^{b,e}	0,09 \pm 0,09 ^{a,c,d,e}	0,08 \pm 0,03 ^{c,d}	0,13 \pm 0,08 ^{a,c,e}	0,11 \pm 0,09 ^{a,c,f}	0,12 \pm 0,11 ^{a,c,e,f}	0,22 \pm 0,15 ^{a,e,f}

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

4.2.8 Expressão Gênica das Enzimas Carnitina Palmitoil Transferase II, Ácido Graxo Sintase e das Isoformas α e γ dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR α e PPAR γ) no Fígado e Tecido Adiposo

A expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II e ácido graxo sintase, envolvidas nos processos de oxidação e síntese de ácidos graxos, respectivamente pode ser visualizada nas Figuras 8 e 9. Com relação a expressão das enzimas no tecido hepático, nota-se que houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de ambas as enzimas nos grupos tratados com CLA, seja por meio de suplementação ou dieta enriquecida, nos Tempos 1 e 2. No tecido adiposo epididimal, houve redução da enzima ácido graxo sintase nos grupos que receberam ácido linoléico conjugado, por meio de suplementação e dieta enriquecida após 4 e 8 semanas (Tempo 1 e 2). Já para a enzima carnitina palmitoil transferase II, houve redução ($p < 0,05$) apenas no Tempo 1, entre os grupos que receberam óleo de cártamo (placebo) e CLA (experimental). É importante ressaltar que as diferenças observadas foram significativas entre os grupos, ou seja, entre os animais que receberam ácido linoléico (placebo) ou CLA (experimental), e não em relação a maneira como estes compostos foram administrados (suplementação ou dieta enriquecida), sugerindo que para estes indicadores a forma de administração não foi relevante. Com relação a expressão gênica das isoformas α e γ dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma nos grupos suplementados com CLA e nos que consumiram dieta enriquecida com CLA, observou-se aumento tanto no tecido hepático quanto no tecido adiposo epididimal, conforme a ilustração nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

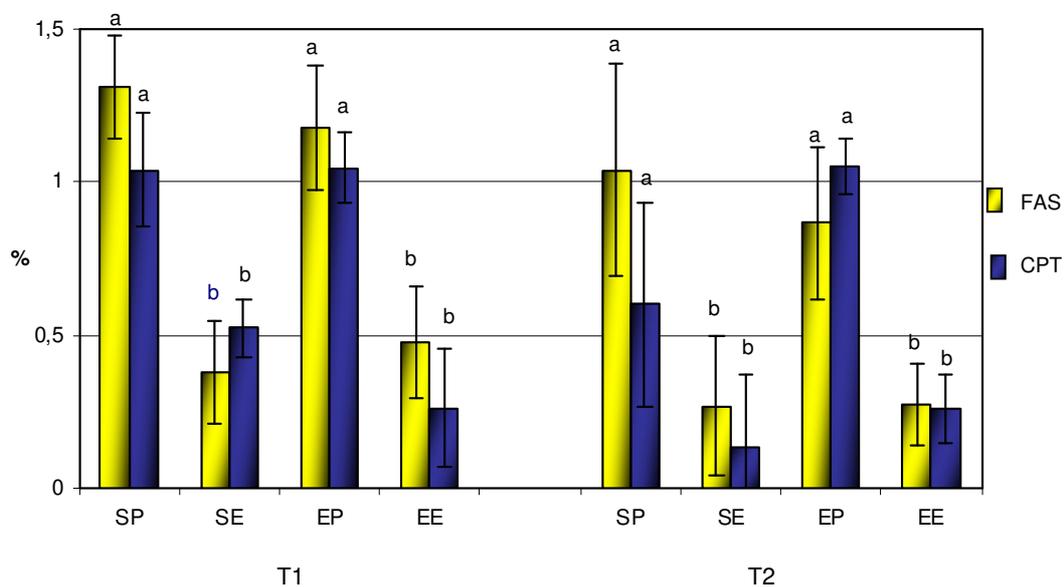


Figura 8. Expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II (CPT) e ácido graxo sintase (FAS) no tecido hepático de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística para barras de mesma cor, em relação aos grupos controle e experimental segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

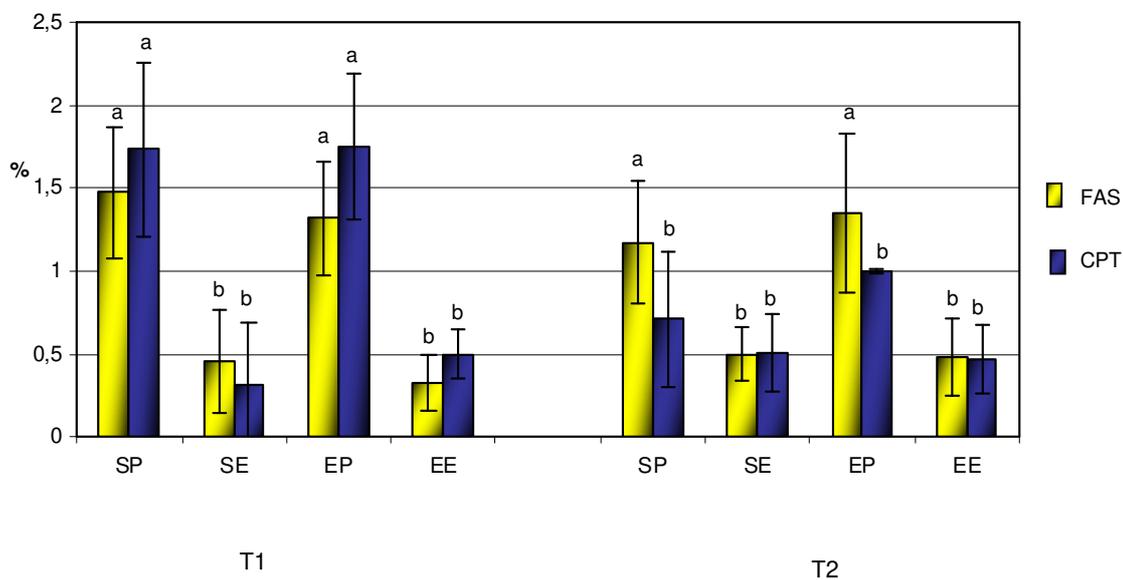


Figura 9. Expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II (CPT) e ácido graxo sintase (FAS) no tecido adiposo epididimal de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística para barras de mesma cor, em relação aos grupos controle e experimental segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

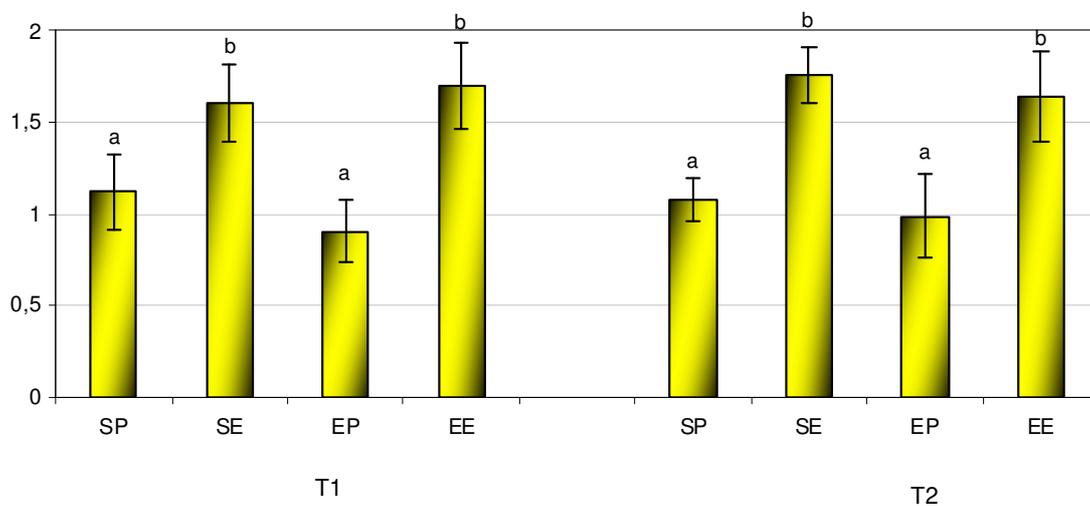


Figura 10. Expressão gênica do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) α no tecido hepático de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística, em relação aos grupos controle e experimental segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

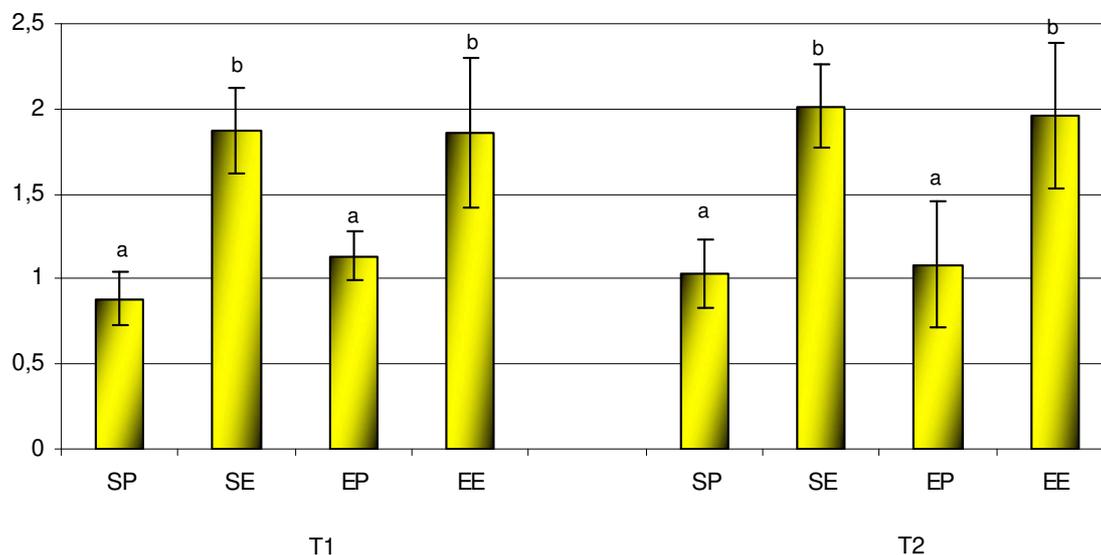


Figura 11. Expressão gênica do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) γ no tecido hepático de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística, em relação aos grupos controle e experimental segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

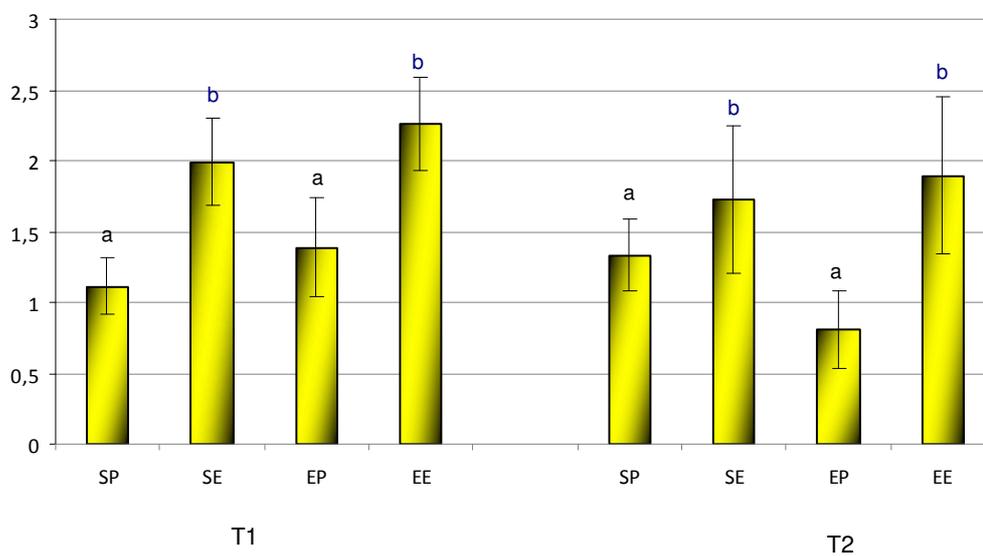


Figura 12. Expressão gênica do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) α no tecido adiposo epididimal de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística, em relação aos grupos controle e experimental segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

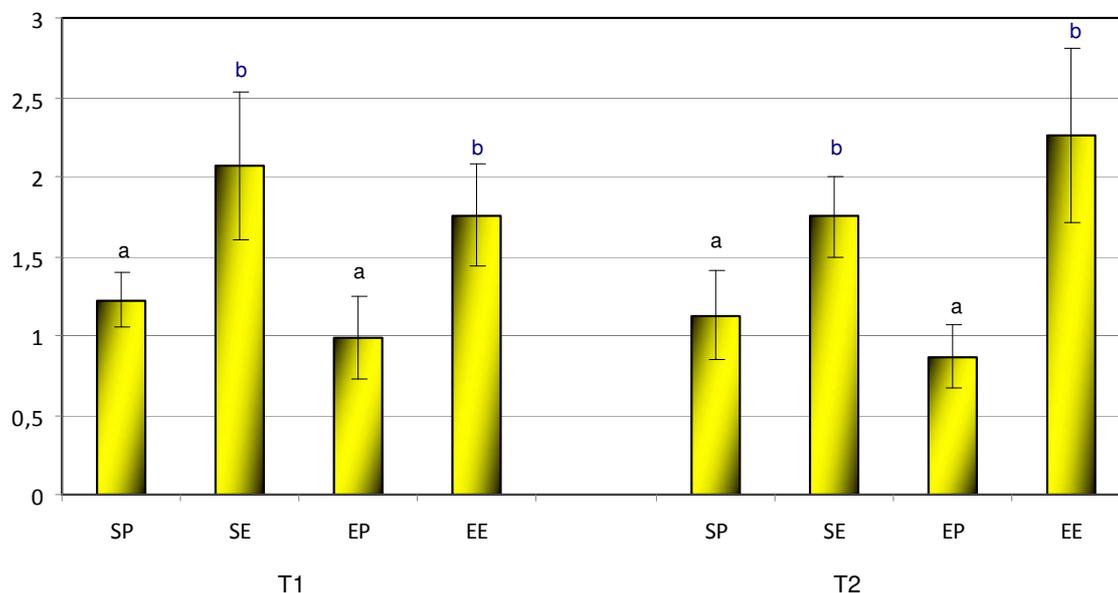


Figura 13. Expressão de receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) γ no tecido adiposo epididimal de ratos Wistar nos Tempos 1 (4 semanas) e 2 (8 semanas).

* Letras diferentes indicam diferença estatística, em relação aos grupos controle e experimental segundo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Grupo SP (Suplementado Placebo): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo por meio de entubação orogástrica;

Grupo SE (Suplementado Experimental): 2 % em relação ao consumo diário de dieta de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) por meio de entubação orogástrica;

Grupo EP (Enriquecido Placebo): dieta enriquecida com 2 % de óleo de cártamo;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): dieta enriquecida com 2 % de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®).

As pesquisas com CLA têm demonstrado de forma exaustiva sua ação como um potente agente repartidor de nutrientes, capaz de alterar a composição corporal, promovendo redução de massa gorda e aumento de massa magra em diferentes espécies (WANG; JONES, 2004; SISK *et al.*, 2001; DECKERE *et al.*, 1999; PARK *et al.*,

1997). Resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa confirmam estas evidências. Quando ratos Wistar foram suplementados com 2 % de CLA sobre o consumo diário de dieta, estes apresentaram 18 % de redução da massa gorda, tanto aos 21 quanto aos 42 dias de tratamento. Também foi observado aumento de 7,5 % dos teores de cinzas, sugerindo potencialização da mineralização óssea (BOTELHO *et al.*, 2005a; BOTELHO *et al.*, 2005b).

A discussão acerca dos resultados de composição corporal, expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase II, ácido graxo sintase e das isoformas α e γ dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α e PPAR γ) no fígado e tecido adiposo, assim como do perfil hormonal do ensaio biológico será abordada em conjunto aos resultados do ensaio clínico e encontram-se a seguir.

4.3 Ensaio Clínico

4.3.1 Caracterização da População

Tabela 19. Caracterização da população de indivíduos do sexo masculino que participou do Projeto de Pesquisa

Grupo	N	Idade (anos)
SP	15	43,9 ± 10,7
SE	19	38,6 ± 8,62
EP	10	37,0 ± 11,0
EE	9	39,6 ± 10,5

Grupo SP (Suplementado Placebo): consumo diário de 3 cápsulas de óleo de cártamo;

Grupo SE (Suplementado Experimental): consumo diário de 3 cápsulas de de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®);

Grupo EP (Enriquecido Placebo): consumo diário de 500 mL de leite sem adição de ácido linoléico conjugado;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): consumo diário de 500 mL de leite com adição de ácido linoléico conjugado

4.3.2 Consumo Alimentar

Os resultados referentes à ingestão diária, assim como os valores diários de referência, valores de z e p para energia e nutrientes, dos grupos placebo e experimentais, podem ser visualizados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20. Ingestão diária média \pm desvio padrão de energia e nutrientes dos sujeitos da pesquisa durante o período de intervenção.

Energia/nutriente	SE	SP	EE	EP
	n=17	n=14	n=8	n=9
Energia (Kcal)	2516,48 \pm 618,84	2560,32 \pm 1158,57	2342,89 \pm 997,02	2621,40 \pm 1135,69
Proteínas (g)	112,16 \pm 26,82	118,78 \pm 72,02	104,95 \pm 43,97	103,84 \pm 22,51
Proteínas (% VET)	17,83	18,56	17,92	15,85
Carboidratos (g)	282,48 \pm 81,61	282,54 \pm 106,42	276,68 \pm 116,37	278,99 \pm 60,44
Carboidratos (% VET)	44,90	44,14	47,24	42,57
Lípides (g)	93,69 \pm 34,10	88,74 \pm 56,26	90,53 \pm 46,71	85,31 \pm 19,93
Lípides (% VET)	33,51	31,19	34,78	29,29
AGS (g)	27,31 \pm 10,97	30,95 \pm 28,75	31,73 \pm 23,03	29,73 \pm 8,83
AGP (g)	13,52 \pm 7,05	11,56 \pm 6,40	11,11 \pm 4,82	9,67 \pm 2,86
AGM (g)	29,59 \pm 13,64	28,59 \pm 16,40	27,48 \pm 13,18	26,96 \pm 7,37
Colesterol (mg)	250,12 \pm 94,91	276,26 \pm 162,12	273,24 \pm 145,83	274,88 \pm 84,82
Fibras (g)	22,66 \pm 10,26	24,10 \pm 11,73	15,29 \pm 5,55	17,99 \pm 6,80
Vitamina E (mg)	6,12 \pm 3,29	5,16 \pm 2,37	4,05 \pm 2,38	3,58 \pm 1,32
Vitamina A (μ g)	277,12 \pm 146,04	466,92 \pm 567,77	637,74 \pm 560,53	422,72 \pm 198,51
Ácido fólico (μ g)	152,75 \pm 62,77	141,46 \pm 45,90	146,97 \pm 60,40	169,25 \pm 59,12
Vitamina B12 (μ g)	5,37 \pm 2,01	4,63 \pm 1,48	7,06 \pm 5,43	6,25 \pm 2,18
Vitamina B6 (mg)	2,10 \pm 0,73	2,07 \pm 0,96	1,73 \pm 0,71	2,22 \pm 1,04
Vitamina C (mg)	183,72 \pm 158,64	150,46 \pm 83,40	111,34 \pm 67,53	108,43 \pm 62,32
Cálcio (mg)	870,61 \pm 419,85	684,86 \pm 261,94	747,51 \pm 312,18	990,77 \pm 376,45
Ferro (mg)	17,38 \pm 4,88	16,42 \pm 4,41	13,37 \pm 4,86	15,26 \pm 4,09
Fósforo (mg)	1511,65 \pm 457,95	1345,25 \pm 648,78	1644,70 \pm 1076,98	1471,14 \pm 362,55
Cobre (μ g)	1,35 \pm 0,42	1,42 \pm 0,50	1,07 \pm 0,32	1,20 \pm 0,41
Zinco (mg)	12,87 \pm 4,01	14,82 \pm 8,45	12,83 \pm 5,46	13,20 \pm 3,03
Selênio (μ g)	132,86 \pm 65,00	164,14 \pm 165,00	123,57 \pm 50,33	121,22 \pm 28,50

Resultados e Discussão

Sódio (mg)	2983,32±1355,79	2864,65±1790,85	2514,49±811,51	2498,91±756,74
Potássio (mg)	3017,58±925,28	3239,65±2638,97	2881,38±1722,94	2632,72±704,22

Tabela 21. Valores diários de referência, valores de *z* e valores de *p* para energia e nutrientes dos grupos placebo e experimentais.

Energia/nutriente	Referência	SE		SP		EE		EP	
		n=17		n=14		N=8		n=9	
		Z	p	z	p	Z	p	Z	P
Energia (Kcal)	2592,68 ¹	0,1231	0,5398	0,0279	0,5000	0,2505	0,5987	-0,0253	0,4801
Proteínas (g)	57,27 ^{2a}	-2,0465	0,0202	-0,8540	0,1977	-1,0846	0,1357	-2,0685	0,0202
Proteínas (%)	10-35 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Carboidratos (g)	130 ^{2b}	-1,8684	0,0322	-1,4334	0,0735	-1,2604	0,1056	-2,4651	0,0071
Carboidratos (%)	45-65 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Lípides (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lípides (%)	20-35 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
AGS (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGP (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGM (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colesterol (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibras (g)	38 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitamina E (mg)	12 ^{2b}	1,7820	0,9641	2,8764	0,9978	3,3306	0,9997	6,3735	0,9999
Vitamina A (µg)	625 ^{2b}	2,3820	0,9918	0,2784	0,6179	-0,0227	0,4801	1,0190	0,8413
Ácido fólico (µg)	320 ^{2b}	2,6643	0,9960	3,8894	0,9999	2,8643	0,9978	2,5496	0,9946
Vitamina B12 (µg)	2 ^{2b}	-1,6777	0,0495	-1,7704	0,0401	-0,9311	0,1711	-1,9472	0,0256
Vitamina B6 (mg)	1,1 ^{2b}	-1,3621	0,0885	-1,0154	0,1587	-0,8785	0,1841	-1,0730	0,1469
Vitamina C (mg)	75 ^{2b}	-0,6853	0,2420	-0,9049	0,1841	-0,5381	0,2912	-0,5365	0,2912
Cálcio (mg)	1000 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferro (mg)	6 ^{2b}	-2,3302	0,0094	-2,3605	0,0094	-1,5172	0,0668	-2,2643	0,0122
Fósforo (mg)	580 ^{2b}	-2,0344	0,0202	-1,1795	0,1251	-0,9886	0,1587	-2,4580	0,0071

Cobre (µg)	700 ^{2b}	-1,5484	0,0606	-1,4427	0,0735	-1,1497	0,1251	-1,2315	0,1056
Zinco (mg)	9,4 ^{2b}	-0,8652	0,1977	-0,6409	0,2578	-0,6298	0,2743	-1,2528	0,1056
Selênio (µg)	45 ^{2b}	-1,3517	0,0885	-0,7221	0,2420	-1,5611	0,0606	-2,6738	0,0040
Sódio (mg)	2300 ⁵	-0,5040	0,3085	-0,3153	0,3821	-0,2643	0,4013	-0,2629	0,4013
Potássio (mg)	4700 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-

¹TEE: *Total Energy Expenditure*; obtido a partir da equação $1086 - [(10,1 * \text{idade}(\text{anos})) + \text{PAL} * [(13,7 * \text{peso}(\text{kg}) + 418 * \text{altura}(\text{m}))]$ para homens com sobrepeso e obesidade a partir de 19 anos; PAL: *Physical Activity Level* utilizado foi 1,0; idade utilizada foi 39,8 anos (média entre os grupos considerando idade de cada voluntário na data da triagem); peso utilizado foi 86,76kg e altura utilizada foi 1,73m (valores médios entre os grupos e entre os tempos)

^{2a}EAR: *Estimated Average Requirement*; 0,66g/kg para homens no estágio de vida entre 31 e 50 anos (utilizando peso médio entre os grupos e os tempos de 86,76kg)

^{2b}EAR: *Estimated Average Requirement* para homens no estágio de vida entre 31 e 50 anos

³AMDR: *Acceptable Macronutrients Distribution Range* para homens no estágio de vida entre 31 e 50 anos

⁴AI: *Adequate Intake* para homens no estágio de vida entre 31 e 50 anos

⁵UL: *Tolerable Upper Intake Level* para homens no estágio de vida entre 31 e 50 anos

- sem valor e/ou não se aplica

Conforme dados apresentados na Tabela 20 os grupos apresentaram, durante a intervenção, prevalências de ingestão média de energia e nutrientes muito semelhantes. De acordo com a proposta do *Institute of Medicine* (2001) de avaliação da ingestão média de grupos observou-se alta prevalência de ingestão média abaixo do valor *Estimated Average Requirement* para ácido fólico, vitamina E e vitamina A. Quanto a ingestão média de fibras, cálcio e potássio nenhuma conclusão pode ser tirada a respeito visto que os valores de ingestão média em todos os grupos foi abaixo dos respectivos valores de *Adequate Intake*. Quanto à ingestão média de sódio, observou-se que a prevalência de ingestão abaixo do valor de *Tolerable Upper Intake Level* para esse mineral variou entre 30 e 40%, o que caracteriza grande proporção de indivíduos com ingestão acima desse valor de referência que estabelece limite de risco para efeito adverso por ingestão excessiva. A prevalência de ingestão de energia abaixo do valor de *Total Energy Expenditure* variou entre 48 e 59 %. Vale ressaltar que no caso da energia há forte correlação entre ingestão e necessidade fazendo com que a distribuição dos dados seja assimétrica, o que reduz a efetividade da avaliação da ingestão pelo método utilizado (SLATER; MARCHIONI; FISBERG, 2004). A distribuição dos macronutrientes em relação ao total de energia está de acordo com os valores de *Acceptable Macronutrients Distribution Range* para carboidratos (percentual médio entre os grupos de 44,71 %) e proteínas (percentual médio entre os grupos de 17,53 %); para os lípidos o percentual médio entre os grupos foi de 32,19 % em relação ao total de energia, ou seja, acima do limite máximo da faixa proposta pelo *Institute of Medicine* que é de 20-35 %.

O perfil de ingestão de energia e da maioria dos nutrientes avaliados indica que do ponto de vista quantitativo não há vulnerabilidade para ingestão inadequada, ainda que, os aspectos qualitativos envolvidos na ingestão, digestão e metabolismo de energia

e nutrientes, não tenham sido avaliados por não constituírem objeto de estudo da presente Pesquisa. Por outro lado, observou-se certo desequilíbrio entre a distribuição de macronutrientes demonstrando possível ingestão excessiva de lípidos totais; mais uma vez ressalta-se a importância da avaliação qualitativa da ingestão para se chegar a uma conclusão precisa a respeito. Outra ressalva a ser feita diz respeito à ingestão de sódio já que todos os grupos apresentaram perfil que promove risco de efeito adverso em decorrência de ingestão excessiva.

Sabe-se que a avaliação da ingestão de energia e nutrientes é um processo complexo que envolve uma série de etapas, as quais devem ser bem controladas no sentido de minimizar erros que possam diminuir a precisão dos dados. As principais etapas do processo de avaliação da ingestão envolvem aspectos fundamentais, dentre os quais pode-se citar:

- i. A escolha do inquérito dietético;
- ii. O número de dias de inquérito dietético;
- iii. A base de dados sobre a composição dos alimentos;
- iv. Os valores de referência de ingestão de energia e nutrientes.

A dieta dos participantes do estudo foi avaliada antes da intervenção por meio de Registro Alimentar (Anexo 5) de 7 dias. Durante a intervenção a dieta foi avaliada por meio de Registro Alimentar de 3 dias não consecutivos, incluindo um dia do final de semana, realizado semanalmente (MEDLIN; SKINNER, 1998). Após o término da intervenção o cômputo de inquéritos válidos para a Pesquisa foi de no mínimo 23,6 e no máximo 36,5 dias de inquérito por grupo perfazendo um valor médio de 39,1 dias de

inquérito entre os grupos de sujeitos da Pesquisa. O Registro Alimentar foi o método de inquérito dietético escolhido por se tratar de um método que avalia o consumo atual e de forma quantitativa. Quanto à base de dados sobre a composição química dos alimentos, pode-se dizer que a situação ideal e que forneceria dados com maior precisão, seria a utilização de dados essencialmente analíticos e, sobretudo, nacionais. Sabe-se da dificuldade de encontrar tal situação ideal, devido a fatores relacionados particularmente com a escassez de dados científicos sobre o assunto. Atualmente, a comunidade científica dispõe de referência puramente analítica e nacional por meio da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA, 2004), Tabela essa que compõe a base de dados do programa utilizado para o cálculo dietético na presente Pesquisa. A utilização de programas para avaliar a ingestão alimentar é uma realidade no âmbito da pesquisa pela praticidade de inserção dos dados e agilidade na obtenção das informações. A opção por utilizar o programa *DietPro*[®] na presente Pesquisa deve-se ao fato do mesmo apresentar em sua base de dados informação quantitativa a respeito de isômeros de ácido linoléico conjugado nos alimentos por meio dos dados nacionais sobre nutrientes do *United States Department of Agriculture*. Quanto aos valores de energia e nutrientes utilizados como referências para a avaliação da ingestão média durante o período experimental, esses foram aqueles preconizados pelo *Institute of Medicine*. Sabe-se das limitações de utilização de valores de referência norte-americanos para outras populações, incluindo a população brasileira. No entanto, diante da escassez de dados nacionais sobre consumo e da ausência de valores de referência no âmbito nacional, utilizou-se a referência clássica norte-americana reconhecida universalmente quanto aos seus aspectos históricos, técnico-científicos e consensuais. Buscou-se a proporção de ingestão média abaixo ou acima de determinado valor de referência das *Dietary*

Reference Intakes, comparando a distribuição da ingestão média com o valor de referência *Estimated Average Requirement* para os nutrientes que o possui; tal comparação, conforme Beaton (1994) fornece dados mais acurados a respeito da ingestão média. Utilizou-se esse método, conhecido como “ponto de corte da EAR” ou “EAR como ponto de corte” partindo do pressuposto teórico de que a variação individual da ingestão é maior que a variação das necessidades na população e que pequenos desvios nesses pressupostos tem pouco efeito no desempenho do método (SLATER; MARCHIONI; FISBERG, 2004).

Ainda que não seja objetivo da presente Pesquisa realizar estudo de consumo e sim avaliar a ingestão alimentar durante o período experimental é importante ressaltar que o perfil dietético dos sujeitos da pesquisa durante o período da intervenção reproduziu o perfil dietético da população brasileira conforme os últimos estudos dietéticos no Brasil, marcado pelo processo de uniformização planetária de hábitos e práticas alimentares, com dietas caracterizadas pelo alto teor de gorduras e carboidratos simples e pelo baixo teor de fibras e micronutrientes (VASCONCELOS, 2007; LEVY-COSTA *et al.*, 2005), o que associado as características antropométricas dos sujeitos da pesquisa pode representar risco para obesidade e doenças associadas.

4.3.3 Perfil Bioquímico

O perfil bioquímico dos indivíduos do sexo masculino nos Tempos 0, 1 e 2 pode ser visualizado na Tabela 22. Observa-se que nos Tempos 1 e 2 o grupo que

recebeu CLA por meio do consumo de cápsulas (SE), apresentou valores inferiores para glicemia (mg/dL), em relação aquele que recebeu óleo de cártamo (SP). Já aquele grupo que recebeu leite enriquecido com ácido linoléico conjugado (EE) apresentou aumento dos teores de ácido úrico (mg/dL) e creatinina (mg/dL) após 6 semanas de suplementação.

4.3.4 Hemograma Completo

Na Tabela 23, pode-se encontrar o hemograma completo dos indivíduos nos Tempos 0, 1 e 2. É possível verificar que o grupo em tratamento com cápsulas de CLA (SE) demonstrou alteração significativa ($p < 0,05$) para os indicadores neutrófilo (%), linfócito (%) e monócito, após 6 semanas de suplementação. No entanto, estes valores não diferiram entre os grupos no Tempo 2.

4.3.5 Avaliação da Composição Corporal

Os resultados referentes a composição corporal dos indivíduos nos Tempos 0, 1 e 2, podem ser observados na Tabela 24. Nota-se que não houve alteração significativa na composição corporal dos humanos em decorrência do consumo de ácido linoléico

conjugado, seja na forma de cápsula ou por meio de leite enriquecido após 6 e 12 semanas.

4.3.6 Perfil Hormonal

O perfil hormonal dos indivíduos do sexo masculino nos Tempos 0, 1 e 2 está apresentado na Tabela 25. Podemos constatar que no Tempo 1 houve redução dos teores de adiponectina (ng/mL) após o consumo de cápsulas contendo ácido linoléico conjugado em relação ao grupo que consumiu óleo de cártamo. No Tempo 2, após 12 semanas de experimentação, houve aumento dos teores de leptina (ng/mL) no grupo que recebeu CLA por meio do consumo de 500 mL de leite enriquecido com este composto em relação ao grupo que recebeu cápsulas com CLA. Ainda no Tempo 2, os resultados referentes a resistina (ng/mL) mostraram-se dependentes da forma de administração, uma vez que o grupo cujo consumo de CLA se deu por meio de leite enriquecido mostrou teores maiores do que aquele que recebeu cápsulas com o mesmo composto. Com relação aos teores de insulina (ng/mL) e HOMA-IR, o grupo tratado com cápsulas de CLA apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo após 12 semanas.

Tabela 22. Valores médios \pm desvio padrão dos teores de glicemia (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL), colesterol total (mg/dL), LDL-colesterol (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), cálcio sérico (mg/dL), fósforo inorgânico (mg/dL), fosfatase alcalina (U/L), uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), TGP (U/L) e TGO (U/L) dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).

Indicador	Tempo/Grupo											
	T0				T1				T2			
	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)
Glicemia (mg/dL)	93,93 \pm 6,13 ^b	89,47 \pm 6,65 ^{a,b}	90,2 \pm 13,58 ^{a,b}	95,11 \pm 6,09 ^{a,b}	98,13 \pm 6,71 ^a	92,32 \pm 7,6 ^b	96,5 \pm 11,84 ^{a,b}	97,75 \pm 6,48 ^{a,b}	101,27 \pm 10,49 ^a	90,12 \pm 7,61 ^b	96,25 \pm 8,35 ^{a,b}	99,29 \pm 6,5 ^a
Triacilglicerol (mg/dL)	132,67 \pm 82,40	123,05 \pm 43,19	123,9 \pm 42,0	117,78 \pm 36,12	123,57 \pm 69,51	105,89 \pm 46,56	122,0 \pm 32,66	145,75 \pm 58,69	116,53 \pm 46,77	104,82 \pm 39,19	134,38 \pm 60,54	129,43 \pm 66,55
Colesterol Total (mg/dL)	179,47 \pm 33,35	186,0 \pm 30,28	191,9 \pm 20,78	198,11 \pm 26,02	183,86 \pm 34,44	189,47 \pm 26,79	199,6 \pm 27,79	193,75 \pm 32,01	187,0 \pm 32,59	185,59 \pm 27,33	191,63 \pm 19,62	190,43 \pm 23,99
LDL-Colesterol (mg/dL)	104,71 \pm 22,96 ^b	107,41 \pm 27,13 ^b	119,4 \pm 24,15 ^{a,b}	130,89 \pm 28,55 ^a	111,14 \pm 23,86 ^a	114,89 \pm 25,17 ^{a,b}	126,5 \pm 33,86 ^{a,b}	122,63 \pm 25,43 ^{a,b}	117,47 \pm 24,29 ^{a,b}	112,75 \pm 24,53 ^{a,b}	120,17 \pm 23,73 ^{a,b}	116,29 \pm 10,01 ^{a,b}
HDL-Colesterol (mg/dL)	48,21 \pm 6,8 ^{a,b}	54,0 \pm 15,99 ^a	47,7 \pm 7,57 ^{a,b}	43,67 \pm 9,18 ^b	48,07 \pm 7,52 ^{a,b}	53,47 \pm 15,62 ^{a,b}	48,8 \pm 7,87 ^a	41,88 \pm 11,83 ^{a,b}	46,33 \pm 8,34 ^{a,b}	53,41 \pm 17,86 ^{a,b}	45,25 \pm 8,14 ^b	48,43 \pm 17,42 ^{a,b}
Cálcio Sérico (mg/dL)	9,33 \pm 0,39	9,37 \pm 0,32	9,34 \pm 0,33	9,38 \pm 0,38	9,28 \pm 0,39	9,30 \pm 0,61	9,35 \pm 0,44	9,41 \pm 0,64	9,39 \pm 0,41	9,21 \pm 0,26	9,46 \pm 0,32	9,44 \pm 0,49
Fósforo Inorgânico	3,34 \pm 0,54	3,43 \pm 0,54	3,45 \pm 0,42	3,44 \pm 0,52	3,30 \pm 0,44	3,43 \pm 0,62	3,48 \pm 0,32	3,68 \pm 0,63	3,33 \pm 0,51	3,36 \pm 0,73	3,27 \pm 0,36	3,71 \pm 0,69

(mg/dL)

Fosfatase	68,6 ±	68,47 ±	71,1 ±	66,11 ±	66,14 ±	69,47 ±	68,0 ±	63,25 ±	66,27 ±	73,0 ±	68,75 ±	63,57 ±
Alcalina (U/L)	15,7	15,7	14,6	16,56	14,85	15,09	16,39	20,45	15,63	13,84	14,96	20,49
Úrea (mg/dL)	29,33 ±	32,44 ±	34,2 ±	33,56 ±	30,56 ±	32,0 ±	34,1 ±	33,38 ±	30,15 ±	30,38 ±	33,75 ±	369,86 ±
	6,53	5,82	8,48	5,34	9,64	7,13	5,11	4,21	9,62	10,45	6,58	6,62
Creatinina	1,00 ±	0,92 ±	0,95 ±	1,02 ±	1,0 ±	0,93 ±	0,98 ±	1,06 ±	0,99 ±	0,91 ±	1,04 ±	0,99 ±
(mg/dL)	0,13 ^{a,b}	0,13 ^{a,b}	0,08 ^{a,b}	0,11 ^{a,b}	0,12 ^{a,b}	0,16 ^b	0,08 ^{a,b}	0,10 ^a	0,13 ^{a,b}	0,15 ^{a,b}	0,17 ^{a,b}	0,09 ^{a,b}
Ácido Úrico	5,57 ±	5,57 ±	5,25 ±	6,46 ±	5,47 ±	5,98 ±	5,43 ±	6,41 ±	5,59 ±	5,79 ±	6,0 ±	5,83 ±
(mg/dL)	0,94 ^{a,b}	1,03 ^b	1,1 ^b	0,72 ^a	0,49 ^{a,b}	1,37 ^{a,b}	0,87 ^b	0,78 ^a	1,32 ^{a,b}	1,19 ^{a,b}	1,45 ^a	0,92 ^{a,b}
TGP (U/L)	35,0 ±	28,53 ±	33,4 ±	36,67 ±	34,29 ±	35,05 ±	42,23 ±	34,88 ±	33,4 ±	25,59 ±	36,13 ±	28,57 ±
	13,24 ^{a,b}	11,67 ^{a,b}	13,62 ^b	16,63 ^{a,b}	9,47 ^{a,b}	26,14 ^{a,b}	17,71 ^a	14,23 ^{a,b}	12,49 ^{a,b}	8,55 ^{a,b}	13,01 ^{a,b}	10,95 ^{a,b}
TGO (U/L)	26,0 ±	22,95 ±	23,7 ±	24,0 ±	25,36 ±	25,63 ±	26,11 ±	28,0 ±	25,93 ±	22,06 ±	26,13 ±	27,71 ±
	5,88 ^{a,b}	5,79 ^{a,b}	3,92 ^{a,b}	6,75 ^{a,b}	3,52 ^{a,b}	16,32 ^{a,b}	6,75 ^{a,b}	10,58 ^{a,b}	5,31 ^a	5,77 ^b	5,84 ^{a,b}	10,31 ^{a,b}

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): consumo diário de 3 cápsulas de óleo de cártamo;

Grupo SE (Suplementado Experimental): consumo diário de 3 cápsulas de de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®);

Grupo EP (Enriquecido Placebo): consumo diário de 500 mL de leite sem adição de ácido linoléico conjugado;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): consumo diário de 500 mL de leite com adição de ácido linoléico conjugado.

Tabela 23. Valores médios \pm desvio padrão dos teores de hemoglobina (g/mL), hematócrito (%), neutrófilo (%), linfócito (%), monócito (%), eosinófilo (%) e basófilo (%) dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).

Indicador	Tempo/Grupo											
	T0				T1				T2			
	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)
Hemoglobina (g/dL)	16,5 \pm 0,8 ^a	15,97 \pm 1,07 ^b	16,0 \pm 0,93 ^a	16,1 \pm 1,56 ^{a,b}	16,29 \pm 0,88 ^a	15,74 \pm 0,99 ^b	15,65 \pm 1,00 ^b	15,88 \pm 1,33 ^{a,b}	15,84 \pm 0,82 ^b	15,72 \pm 0,89 ^{a,b}	15,64 \pm 0,97 ^{a,b}	15,71 \pm 1,69 ^{a,b}
Hematócrito (%)	47,1 \pm 2,0	46,46 \pm 2,73	46,88 \pm 2,05	47,37 \pm 4,57	47,54 \pm 2,49	46,75 \pm 2,61	46,82 \pm 2,38	47,11 \pm 3,64	47,55 \pm 2,44	46,89 \pm 2,88	46,84 \pm 3,05	46,59 \pm 4,63
Neutrófilo (%)	53,86 \pm 7,04 ^{a,b}	55,1 \pm 6,88 ^b	53,88 \pm 7,34 ^{a,b}	55,15 \pm 6,53 ^{a,b}	57,26 \pm 10,01 ^{a,b}	57,53 \pm 8,15 ^a	55,29 \pm 6,29 ^{a,b}	50,56 \pm 18,67 ^{a,b}	54,41 \pm 7,06 ^{a,b}	57,06 \pm 7,86 ^{a,b}	56,3 \pm 8,6 ^{a,b}	60,82 \pm 9,12 ^{a,b}
Linfócito (%)	31,37 \pm 8,46 ^{a,b}	31,92 \pm 5,64 ^a	34,08 \pm 7,41 ^{a,b}	31,77 \pm 4,44 ^{a,b}	29,14 \pm 10,0 ^{a,b}	29,26 \pm 6,94 ^b	31,68 \pm 5,79 ^{a,b}	29,54 \pm 4,53 ^{a,b}	28,62 \pm 10,74 ^{a,b}	29,73 \pm 6,67 ^{a,b}	32,36 \pm 7,82 ^{a,b}	28,8 \pm 5,65 ^{a,b}
Monócito (%)	6,63 \pm 2,05 ^{a,b}	6,23 \pm 1,63 ^b	5,96 \pm 1,33 ^{a,b}	8,21 \pm 5,54 ^{a,b}	6,92 \pm 1,38 ^b	6,95 \pm 1,51 ^a	6,73 \pm 1,21 ^{a,b}	9,10 \pm 5,18 ^{a,b}	7,41 \pm 1,68 ^a	7,1 \pm 2,38 ^{a,b}	5,8 \pm 0,82 ^{a,b}	5,33 \pm 0,89 ^{a,b}
Eosinófilo (%)	4,67 \pm 2,61 ^b	3,61 \pm 1,75 ^{a,b,c}	3,18 \pm 1,29 ^{a,b,c}	4,04 \pm 2,07 ^{a,b,c}	3,77 \pm 2,31 ^c	3,28 \pm 1,64 ^{a,b,c}	3,86 \pm 1,98 ^{a,b,c}	3,59 \pm 1,26 ^{a,b,c}	4,69 \pm 2,47 ^a	2,99 \pm 1,34 ^{a,b,c}	2,96 \pm 1,94 ^{a,b,c}	3,4 \pm 2,19 ^{a,b,c}
Basófilo (%)	0,96 \pm 0,46 ^{a,b}	0,96 \pm 0,55 ^{a,b}	0,82 \pm 0,36 ^{a,b}	0,72 \pm 0,23 ^b	0,91 \pm 0,54 ^{a,b}	0,82 \pm 0,51 ^{a,b}	0,59 \pm 0,20 ^{a,b}	1,28 \pm 1,01 ^a	1,16 \pm 0,73 ^{a,b}	0,94 \pm \pm 0,42 ^{a,b}	0,55 \pm 0,25 ^{a,b}	0,81 \pm 0,31 ^{a,b}

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): consumo diário de 3 cápsulas de óleo de cártamo;

Grupo SE (Suplementado Experimental): consumo diário de 3 cápsulas de de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®);

Grupo EP (Enriquecido Placebo): consumo diário de 500 mL de leite sem adição de ácido linoléico conjugado;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): consumo diário de 500 mL de leite com adição de ácido linoléico conjugado;

Tabela 24. Valores médios \pm desvio padrão dos indicadores peso (Kg), altura (cm), IMC (Kg/m²), CB (cm), CQ (cm), CA (cm), PCT (mm), PCB (mm), PSE (mm), PSI (mm), somatória de dobras cutâneas (mm), massa gorda (Kg) e massa magra (Kg) dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).

Indicador	Tempo/Grupo											
	T0				T1				T2			
	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)
Peso (Kg)	87,39 \pm 8,67	87,6 \pm 12,8	83,97 \pm 6,76	88,18 \pm 8,35	87,74 \pm \pm 8,73	87,34 \pm 12,93	83,95 \pm 7,04	88,08 \pm 8,77	87,99 \pm 8,83	87,43 \pm 13,07	83,52 \pm 6,55	88,1 \pm 8,77
Altura (cm)	172,79 \pm 5,92	176,72 \pm 7,7	172,29 \pm 8,07	172,51 \pm 3,5	172,79 \pm 5,92	176,72 \pm 7,7	172,29 \pm 8,07	172,51 \pm 3,5	172,79 \pm 5,92	176,72 \pm 7,7	172,29 \pm 8,07	172,51 \pm 3,5
IMC (Kg/m ²)	29,29 \pm 2,66	27,91 \pm 2,42	28,45 \pm 3,49	29,68 \pm 3,23	29,4 \pm 2,66	27,84 \pm 2,58	28,45 \pm 3,66	29,64 \pm 3,32	29,48 \pm 2,65	27,86 \pm 2,61	28,30 \pm 3,5	29,65 \pm 3,33
CB (cm)	35,2 \pm 2,98 ^a	33,73 \pm 2,66 ^{a,b}	35,14 \pm 1,32 ^{a,b}	34,56 \pm 2,16 ^{a,b}	34,53 \pm 2,57 ^b	33,85 \pm 2,62 ^{a,b}	35,56 \pm 1,63 ^{a,b}	34,89 \pm 2,75 ^{a,b}	34,91 \pm 2,77 ^{a,b}	33,62 \pm 2,52 ^{a,b}	35,21 \pm 1,6 ^{a,b}	34,7 \pm 2,62 ^{a,b}
CQ (cm)	106,2 \pm 5,54	105,25 \pm 6,19	103,69 \pm 4,65	104,95 \pm 5,39	106,1 \pm 4,87	105,57 \pm 6,81	105,47 \pm 4,91	103,69 \pm 5,39	105,29 \pm 5,06	105,49 \pm 7,51	103,52 \pm 4,51	104,47 \pm 5,49
CA (cm)	101,64 \pm 10,02	100,56 \pm 10,03	97,75 \pm 7,25	102,42 \pm 9,43	101,89 \pm 8,94	100,13 \pm 9,34	98,82 \pm 9,19	102,74 \pm 9,78	101,16 \pm 8,51	100,77 \pm 9,89	99,59 \pm 8,10	102,98 \pm 9,62
PCT (mm)	19,32 \pm 6,3	21,05 \pm 4,78	22,23 \pm 4,81	22,89 \pm 6,15	19,72 \pm 5,31	21,3 \pm 5,28	21,43 \pm 4,28	23,28 \pm 4,02	21,12 \pm 5,72	24,04 \pm 6,9	25,2 \pm 3,96	26,92 \pm 5,95

PCB (mm)	15,58 ± 5,66 ^{a,b}	15,29 ± 5,55 ^{a,b}	14,13 ± 6,03 ^a	14,89 ± 4,18 ^{a,b}	11,42 ± 4,87 ^{a,b}	11,72 ± 4,25 ^{a,b}	10,83 ± 3,96 ^b	14,0 ± 4,03 ^{a,b}	12,03 ± 5,22 ^{a,b}	119,5 ± 5,04 ^{a,b}	11,33 ± 4,9 ^{a,b}	15,14 ± 5,6 ^{a,b}
PSE (mm)	27,95 ± 6,53	25,87 ± 5,26	28,2 ± 9,13	32,92 ± 9,79	28,2 ± 8,00	24,93 ± 4,79	25,93 ± 6,07	31,69 ± 10,78	28,27 ± 7,81	27,42 ± 8,5	31,7 ± 10,36	37,06 ± 13,27
PSI (mm)	23,5 ± 5,34 ^{a,b}	23,76 ± 7,07 ^{a,b}	27,0 ± 7,04 ^{a,b}	26,31 ± 9,47 ^a	20,83 ± 4,93 ^{a,b}	23,43 ± 8,47 ^{a,b}	25,98 ± 5,72 ^{a,b}	23,75 ± 8,61 ^b	21,93 ± 6,54 ^{a,b}	23,21 ± 8,57 ^{a,b}	26,33 ± 4,54 ^{a,b}	26,61 ± 9,19 ^{a,b}
Σ Dobras cutâneas (mm)	86,35 ± 18,9	85,97 ± 18,22	91,55 ± 22,68	97,0 ± 25,44	80,17 ± 16,94	81,39 ± 18,26	84,15 ± 15,26	92,72 ± 22,43	83,35 ± 21,68	86,62 ± 25,94	94,55 ± 19,86	105,72 ± 30,35
Massa Gorda (Kg)	23,21 ± 4,92	22,78 ± 6,89	21,28 ± 4,69	24,03 ± 6,22	23,15 ± 4,6	22,75 ± 6,79	23,01 ± 8,62	23,53 ± 6,42	23,62 ± 4,84	23,27 ± 6,44	20,54 ± 4,74	23,87 ± 7,00
Massa Magra (Kg)	64,12 ± 5,70	64,76 ± 7,69	62,67 ± 3,28	64,13 ± 3,23	64,55 ± 5,88	64,57 ± 7,78	60,91 ± 5,93	64,52 ± 2,88	64,36 ± 5,57	64,1 ± 7,95	62,95 ± 3,98	64,34 ± 2,62

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): consumo diário de 3 cápsulas de óleo de cártamo;

Grupo SE (Suplementado Experimental): consumo diário de 3 cápsulas de de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®);

Grupo EP (Enriquecido Placebo): consumo diário de 500 mL de leite sem adição de ácido linoléico conjugado;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): consumo diário de 500 mL de leite com adição de ácido linoléico conjugado.

Tabela 25. Valores médios \pm desvio padrão da concentração de adiponectina, grelina, leptina e resistina séricos (ng/mL), insulina plasmática (ng/mL) e HOMA-IR dos indivíduos nos Tempos 0, 1 (6 semanas) e 2 (12 semanas).

Indicador	Tempo/Grupo											
	Tempo 0				Tempo 1				Tempo 2			
	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)	SP (n=15)	SE (n=19)	EP (n=10)	EE (n=9)
Adiponectina (ng/mL)	6225,04 \pm 3864,62 ^{a,b}	4647,95 \pm 1536,82 ^{a,b}	5300,60 \pm 3340,82 ^{a,b}	4679,48 \pm 2358,15 ^{a,b}	6387,67 \pm 3219,84 ^b	6209,19 \pm 1824,82 ^a	6315,83 \pm 3840,33 ^{a,b}	5171,06 \pm 1586,98 ^b	7235,57 \pm 2787,62 ^a	6492,45 \pm 2811,43 ^{a,b}	7498,18 \pm 4298,79 ^{a,b}	5350,57 \pm 1259,05 ^{a,b}
Grelina (ng/mL)	251,32 \pm 88,24 ^b	292,63 \pm 51,24 ^c	264,44 \pm 40,66 ^{a,b,c}	303,82 \pm 104,35 ^b	273,84 \pm 119,26 ^{a,b,c}	306,98 \pm 72,86 ^{a,b,c}	295,06 \pm 114,5 ^{a,b,c}	386,62 \pm 74,16 ^a	331,15 \pm 120,69 ^{a,b,c}	306,54 \pm 94,05 ^{a,b,c}	266,89 \pm 58,4 ^{a,b,c}	328,53 \pm 101,04 ^{a,b,c}
Leptina (ng/mL)	10,07 \pm 7,72 ^a	11,16 \pm 12,06 ^a	6,11 \pm 8,17 ^a	4,54 \pm 7,13 ^b	1,24 \pm 0,22 ^b	1,25 \pm 0,22 ^b	1,11 \pm 0,09 ^b	1,12 \pm 0,15 ^c	1,20 \pm 0,15 ^{a,b,c}	1,25 \pm 0,16 ^b	1,31 \pm 0,11 ^{a,b,c}	1,46 \pm 0,28 ^a
Resistina (ng/mL)	1,06 \pm 0,67 ^{a,b}	1,01 \pm 0,45 ^{a,b}	0,91 \pm 0,32 ^{a,b}	0,74 \pm 0,28 ^b	1,12 \pm 0,44 ^a	0,92 \pm 0,29 ^a	0,77 \pm 0,33 ^{a,b}	1,02 \pm 0,44 ^a	0,67 \pm 0,23 ^b	0,70 \pm 0,22 ^b	0,72 \pm 0,17 ^{a,b}	0,97 \pm 0,30 ^a
Insulina (ng/mL)	6,61 \pm 1,95 ^{a,b}	6,78 \pm 3,08 ^b	7,49 \pm 3,44 ^b	12,52 \pm 7,79 ^a	7,59 \pm 2,36 ^b	7,25 \pm 2,28 ^{a,b}	7,27 \pm 1,99 ^b	10,76 \pm 5,28 ^{a,b}	9,07 \pm 2,48 ^a	6,98 \pm 2,09 ^b	8,72 \pm 1,98 ^a	12,76 \pm 5,36 ^a
HOMA-IR	0,04 \pm 0,01 ^{a,b}	0,04 \pm 0,02 ^b	0,04 \pm 0,02 ^b	0,07 \pm 0,05 ^a	0,04 \pm 0,01 ^b	0,04 \pm 0,01 ^{a,b}	0,04 \pm 0,01 ^{a,b}	0,06 \pm 0,03 ^{a,b}	0,05 \pm 0,02 ^a	0,04 \pm 0,01 ^b	0,05 \pm 0,01 ^{a,b}	0,08 \pm 0,04 ^a

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao teste de Mann-Whitney.

Grupo SP (Suplementado Placebo): consumo diário de 3 cápsulas de óleo de cártamo;

Grupo SE (Suplementado Experimental): consumo diário de 3 cápsulas de de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®);

Grupo EP (Enriquecido Placebo): consumo diário de 500 mL de leite sem adição de ácido linoléico conjugado;

Grupo EE (Enriquecido Experimental): consumo diário de 500 mL de leite com adição de ácido linoléico conjugado.

Os resultados obtidos na presente Pesquisa, tanto no ensaio clínico com humanos quanto no ensaio biológico com ratos, indicam que o CLA independente da forma de administração, exerce um efeito significativo sobre os mecanismos metabólicos de glicose e insulina (humanos e ratos) e sobre o perfil de peptídeos hormonais relacionados com o tecido adiposo (ratos). Tais achados podem ser resultantes ou não da ação do CLA sobre a expressão gênica das isoformas α e γ de PPARs, ação esta identificada nessa Pesquisa. A comunidade científica tem demonstrado em animais e humanos que o CLA influencia o metabolismo energético promovendo alterações significativas no metabolismo dos lípidos e glicose e também na composição corporal. A administração de CLA, sob as mais diversas maneiras e concentrações, parece ser responsável pela melhora do perfil lipídico sanguíneo, melhora da resistência à insulina e redução da gordura corporal, por mecanismos distintos e de forma diferente em animais e humanos.

Sabe-se que o CLA exerce importante papel no metabolismo lipídico, especialmente no que diz respeito aos sistemas celulares de oxidação que, aliás, é o que explica muitas das propriedades fisiológicas desse ácido graxo. Foi o trabalho de Belury *et al.* (1997) um dos primeiros a demonstrar de forma mais clara o papel do CLA no metabolismo lipídico. Ainda era obscuro o entendimento das rotas metabólicas do CLA nos organismos e como este influenciaria o metabolismo dos lípidos dos vários tecidos de forma a melhorar o perfil lipídico. A ação do CLA sobre o metabolismo lipídico caracterizada pela inibição do armazenamento de ácidos graxos, os quais serão oxidados para fornecer energia, associada à inibição também da entrada de glicose nos adipócitos pode levar à alteração no metabolismo da insulina e causar situações de hiperinsulinemia. A inibição do armazenamento de ácidos graxos e glicose, especialmente pelo isômero

trans-10, *cis-12*, leva ao acúmulo desses substratos na corrente sanguínea caracterizando um estado de lipodistrofia (particularmente pelo acúmulo de ácidos graxos não esterificados), que por sua vez está relacionado com a resistência à insulina local e geral propiciando assim o desenvolvimento de diabetes lipoatrófica. Tal situação já foi observada em camundongos (CLEMENT *et al.*, 2002; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000) e humanos (RISÉRUS *et al.*, 2004; RISÉRUS *et al.*, 2002a; SMEDMAN; VESSBY, 2001). Na verdade o início das pesquisas da influência do CLA sobre o metabolismo da glicose e insulina foi caracterizado pela busca da melhora da resistência à insulina como demonstraram Houseknecht *et al.* (1998) em ratos Zucker suplementadas com 2 % de mistura de isômeros de CLA por 2 semanas. Mas, esses resultados não foram consensuais nos estudos subsequentes objetivando identificar o efeito do CLA sobre a resistência à insulina, embora, alguns pesquisadores tenham encontrado alguns resultados positivos, ou seja, a diminuição da tolerância à glicose em ratos da linhagem Zucker (NAGAO *et al.*, 2003; TEACHEY *et al.*, 2003) ou, então, resultados que demonstram nenhuma influência, como os de Simón *et al.* (2006) e Hargrave *et al.* (2003) com hamsters e camundongos, respectivamente. Os estudos de Ross *et al.* (2005) e Choi *et al.* (2004a) deram contribuições importantes para o entendimento desses resultados dúbios. Os autores demonstraram em ratos Sprague-Dawley e camundongos *knockout* para Apo E, respectivamente, que o efeito do CLA sobre a resistência à insulina é isômero dependente, sendo o *trans-10*, *cis-12* CLA responsável pelo aumento da resistência à insulina e o *cis-9*, *trans-11* CLA responsável pela redução da resistência à insulina. Em humanos não é muito claro o efeito do consumo de CLA sobre o metabolismo de glicose e insulina. Com exceção do trabalho de Belury; Mahon; Banni (2003), que observaram redução da glicose plasmática em indivíduos portadores de diabetes tipo 2, a grande maioria dos estudos revisados demonstraram aumento de glicose plasmática, tendência

para aumento da insulina plasmática e redução da sensibilidade à insulina (MOLONEY *et al.*, 2004; RISÉRUS *et al.*, 2004; RISÉRUS *et al.*, 2002a; RISÉRUS *et al.*, 2002b; SMEDMAN; VESSBY, 2001). Os efeitos do CLA sobre o metabolismo de lipídios e glicose são responsáveis pelo efeito redutor de gordura corporal atribuído particularmente ao isômero *trans-10, cis-12* do CLA. A capacidade do CLA de alterar de forma positiva a composição corporal, por meio da redução da massa gorda e aumento de massa magra já foi comprovada em muitos modelos experimentais, inclusive em humanos, desde o final da década de 90. O primeiro trabalho a demonstrar tal propriedade do CLA foi o de Park *et al.* (1997), que demonstraram em camundongos suplementados com 0,5 % de CLA durante 28 e 32 dias redução de cerca de 60 % da gordura corporal, resultantes da redução da deposição de gordura, aumento da lipólise nos adipócitos e aumento da oxidação de ácidos graxos tanto no músculo quanto no tecido adiposo. Pouco tempo depois o mesmo grupo demonstrou que o isômero de CLA responsável pela redução da gordura corporal é o *trans-10, cis-12* (PARK *et al.*, 1999). Quanto aos estudos com humanos, Zambell *et al.* (2000) tentaram demonstrar o efeito de redução da gordura corporal em mulheres saudáveis com índice de massa corporal normal, mas, seus resultados não foram significativos, ou seja, o consumo de 3 g/dia de CLA durante 64 dias não alterou a composição corporal dos indivíduos. No mesmo ano Blankson *et al.* (2000) e Berven *et al.* (2000) também demonstraram os efeitos do CLA sobre a composição corporal em indivíduos com sobrepeso ou obesidade sendo que, somente no estudo de Blankson *et al.* (2000) houve redução da gordura corporal após 12 semanas de suplementação com quantidades acima de 3,4 g de CLA/dia, no entanto, nenhum mecanismo que explicasse o efeito redutor da gordura corporal foi discutido pelos autores. As hipóteses metabólicas para explicar a ação redutora de gordura corporal do CLA são muitas, mas as investigações tiveram seu início baseado no controle pelo CLA da

expressão de genes que estivessem envolvidos na diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, ou seja, a inibição da expressão desses genes resultaria na redução da lipogênese. Tal hipótese foi reforçada por Kang *et al.* (2003), Takahashi *et al.* (2002), Choi *et al.* (2000) e Brodie *et al.* (1999), cujos trabalhos com culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 e adipócitos humanos demonstram que o CLA inibe a ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes codificantes das proteínas C/EBP α , SCD e GLUT4, todas envolvidas no processo de diferenciação de células adiposas. Na verdade os estudos apontam que a redução da gordura corporal induzida pelo CLA ocorre não somente pela diminuição do número de adipócitos mas também, ou até mesmo somente, pela redução do seu tamanho. Considerando que o tamanho da célula adiposa está diretamente relacionado com o conteúdo de triacilgliceróis em seu interior, a redução deste lípide induzida pelo CLA resultaria conseqüentemente, na diminuição do tamanho da célula (BROWN; EVANS; MCINTOSH, 2001; SISK *et al.*, 2001; AZAIN *et al.*, 2000). É importante discutir que o mecanismo de ação responsável pela redução de triacilgliceróis induzida pelo CLA ainda necessita de maiores esclarecimentos. A diminuição, particularmente pelo isômero *trans-10, cis-12* CLA, da síntese de enzimas envolvidas na lipogênese como a lipase lipoprotéica, acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase, as quais são responsáveis pela clivagem dos ácidos graxos das lipoproteínas circulantes para ressíntese de triacilglicerol (LPL) e pela síntese *de novo* dos lípidos biológicos (ACC e FAS) tem sido reportada por muitos pesquisadores (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 1997). Por outro lado, como já discutido anteriormente, o aumento da β -oxidação de ácidos graxos induzida pelo CLA na mitocôndria e no peroxissomo, também poderia ser responsável pela redução da síntese de triacilgliceróis e, dessa forma, contribuir para a não deposição dos mesmos no adipócito, reduzindo assim o seu

tamanho (EVANS; BROWN; MCINTOSH, 2002; RAHMAN *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2000). A descoberta do gene *ob*, que codifica a leptina, trouxe contribuições ímpares para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no controle hipotalâmico da ingestão alimentar. A leptina é sintetizada no tecido adiposo e secretada no plasma em proporção direta ao tamanho do adipócito, ou seja, quanto maior é o adipócito maior também é a concentração de leptina plasmática. Neste sentido, é esperado que o efeito redutor de gordura corporal do CLA tenha relação com os níveis de leptina. De fato, pesquisadores objetivando estudar essa relação demonstram que o consumo de CLA reduz os níveis sanguíneos de leptina em ratos OLETF (RAHMAN *et al.*, 2001) e ratos Sprague-Dawley (YAMASAKI *et al.*, 2003). Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado nos últimos anos que ratos Wistar saudáveis suplementados durante 3 ou 6 semanas com 2 % de misturas comerciais de CLA, contendo os isômeros *trans-10*, *cis-12* e *cis-9*, *trans-11* em iguais proporções, apresentam redução da gordura corporal total de cerca de 20 % em relação ao grupo controle. A concentração sérica de leptina dos ratos suplementados com CLA é menor quando comparada com o controle e, está correlacionada positivamente com a gordura corporal desses animais (BOTELHO; SANTOS-ZAGO; OLIVEIRA, 2008).

Outras proteínas produzidas não somente pelo tecido adiposo, mas também por outros tecidos são estudadas como fatores essenciais no controle da adipogênese como por exemplo a adiponectina, proteína sintetizada predominantemente por adipócitos cujos níveis plasmáticos estão inversamente relacionados com a resistência à insulina, inflamação e dislipidemias (SANTOS, 2008; MAEDA *et al.*, 2001; WEIGLE *et al.*, 1995). O peptídeo hormonal resistina tem sido estudado quanto a sua ação reguladora da homeostase de insulina, função hematopoiética e processos inflamatórios, além de apresentar importante associação com a massa de tecido adiposo subcutâneo,

demonstrando ser um potente marcador de inflamação sistêmica na obesidade (WON *et al.*, 2009; DOSTALOVA *et al.*, 2006). Desde o seu descobrimento, o peptídeo gástrico grelina tem sido estudado quanto sua ação reguladora sobre a secreção de insulina e metabolismo de glicose, além das funções biológicas relacionadas com o controle do apetite e fome (VOTRUBA *et al.*, 2009). Quanto à insulina, pode-se dizer que a circulação plasmática dessa é proporcional ao conteúdo de tecido adiposo; é um hormônio que atravessa a barreira hematoencefálica e sinaliza o hipotálamo a condição de estoque de tecido adiposo desencadeando o processo modulatório da ingestão alimentar (CARVALHEIRA, 2002).

A suplementação com mistura comercial de isômeros de CLA nas condições do presente protocolo experimental, ainda que não tenha promovido a redução da massa e do teor de gordura corporal, exerceu influência significativa sobre:

- i. Metabolismo de glicose e insulina, observado nos humanos: embora estudos tenham demonstrado que o CLA promove a resistência à insulina em humanos (INGELSSON; RISÉRUS, 2008; THRUSH *et al.*, 2007; MOLONEY *et al.*, 2004; RISÉRUS *et al.*, 2002a) e adipócitos de humanos (KENNEDY *et al.*, 2010; CHUNG *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2003), no presente estudo os resultados demonstram que o CLA não exerceu esse efeito, além de ter ocasionado a redução ($p \leq 0,05$) das concentrações de glicose, insulina e de HOMA-IR nos voluntários que receberam as cápsulas de CLA em comparação com os que receberam placebo.
- ii. Metabolismo de glicose e insulina, observado nos ratos: no experimento com ratos, os resultados demonstram certa concordância com os achados da comunidade científica, ou seja, achados que sustentem a hipótese de que o CLA propicie uma situação de

resistência à insulina; a concentração de insulina e os valores de HOMA-IR nos animais que receberam CLA na forma de dieta enriquecida foram maiores ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo placebo. O CLA pode levar a resistência à insulina por meio da ativação de processos inflamatórios (AHN *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2006; UEKI; KONDO; KAHN, 2004) e regulação negativa da expressão de genes envolvidos na sinalização da insulina e internalização da glicose (CHUNG *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2003). Outra via que pode explicar a ação de resistência à insulina do CLA é a redução de adiponectina, também ocasionada pelo CLA, como observada em camundongos (POIRIER *et al.*, 2006). Embora o presente estudo não tenha subsídios para chegar a uma conclusão sobre o possível mecanismo de ação que explique o quadro de resistência à insulina observado nos ratos, acredita-se que tal mecanismo esteja relacionado com a ação do CLA sobre a regulação de processos de inflamação e/ou expressão de genes envolvidos na sinalização de insulina e internalização da glicose. Descarta-se, nesse momento, a hipótese da via adiponectina, pois a concentração desse hormônio foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) nos ratos que receberam CLA, como será discutido a seguir.

iii. Concentrações dos peptídeos hormonais relacionados com a adipogênese, observadas nos ratos: os ratos que receberam cápsulas de CLA apresentaram concentrações de grelina e adiponectina significativamente maiores ($p \leq 0,05$) e concentrações de leptina significativamente menores ($p \leq 0,05$) em comparação com o grupo placebo. O perfil adipogênico pode estar diretamente relacionado com a expressão gênica de proteínas produzidas pelo tecido adiposo e outros tecidos e que estão muitas vezes sobre o controle transcricional das isoformas α e γ dos receptores ativados por proliferadores de

peroxissoma: PPAR α e PPAR γ , especialmente o gene da adiponectina que é alvo de PPAR γ . No presente ensaio com ratos observou-se aumento significativo ($p \leq 0,05$) da expressão gênica de PPAR γ tanto no tecido adiposo quanto no tecido hepático o que pode estar relacionado com os valores aumentados de adiponectina nos animais já que o mesmo é alvo de PPAR γ , ainda que a literatura científica relate que o CLA tenha efeito de redução de PPAR γ e adiponectina em roedores. O fato de não ter havido redução significativa ($p > 0,05$) de gordura corporal pode ser atribuído aos resultados supracitados já que proteínas envolvidas no processo de diferenciação de adipócitos estão sob o controle transcricional de PPAR γ , como se discute a seguir.

iv. Expressão gênica de PPAR α , PPAR γ , CPT e FAS, observado nos ratos: a identificação dos PPARs foi determinante para o entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos do CLA, os quais parecem estar todos relacionados com a ativação ou inibição direta ou indiretamente das diferentes isoformas de PPAR e, conseqüentemente, com a modulação da expressão dos genes controlados pelas mesmas. Os efeitos do CLA sobre o metabolismo de lípidos e glicose e sobre a composição corporal tem sido muito explicados pela modulação da expressão gênica exercida por esse ácido graxo conjugado mediada pela ativação ou inibição de PPARs, em especial o PPAR γ . A ativação de PPAR γ_2 pelo CLA, particularmente pelo isômero *trans-10, cis-12* tem sido demonstrada em cultura de adipócitos 3T3-L1 de roedores, como mecanismo responsável pela redução da composição corporal (EVANS *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2000). É importante ressaltar que segundo Evans *et al.* (2001) a ativação de PPAR γ_2 pelo *trans-10, cis-12* CLA modularia o efeito redutor da gordura corporal em curto prazo (48h), visto que os autores observaram inibição de PPAR γ_2

quando o tempo de contato com o CLA aumentou (6 dias). Na verdade, a maioria dos estudos objetivando buscar os alvos moleculares da ação redutora da gordura corporal pelo CLA em adipócitos, reúne dados que permitem concluir que a inibição de PPAR γ , particularmente pelo *trans-10, cis-12* CLA, levaria a redução da gordura corporal por meio da modulação da expressão gênica no sentido de inibir a diferenciação celular e alterar a atividade de proteínas envolvidas na lipogênese e lipólise (KANG *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2001). É importante a ressalva de que nos estudos citados anteriormente o tempo de exposição dos adipócitos aos isômeros de CLA até os efeitos serem observados foi superior a 5 dias, confirmando que em longo prazo, segundo Evans; Brown; McIntosh (2002), o efeito do *trans-10, cis-12* CLA é de fato inibir PPAR γ . Um dado interessante é relatado no trabalho de Brown *et al.* (2003), o qual descreve que quando as células adiposas 3T3-L1 foram expostas ao isômero *cis-9, trans-11*, houve aumento de PPAR γ e, conseqüentemente das proteínas codificadas pelos genes que estão sob seu controle transcricional, promovendo a adipogênese. Tal achado traz contribuições ímpares a respeito da suplementação com misturas de isômeros de CLA. Ao considerar que o isômero *cis-9, trans-11* aumenta PPAR γ , esse pode atuar como antagonista da ação do isômero *trans-10, cis-12*. Frente aos diferentes resultados encontrados na literatura sobre a ativação e/ou inibição dos PPARs pelo CLA, pode-se especular que as ações antagonistas dos dois isômeros predominantes de CLA podem explicar os resultados cuja redução da gordura corporal não foi observada. Quando se discute a influência do CLA sobre as distintas isoformas de PPAR é importante entender se efeitos induzidos pelo CLA sobre a expressão dos genes que estão sob o controle transcricional de qualquer PPAR são decorrentes do aumento ou redução da expressão de um determinado PPAR ou pela ação agonista ou antagonista que o CLA

exerce sobre a atividade de ligação do PPAR ao DNA. Entretanto, o que se observa é que os trabalhos ora *in vitro* ora *in vivo* trazem protocolos experimentais diferentes uns dos outros, os quais resultam em respostas diversas, tornando o entendimento do processo um tanto quanto complicado. Nesse contexto, vale comentar o trabalho de Benjamin *et al.* (2005) que avaliaram *ex vivo* a capacidade de ligação do *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12* CLA às diferentes isoformas de PPAR e, posteriormente desenvolveram um sistema para avaliar o potencial de ativação, pelos isômeros de CLA, de genes controlados por PPAR em roedores. Os resultados de Benjamin *et al.* (2005) contribuíram bastante para a compreensão da capacidade que o CLA tem em se ligar aos diferentes tipos de PPAR, no entanto, contradiz resultados de muitos estudos *in vivo*, além de trazer novas informações para incrementar o quadro sobre o potencial de ativação, pelo CLA, dos PPARs em humanos. No presente estudo, especula-se que o aumento da expressão gênica das isoformas α e γ de PPARs não necessariamente exerceu efeito de ativação e/ou inibição da expressão de genes que estão sob o controle transcricional desses receptores nucleares e que estão envolvidos no processo de lipólise e lipogênese, como é o caso das enzimas CPT e FAS, respectivamente, cujas expressões estão reduzidas tanto no tecido adiposo quanto no tecido hepático. Os achados na literatura são dúbios no que diz respeito à influência do CLA sobre o processo de lipólise de forma que muitos autores relatam aumento de lipólise em células 3T3-L1 e camundongos (LAROSA *et al.*, 2006; MOON *et al.*, 2006; EVANS *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 1997) e muitos em camundongos e hamsters relatam que o CLA não exerce influência sobre a lipólise (LASA *et al.*, 2008; SIMÓN *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2003). O CLA é muito estudado pela sua ação antilipogênica mediada pela inibição de PPAR γ . Dessa forma, muitas proteínas envolvidas na lipogênese estão reduzidas após

suplementação com CLA (LAROSA *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2002), como acontece com a FAS, e como, de fato, ocorreu no presente ensaio com ratos. No entanto, tal redução da expressão de FAS observada parece não ter acontecido via PPAR γ , visto que a expressão desse receptor nuclear aumentou após o consumo de CLA, demonstrando outra possibilidade de controle de FAS independente de PPAR. O fato da redução de expressão de FAS ter sido observada permitiria a conclusão de que houve efeito inibitório sobre a lipogênese, no entanto, não foi possível observar tal efeito nos animais a partir dos indicadores que fazem parte do protocolo experimental do presente estudo. É indubitável que o CLA exerce influência sobre os processos de lipólise e lipogênese; é imaturo dizer que um mecanismo de ação pelo qual isso acontece já foi identificado; são muitas hipóteses sem conclusões precisas. O empenho da comunidade científica em estabelecer um consenso sobre o assunto é constante e exaustivo e os presentes resultados constituem mais uma contribuição científica significativa para traçar o caminho para esse consenso.

Para compreender o papel dos elementos envolvidos no controle de peso e prevenção/control de doenças crônicas associadas, a comunidade científica utiliza-se na grande maioria das vezes de modelos experimentais. Em roedores a identificação desses efeitos parece ser mais consistente. Há algum tempo as pesquisas com esse intuito em seres humanos vêm ganhando força no sentido de fornecer resultados mais precisos. Vale ressaltar que por mais que o modelo experimental e as condições do ensaio sejam muito semelhantes entre os diversos protocolos de pesquisa da área em questão, os resultados ainda são muito divergentes, o que impossibilita um consenso a respeito da

ação do CLA sobre o metabolismo do modelo experimental estudado. Ainda que os estudos sejam feitos com seres humanos, os resultados são muito conflitantes entre os diversos grupos de pesquisa. Até o presente momento, observa-se certa dificuldade por parte da comunidade científica em comprovar o efeito redutor da gordura corporal exercido pelo CLA em humanos haja vista a grande divergência dos resultados obtidos nos ensaios clínicos. Tais divergências provavelmente existem devido às diferenças entre os indivíduos incluídos nas pesquisas que certamente respondem de forma diferente à suplementação com CLA. A população dos estudos é muito heterogênea e inclui indivíduos de ambos os sexos, normais ou não quanto ao seu índice de massa corporal e, saudáveis ou portadores de alterações do metabolismo de lipídios e/ou glicose. Além disso, há que se considerar também, mesmo em uma população homogênea, a individualidade bioquímica resultante das diferenças genéticas existentes entre os indivíduos.

Neste sentido, o desenho experimental com humanos utilizado nesta Pesquisa, buscou uma população de indivíduos do sexo masculino, por sofrer menor interferência hormonal em relação ao sexo feminino, com idade entre 25 e 55 anos, ou seja, adultos, com IMC entre 25 e 35 kg/m², caracterizados com sobrepeso e obesidade grau I, isenta de alterações metabólicas lipídicas e glicídicas e sedentários. Enfim, todos estes critérios foram adotados a fim de minimizar as variações inter-individuais.

4.4 Avaliação da Aceitação e Intenção de Compra das Amostras de Leites Semi-desnatados com e sem Adição de CLA

Os resultados referentes ao teste de aceitação das amostras de leite semi-desnatados com e sem adição de CLA podem ser visualizados na Tabela 26. Não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras para os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global. A análise do histograma para atitude de compra sugere maior intenção de compra para a amostra com adição de CLA, uma vez que 80 % das respostas encontram-se na região compreendida entre as opções “provavelmente compraria” e “certamente compraria” (Figura 14).

Tabela 26. Valores médios \pm desvio-padrão ($n = 55$) de aceitação dos leites semi-desnatados com e sem a adição de CLA.

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
Leite com a adição de CLA	6,64 \pm 1,63	5,72 \pm 1,99	6,37 \pm 1,64	6,26 \pm 1,73
Leite sem a adição de CLA	6,60 \pm 1,84	6,18 \pm 1,89	6,55 \pm 1,78	6,66 \pm 1,75

Médias expressas em escala de 9 cm.

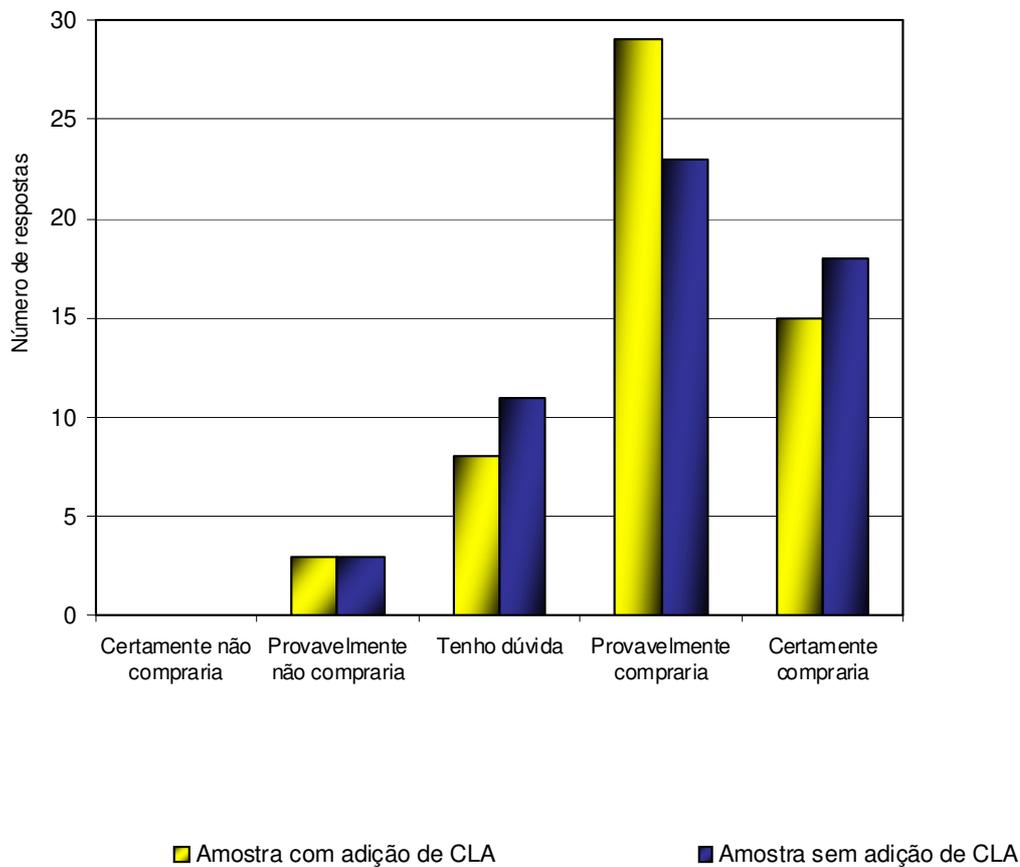


Figura 14. Histograma de intenção de compra dos leites semi-desnatados com e sem a adição de CLA.

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). Os estudos que buscam o aumento do conteúdo de CLA em leite e derivados, o fazem partindo da premissa de que estes alimentos poderiam ter, não somente a alegação de

propriedades funcionais e/ou de saúde, mas também teriam suas características sensoriais influenciadas de forma positiva, especialmente em queijos e manteiga, que parecem ter uma textura mais macia e cremosa, respectivamente, quando estes são elaborados a partir de leite que teve seu perfil de ácidos graxos modificado. Estas modificações são decorrentes da diminuição do conteúdo de ácido graxos saturados e concomitante aumento de ácidos graxos insaturados na gordura do leite, resultando em uma proporção satisfatória de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (JONES *et al.*, 2005; RYHÄNEN *et al.*, 2005).

Com o objetivo de avaliar a produção de queijo Edam e manteiga a partir de leite com alto conteúdo de CLA, Ryhänen *et al.* (2005), suplementaram a dieta de vacas Finnish Ayrshire com óleo de canola na concentração de 50 g/kg de concentrado, oferecido quatro vezes ao dia, totalizando 10 kg. Após 6 semanas de suplementação, houve um aumento de 2,4 vezes da concentração de *cis-9, trans-11* CLA na gordura do leite e modificações no perfil de ácidos graxos caracterizadas por aumento da concentração de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e ácidos graxos *trans*. De acordo com os resultados obtidos, as características sensoriais do queijo Edam e da manteiga foram similares às aquelas observadas nos produtos controle. A textura do queijo Edam, embora tenha necessitado de um tempo maior de maturação, foi mais macia e a manteiga teve boa aceitação devido a sua maior cremosidade. As hipóteses pelas quais os autores explicam estes resultados são, não somente o aumento da concentração de ácidos graxos insaturados, mas também a estereoespecificidade dos ácidos graxos nos triacilgliceróis, particularmente na manteiga. Resultados similares foram encontrados por Jones *et al.* (2005), quando vacas British Friesian foram suplementadas durante sete dias com uma mistura de óleo de peixe e óleo de girassol. Ao final da experimentação, a

concentração de *cis-9, trans-11* CLA aumentou em 9 vezes em comparação ao controle. Os autores avaliaram as características de textura de queijo Caerphilly elaborado a partir do leite enriquecido com CLA, o qual se apresentou menos firme e esfarelento e conseqüentemente mais macio em relação ao controle. Quanto à manteiga, também elaborada a partir do leite enriquecido, esta apresentou maior velocidade de derretimento, embora tenha apresentado maior recobrimento. Vale ressaltar que estas diferenças não foram detectadas pelos provadores nos testes sensoriais.

Embora a alteração no perfil de ácidos graxos do leite enriquecido com CLA no sentido de aumentar as concentrações de ácidos graxos insaturados seja benéfica para as características sensoriais dos produtos derivados, estes ácidos graxos são mais suscetíveis à oxidação e, portanto poderia resultar em menor estabilidade e conseqüentemente menor vida de prateleira. No entanto, estudos, incluindo os citados acima, cujos testes objetivaram avaliar a estabilidade dos produtos durante o armazenamento, demonstraram que estes apresentam boas características de estocagem, ou seja, não apresentam nenhuma alteração significativa no que diz respeito não somente à oxidação, mas também à lipólise (JONES *et al.*, 2005; LYNCH *et al.*, 2005; RYHÄNEN *et al.*, 2005).

Diferentemente dos estudos mencionados acima, Campbell, Drake e Larickt, (2003), enriqueceram leite com CLA (36,9 % de *cis-9, trans-11* CLA e 36,7 % de *trans-10, cis-12* CLA) não por meio da modificação dietética dos animais, mas sim pela adição e homogeneização do composto em leite desnatado, para constituir um leite semi-desnatado (2 % de gordura) que posteriormente foi submetido à pasteurização HTST (77,2 °C/16 segundos). Quanto aos resultados, os autores encontraram redução significativa do isômero *cis-9, trans-11* CLA imediatamente após a pasteurização, o que

não aconteceu com o isômero *trans-10, cis-12* CLA. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a eficiência de antioxidantes no leite enriquecido com CLA. No entanto, os autores não encontraram efeito significativo da adição dos antioxidantes vitamina E e extrato de alecrim sobre a estabilidade oxidativa destes isômeros, demonstrando que o CLA é estável do ponto de vista oxidativo, embora suas duplas ligações conjugadas o tornem mais susceptível à oxidação (YANG *et al.*, 2000). Em relação à coloração do leite enriquecido com CLA, este se apresentou menos branco em decorrência da maior concentração de ácidos graxos insaturados quando comparado ao controle. O leite enriquecido com CLA apresentou sabor gramíneo em relação ao controle. É importante ressaltar que, segundo os autores, este sabor é originário da adição do óleo rico em CLA no leite e não resultante de processos oxidativos. No que diz respeito à aceitabilidade, os provadores atribuíram menores notas para o leite enriquecido com CLA, devido à menor percepção de frescor que, associada ao sabor gramíneo, contribuiu de forma negativa para o sabor global do produto. Quando empregados testes afetivos e descritivos, diferenças significativas foram encontradas quanto à viscosidade, embora o mesmo não tenha sido verificado nos testes físico-químicos. Resultados semelhantes foram encontrados quando micro cápsulas de CLA preparadas a partir de concentrado protéico de soro de leite foram adicionadas na proporção de 100, 200 e 300 mg/100 g de leite em pó integral. Este produto foi reconstituído e avaliado por meio de teste sensorial utilizando escala hedônica de 9 pontos. Os resultados indicam que apenas o leite controle (sem adição de CLA) apresentou médias estatisticamente superiores aos demais produtos, sendo que o leite com 300 mg de CLA/100 g de amostra foi o que recebeu as menores médias (JIMENEZ; GARCIA; BERISTAIN, 2008). Os resultados encontrados por este Grupo de Pesquisa diferem destes apresentados até o momento. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os leites semi-desnatados com e

sem adição de CLA nos testes de avaliação sensorial, para os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global. Estes resultados podem ser explicados pela presença do aromatizante de baunilha adicionado ao leite semi-desnatado que contém CLA. Sabe-se que a adição de aromatizantes mascara possíveis alterações e aumentam a aceitabilidade do produto, conforme foi observado por Campbell; Drake; Larick (2003), quando estes utilizaram aroma de chocolate em leite fluido com CLA. Com o objetivo de avaliar o comportamento dos ácidos graxos durante o processamento e armazenamento de cinco produtos lácteos (leite fluido, leite fermentado, iogurte, queijo fresco e uma mistura de suco e leite na proporção de 20:80 v/v) enriquecidos com CLA comercialmente disponíveis no mercado espanhol, Rodríguez-Alcalá; Fonseca (2007) utilizaram cromatografia gasosa e HPLC. Verificou-se que existe uma variação no conteúdo de CLA entre 50 a 75 %, decorrente do teor lipídico naturalmente presente nestes alimentos. Não houve alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no conteúdo dos principais isômeros *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* CLA, após o processamento e armazenamento por 10 semanas. Apenas o queijo fresco apresentou redução do conteúdo total de CLA após o período de armazenamento refrigerado. Acredita-se que este fato deva-se ao aumento do desenvolvimento da microbiota do produto. Vale ressaltar que a mistura de isômeros de CLA e a quantidade adicionada ao leite (0,6 %) utilizada para enriquecimento destes produtos, é a mesma utilizada para o desenvolvimento do leite semi-desnatado com adição de CLA empregado neste Projeto (CLA Tonalin® TG80), fornecido por doação pela Cognis Brasil Ltda.

5 CONCLUSÕES

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

- A suplementação com ácido linoléico conjugado não interferiu no consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos ratos entre os grupos estudados;
- Não houve diferença de peso de fígado, coração e rins entre os grupos que receberam controle e CLA em nenhum dos períodos experimentais;
- O consumo de CLA seja por meio de entubação orogástrica ou dieta enriquecida, não alterou os valores de triacilglicerol (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) séricos após 4 e 8 semanas de ensaio biológico;
- Os teores de HDL-colesterol (mg/dL) dos animais aumentaram em 56 % após 4 semanas de suplementação com ácido linoléico conjugado;
- Os valores de glicemia e insulina plasmáticas (mg/dL) dos ratos reduziram em 23,7 % e 10,43 % após 4 semanas e em 18 % e 32 % após 8 semanas, respectivamente, nos grupos que receberam CLA por meio de entubação orogástrica, em comparação ao consumo deste composto por meio de dieta;
- O consumo de CLA seja por meio de entubação orogástrica ou dieta enriquecida não alterou a carga máxima (N), o conteúdo de Ca (%) e P (%) dos ratos;
- A densidade óssea (g/cm^3) dos animais variou conforme a forma de administração, uma vez que o grupo cujo consumo de CLA foi advindo da dieta apresentou incremento de 17 % em comparação ao grupo que consumiu o composto por meio entubação orogástrica após 4 semanas, mas não diferiram entre si após 8 semanas;

- Com relação a composição corporal, seja no ensaio biológico ou no ensaio clínico, o consumo de ácido linoléico conjugado, seja na forma de suplementação ou por meio da dieta/leite enriquecido, não apresentou resultados favoráveis, os quais são compatíveis aos resultados de perfil hormonal e expressão gênica;
- Houve redução ($p \leq 0,05$) das concentrações de glicose e insulina plasmáticas (mg/dL) e dos valores de HOMA-IR nos voluntários que receberam as cápsulas de CLA em comparação com os que receberam placebo;
- Os resultados a respeito do perfil bioquímico assim como do hemograma não apresentaram alterações que pudessem assegurar o consumo de ácido linoléico conjugado de maneira positiva, independentemente da forma de administração;
- O leite semi-desnatado com e sem adição de CLA não diferiram sensorialmente segundo os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global, sugerindo boa aceitação deste produto. Este resultado foi confirmado pela positiva intenção de compra demonstrada pelos provadores;

Considerando os resultados obtidos na presente pesquisa, é possível concluir de maneira geral que o consumo de ácido linoléico conjugado não apresentou efeito sobre a composição corporal e sobre os teores de triacilglicerol e colesterol total séricos, mas atuou positivamente sobre os valores de glicemia e insulina plasmáticas nos ensaios biológico e clínico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I. S.; CHOI, B. H.; HA, J. H.; BYUN, J. M.; SHIN, H. G.; PARK, K.; DO, M. S. Isomer-specific effect of conjugated linoleic acid on inflammatory adipokines associated with fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 9, n. 3, p. 307-312, 2006.

AKAHOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; ICHINOSE, F.; KANEKO, M.; SHIMODA, A.; NONAKA, K.; YAMASAKI, M.; IWATA, T.; YAMAUCHI, Y.; TSUTSUMI, K.; SUGANO, M. Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. **Lipids**, Champaign, v. 39, p. 25-30, 2004.

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, 2003.

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

ARDREW, E.; ROSENBERG, M. D. El sistema esquelético y los tumores de los tejidos blandos: huesos. **Patología Estructural y Funcional**. Ed. Mc. Graw-Hill Interamericana, Espanha. 1995, p. 1331-1367.

ARNAL, M. A.; JAMIN, M.; RIBEYRE, M. C.; MOSONI, L.; FAULCONNIER, Y.; CHARDIGNY, J. M.; CHILLIARD, Y.; PATUREAU, P. M. Congrès commun AFERO, **Nutrition et Ob siti **, 2001, 29-30 Paris, France.

AUBIN, J. E.; LIU, F. The osteoblast lineage. **Principles of Bone Biology**. Ed. Academic Press, USA, 1996. p. 51-67.

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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 6, p. 1548-1554, 2000.

BANNI, S. Conjugated linoleic acid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 13, n. 3, p. 261-266, 2002.

BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNÁNDEZ, G. Biological effects of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 130, n. 12, p. 2943–2948, 2006.

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, 2003.

BEATON, G. H. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 59, p. 253S-261S, 1994.

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 and Cancer**, New York, 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, 2003.

BELURY, M.; MOYA-CAMARENA, S. Y.; LIU, K. L.; VAN DEN HEUVEL, J. P. Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 8, n. 10, p. 579-584, 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, 2001.

BENJAMIN, S.; HANHOFF, T.; BÖRCHERS, T.; SPENER, F. An improved molecular test system for the screening of human PPAR transactivation by conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 107, p. 706-715, 2005.

BEPPU, F.; HOSOKAWA, M.; TANAKA, L.; KOHNO, H.; TANAKA, T.; MIYASHITA, K. Potent inhibitory effect of *trans*-9, *trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, Stoneham, v. 34, p. 216-221, 2006.

BERVEN, G.; BYE, A.; HALS, O.; BLANKSON, H.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDTSEN, O. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 102, p. 455-462, 2000.

BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acid in health and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, p. 789-810, 2006.

BISSONAUTH, V.; CHOINARD, Y.; MARIN, J.; LEBLANC, N.; RICHARD, D.; JACQUES, H. The effects of t10, c12 CLA isomer compared with c9, t11 CLA isomer on lipid metabolism and body composition in hamsters. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, p. 597-603, 2006.

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

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; OLIVEIRA, A. C. Conjugated linoleic acid supplementation modified the body composition and serum leptin levels in weaning rats. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 58, n. 2, p. 156-163, 2008.

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; OLIVEIRA, A. C. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocyte culture. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 5, p. 767-771, 2009.

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal e aumentou os

teores de cinzas de ratos Wistar. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 30. p. 326-326, 2005a.

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 561-565, 2005b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Instrução Normativa nº 68, de 12/12/2006**. Diário Oficial da União. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 11 de junho de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em 28 jul. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em 7 de novembro de 2008.

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, 1999.

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

BROWN, J.; BOYSEN, M.; CHUNG, S.; FABIYI, O.; MORRISON, R.; MANDRUP, S.; MCINTOSH, M. K. Conjugated linoleic acid (CLA) induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 25, p. 26735–26747, 2004.

BROWN, J. M.; BOYSEN, M. S.; JENSEN, S. S.; MORRISON, R. F.; STORKSON, J.; LEA-CURRIE, R.; PARIZA, M.; MANDRUP, S.; MCINTOSCH, M. K. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, p. 1287-1300, 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, 2001.

BROWNBILL, R. A.; PETROSIAN, M.; ILICH, J. Z. Association between dietary conjugated linoleic acid and bone mineral density in postmenopausal women. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 24, n. 3, p. 177-181, 2005.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, Champaign, v. 36, p. 1007-1124, 2001.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, p. 165-177, 2002.

CAMPBELL, W.; DRAKE, M. A.; LARICK, D. K. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 43-51, 2003.

CARVALHEIRA, J. B. C. **Inter relação entre as vias de transmissão do sinal de insulina e leptina em hipotálamo e fígado de ratos**. 2002. 183p. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Programa de Pós graduação em Clínica Médica, Unicamp, Campinas, 2002.

CARVALHO, D. C. L. **Ação do ultra-sim de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas**. 2001. 60p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

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

CESANO, A.; VISONNEAU, S.; SCIMECA, J. A.; KRITCHEVSKY, D.; SANTOLI, D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. **Anticancer Agent**, Philadelphia, v. 18, p. 1429-1434, 1998.

CHAJES, V.; LAVILLONNIERE, F.; MAILLARD, V.; GIRAUDEAU, B.; JOURDAN, M. L.; SEBEDIO, J. L. Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. **Nutrition and Cancer**, New York, v. 45, p. 17-23, 2003.

CHO, H, J.; KIM, E. J.; LIM, S. S.; KIM, M. K.; SUNG, M. K.; KIM, J. S. *Trans*-10, *cis*-12, not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, p. 893-898, 2006.

CHOI, J. S.; JUNG, M. H.; PARK, H. S.; SONG, J. Effect of conjugated linoleic acid isomers on insulin resistance and mRNA levels of genes regulating energy metabolism in high-fat-fed rats. **Nutrition**, New York, v. 20, p. 1008-1017, 2004a.

CHOI, N.; KWON, D.; YUN, S. H.; JUNG, M. Y.; SHIN, H. Selectively hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid modifies body composition and plasma lipids in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 15, p. 411-417, 2004b.

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 downregulation stearoyl-CoA desaturase gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 8, p. 1920-1924, 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, 1982.

CHUNG, S.; BROWN, J. M.; PROVO, J. N.; HOPKINS, R.; MCINTOSH, M. K.; Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte resistance through NF κ B-dependent cytokine production. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 46, p. 38445-38456, 2005.

CLEMENT 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, 2002.

COHEN, L. A.; ZHAO, Z.; PITTMAN, B.; SCIMECA, J. Effect of soy protein isolate and conjugated linoleic acid on the growth of Dunning R-3327-AT-1 rat prostate tumors. **The Prostate**, New York, v. 54, p. 169-180, 2003.

COLLINS, D. A.; CHAMBERS, T. J. Prostaglandin E₂ promotes osteoclast formation in murine hematopoietic cultures through an action hematopoietic cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, Amsterdam, v. 7, p. 555-561, 1992.

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, 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, 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, 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, 2000. Abstract 366.8.

CUNNINGHAM, D. C.; HARRISON, L. Y.; SHULTZ, T. D. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibition in culture. **Anticancer Agent**, Philadelphia, v. 17, p. 197-203, 1997.

CURTIS, C. L.; HUGHES, C. E.; FLANNERY, C. R.; LITTLE, C. B.; HARWOOD, J. L.; CATERSON, B. n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 721-724, 2000.

CUSACK, S.; JEWELL, C.; CASHMAN, K. D. The effect of conjugated linoleic acid on the viability and metabolism of human osteoblast-like cells. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 29-39, 2005.

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, 1999.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 56-63, 2006.

DESROCHES, S.; CHOUINARD, P. Y.; GALIBOIS, I.; CORNEAU, L.; DELISLE, J.; LAMARCHE, B.; COUTURE, P.; BERGERON, N. Lack effect of dietary conjugated linoleic

acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 82, p. 309-319, 2005.

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.

DOSTALOVA I.; KUNESOVA M.; DUSKOVA J.; PAPEZOVA H.; NEDVIDKOVA J. Adipose tissue resistin levels in patients with anorexia nervosa. **Nutrition**, New York, v. 22, n. 10, p. 977-983, 2006.

DOWNEY, P. A.; SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. **Physical Therapy**, Alexandria, v. 86, p. 77-91, 2006.

DOYLE, L.; JEWELL, C.; MULLEN, A.; NUGENT, A. P.; ROCHE, H. M.; CASHMAN, K. D. Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid on markers of calcium and bone metabolism in healthy adult men. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 59, p. 432-440, 2005.

DUCY, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. **Developmental Dynamics**, New York, v. 219, n. 4, p. 461-471, 2000.

EVANS M.; LIN X.; ODLE J.; MCINTOSH M. *Trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 3, p. 450–455, 2002.

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, 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, 2000.

EVANS, M.; PARK, Y.; PARIZA, M.; CURTIS, L.; KUEBLER, B.; MCINTOSH, M. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor γ 2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, Champaign, v. 36, p. 1223-1232, 2001.

FIELD, C. J.; SCHLEY, P. D. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, p. 1190S-1198S, 2004. Supplement 6.

FONSECA, D.; WARD, W. E. Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. **Bone**, New York, v. 35, p. 489-497, 2004.

FRITSCHKE, 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, 1998.

FUENTE, M. A.; LUNA, P.; JUÁREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 9 p. 917-926, 2006.

FUNCK, L. G.; BARRERA-ARELLANO, D.; BLOCK, J. M. Ácido linoléico conjugado (CLA) e sua relação com a doença cardiovascular e os fatores de risco associados. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 56, n. 2, p. 123-134, 2007.

GAULLIER, J. M.; HALSE, J.; HOYE, K.; KRISTIANSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, p. 1118-1125, 2004.

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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 1, p. 27-29, 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, 1989.

GÓMEZ, C. C. El papel del CLA o ácido linoléico conjugado sobre la masa corporal. **Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**, Madrid, v. 6, n. 24, p. 55-60, 2004.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 78, n. 3, p. 783-809, 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 Δ^9 desaturase. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, 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, 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, 1990.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 57, p. 715S-725S, 1993.

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, 2003.

HAWRRYSH, Z. J.; SHAND, P. J.; TOKARSKA, B.; LIN, C. Effects of tertiary butylhydroquinone on the stability of canola oil. I. Accelerated storage. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 21, p. 549-554, 1988.

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 ratas lactantes**. 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal

e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.

HERMSDORFF, H. H. M.; VIEIRA, M. A. Q.; MONTEIRO, J. B. R. Leptina e sua influência na patofisiologia de distúrbios alimentares. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 369-379, 2006.

HEYWARD, V. H.; STOLARCZYK, L. M. **Applied Body Composition Assessment**. Human Kinetics Books. Champaign, Illinois. 1996.

HOAG, S. W.; HUSSAIN, A. S. The impact of formulation on bioavailability: summary of workshop discussion. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 4S, p. S1389-S1391, 2001.

HOUSE, R. L.; CASSADY, J. P.; EISEN, E. J.; ELING, T. E.; COLLINS, J. B.; GRISSOM, S. F.; ODLE, J. Functional genomic characterization of delipidation elicited by *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in polygenic obese line of mice. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 21, p. 351-361, 2005.

HOUSEKNECHT, K. L.; VAN DEN 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, 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.

HUR, S. J.; PARK, Y. Effects of conjugated linoleic acid on bone formation and rheumatoid arthritis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 568, p. 16-24, 2007.

HURLEY, M. M.; LEE, S. K.; RAISZ, L. G.; BERNECKER, P.; LORENZO, J. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. **Bone**, New York, v. 22, p. 309-316, 1998.

INGELSSON, E.; RISÉRUS, U. Effects of *trans*-10, *cis*-12 CLA-induced insulin resistance on retinol binding protein 4 concentrations in abdominally obese men. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 82, p.23-24, 2008.

INOUE, N.; NAGAO, K.; WANG, Y. M.; NOGUCHI, H. Dietary conjugated linoleic acid lowered tumor necrosis factor- α content and altered expression of genes related to lipid metabolism and insulin sensitivity in the skeletal muscle of Zucker rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 7935-7939, 2006.

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.

IOM (Institute of Medicine). National Academy of Sciences on Dietary Reference Intakes (dris). **Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment**. National Academy Press, Washington, 2001, 237p.

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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.129, n. 12, p. 2135-2142, 1999.

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>. Acesso em: 23 abr. 2003.

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, 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, 1997.

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, 1994.

JEWELL, C.; CASHMAN, K. D. The effect of conjugated linoleic acid and medium-chain fatty acids on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 89, p. 639-647, 2003.

JEWELL, C.; CUSACK, S.; CASHMAN, K. D. The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal-like Caco-2 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 72, p. 163-171, 2005.

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, 1999.

JIMENEZ, M.; GARCIA, H. S.; BERISTAIN, C. I. Sensory evaluation of Dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). **Food Science and Technology**, London, v. 41, p. 1047-1052, 2008.

JONES, E. L.; SHINGFIELD, K. J.; KOHEN, C.; JONES, A. K.; LUPOLI, B.; GRANDISON, A. S.; BEEVER, D. E.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 2923-2937, 2005.

JORGE, N.; JANIERI, C. Avaliação do óleo de soja submetido ao processo de fritura de alimentos diversos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1001-1007, 2005.

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. 12, p. 5793–5796, 1996.

KAMPFIUS, M. M. J. W.; LEJEUNE, M. P. G. M.; SARIS, W. H. M.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight

loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. **International Journal of Obesity**, London, v. 27, p. 840-847, 2003.

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. 795–7999, 2003.

KAY, J. K MACKLE, T. R.; AULDIST, M. J.; THOMSON, N. A.; BAUMAN, D. E. Endogenous synthesis of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 369-378, 2004.

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, 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, 2000.

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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 5, p. 881-855, 1998.

KELLY, O.; CASHMAN, K. D. The effect of conjugated linoleic acid on calcium absorption and bone metabolism and composition in adult ovariectomised rats. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 71, n. 5, p. 295-301, 2004.

KELLY, O.; CUSACK, S.; JEWELL, C.; CASHMAN, K. D. The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 90, n. 4, p. 743-750, 2003.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; SCHIMIDT, S.; MANDRUP, S.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 21, n. 3, p. 171-179, 2010.

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, 1966.

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

KIM, J. H.; HUBBARD, N. E.; ZIBOH, V.; ERICKSON, K. L. Attenuation of breast tumor cell growth by conjugated linoleic acid via inhibition of 5-lipoxygenase activating protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1736, p. 244-250, 2005.

KIMBERLY, M.; MARGRAVE, A.; MICHAEL, J. A.; JESS, L. M. Dietary coconut oil increases conjugated linoleic acid-induced body fat loss in mice independent of essential fatty acid deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1737, p. 52-60, 2005.

KREBS, N. F. Bioavailability of dietary supplements and impact of physiologic state: infants, children and adolescents. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 4S, p. S1351-S1354, 2001.

KREIDER, R. B.; FERREIRA, M. P.; GREENWOOD, M.; WILSON, M.; ALMADA, A. L. Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. **Journal of Strength and Conditioning Research**, Colorado Springs, v. 16, n. 3, p. 325-334, 2002.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; CZARNECKI, S. K.; WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions. **Lipids**, Champaign, v. 39, n. 7, p. 611-616, 2004.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S. K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 19, n. 4, p. 472S-477S, 2000.

KUNIYASU, H.; YOSHIDA, K.; SASAKI, T.; SASAHIRA, T.; FUJII, K.; OHMORI, H. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. **International Journal of Cancer**, New York, v. 118, p. 571-576, 2006.

LAROSA, P. C.; MINER, J.; XIA, Y.; ZHOU, Y.; KACHMAN, S.; FROMM, M. E. *Trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 27, n. 3, p. 282–294, 2006.

LARSSON, S. C.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 82, p. 894-900, 2005.

LASA, A.; CHURRUCA, I.; SIMÓN, E.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; PORTILLO, M. P. *Trans*-10,*cis*-12-conjugated linoleic acid does not increase body fat loss induced by energy restriction. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 100, n. 6, p. 1245-1250, 2008.

LASA, A.; SIMÓN, E.; CHURRUCA, I.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ V. M.; PORTILLO, M. P. Adiposity and serum parameters in hamsters fed energy restricted supplemented or not with *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 63, n. 4, p. 297-304, 2007.

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, 1994.

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

LEVY-COSTA, R. B.; SICHIERI, R.; PONTES, N. S.; MONTEIRO, C. A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 530-540, 2005.

LI, J. J.; HUANG, C. J.; XIE, D. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 6, p. 631-645, 2008.

LI, Y.; WATKINS, B. A. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E₂ biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 33, n. 4, p. 417-425, 1998.

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, 1995.

LIU, X. H.; KIRSCHENBAUM, A.; YAO, S.; LEVINE, A. C. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-(kappa)B (RANK) ligand/RANK system. **Endocrinology**, Baltimore, v. 146, n. 4, p. 1991-1998, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

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.

LUKASKI, H. C.; BOLONCHUK, W. W.; HALL, C. B.; SIDERS, W. A. Validation of tetrapolar bioelectrical impedan method to human body composition. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 60, n. 4, p. 1327-1332, 1986.

LYNCH, J. M.; LOCK, A. L.; DWYER, D. A.; NOORBAKHSH, R.; BARBANO, D. M.; BAUMAN, D. E. Flavor and stability of pasteurized milk with elevated levels of conjugated linoleic acid and vaccenic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 489-498, 2005.

MACKIE, E. J. Osteoblast: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 35, p. 1301-1305, 2003.

MAEDA, N.; TAKAHASHI, M.; FUNAHASHI, T.; KIHARA, S.; NISHIZAWA, H.; KISHIDA, K.; NAGARETANI, H.; MATSUDA, M.; KOMURO, R.; OUCHI, N.; KURIYAMA, H.; HOTTA, K.; NAKAMURA, T.; SHIMOMURA, I.; MATSUZAWA, Y. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 9, p. 2094-2099, 2001.

MAJUMDER, B.; WAHLE, K. W.; MOIR, S.; SCHOFIELD, A.; CHOE, S. N.; FARQUHARSON A. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 16, p. 1447-1449, 2002.

MALPUECH-BRUGERE, C.; VERBOEKET-VAN DE VENNE, W. P.; MENSINK, R. P. Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. **Obesity Research**, Silver Spring, v. 12, p. 591-598, 2004.

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, 2000.

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

MAURIN, A. C.; CHAVASSIEUX, P. M.; MEUNIER, P. J. Expression of PPARgamma and beta/delta in human primary osteoblastic cells: influence of polyunsaturated fatty acids. **Calcified Tissue International**, New York, v. 76, n. 5, p. 385-392, 2005.

McCANN, S. E.; IP, C.; IP, M. M.; McGUIRE, M. K.; MUTI, P.; EDGE, S. B. Dietary intake of conjugated linoleic acids and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer, Western New York Exposures and Breast Cancer Study (WEB Study). **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v., 13, p. 1480-1488, 2004.

McCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M.; RAISZ, L. G.; CANALIS, E. Prostaglandin E₂ stimulates insulin-like growth factor 1 synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 128, n. 6, p. 2895-2900, 1991.

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, 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, 2000.

MEDLIN, C. SKINNER, J. Individual dietary methodology: a 50-year review of progress. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 7, p. 1181-1189, 1998.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3rd. New York: CRC, 1999. 281p.

MEINERT, T. L.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, p. 216-221, 2003.

MELLO, L. C. P.; GOMIDE, L. B. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 5, p. 593-600, 2005.

MENDES, F. Q.; GOMES, J. C.; BARBOSA, T. S.; SARTORI, M. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Formulação de leite em pó enriquecido com ferro. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2008.

MICROSOFT Project for Windows XP Professional: Microsoft Office Excel. Version 5.1.2600. [S.l.]: Microsoft Corporation, 2003.

MILLER, A.; STANTON, C.; DEVERY, R. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids**, Champaign, v. 36, p. 1161-1168, 2001.

MINER, J. L.; CEDERBERG, C. A.; NIELSEN, M. K.; CHEN, X.; BAILE, C. A. Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. **Obesity Research**, Silver Spring, v. 9, p. 129-134, 2001.

MIYAZAWA, T.; TSUZUKI, T.; NAKAGAWA, K.; IGARASHI, M. Fatty acids with conjugated unsaturation: relationship between oxidative stability and physiological activities. **Lipid Technology**, High Wycombe, v. 17, n. 10, p. 221-225, 2005.

MOLONEY, F.; YEOW, T. P.; MULLEN, A.; NOLAN, J. J.; ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, p. 887-895, 2004.

MOON, H. S.; LEE, H. G.; SEO, J. H.; CHUNG, C. S.; KIM, T. G.; KIM, I. Y.; LIM, K.W.; SEO, S. J.; CHOI, Y. J.; CHO, C. S. Down-regulation of PPARgamma2-induced adipogenesis by PEGylated conjugated linoleic acid as the pro-drug: attenuation of lipid accumulation and reduction of apoptosis. **Archives Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 456, n. 1, p. 19–29, 2006.

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, 2001.

MOURÃO, D. M.; MONTEIRO, J. B. R.; COSTA, N. M. B.; STRINGHETA, P. C.; MINIM, V. P. R.; DIAS, C. M. G. C. Ácido Linoléico conjugado e perda de peso. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 391-399, 2005.

MURPHY, E. F.; JEWELL, C.; HOOVELD, G. J.; MULLER, M.; CASHMAN, K. D. Conjugated linoleic acid engages transepithelial calcium transport in human intestinal-like

Caco-2 cells: an insight into molecular changes. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 196-214, 2006.

NAGAO, K.; INOUE, N.; WANG, Y.; YANAGITA, T. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 310, p. 562-566, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of laboratory animals**. 4 ed. Washington: National Academy Press, 1995. p. 11-79.

NAZARE, J. A.; DE LA PERRIERE, A. B.; BONNET, F.; DESAGE, M. Daily intake of conjugated linoleic acid-enriched yogurths: effects on energy metabolism and adipose tissue gene expression in healthy subjects. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 97, p. 273-280, 2007.

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, 1997.

NEPA (NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO). **Tabela brasileira de composição de alimentos-TACO/versão 2**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2004. 42p.

NOTO, A.; ZAHRAKKA, P.; YURKOVA N.; XIE, X.; NITSCHMANN, E.; OGBORN, M.; TAYLOR, C. G. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. **Lipids**, Champaign, v. 41, n. 2, p. 179-188, 2006.

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

O'SHEA, M.; DEVERY, R.; LAWLESS, F.; MURPHY, J.; STANTON, C. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. **Anticancer Agent**, Philadelphia, v. 20, p. 3591-3601, 2000.

O'SHEA, M.; STANTON, C.; DEVERY, R. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. **Anticancer Agent**, Philadelphia, v. 19, p. 953-959, 1999.

OCHOA, J. J.; FARQUHARSON, A. J.; GRANT, I.; MOFFAT, L. E.; HEYS, S. D.; WAHLE, K. W. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 25, p. 1185-1191, 2004.

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, 2001.

OHR, L. M. Nutraceuticals & functional foods. **Food Technology**, Chicago, v. 59, n. 4, p. 63-65, 2005.

OIKAWA, D.; TSUYAMA, S.; AKIMOTO, Y.; MIZOBE, Y.; FURUSE, M. Arachidonic acid prevents fatty liver induced by conjugated linoleic acid in mice. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 24, n. p. 1-6, 2008.

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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 11, p. 2037-2042, 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.

PALOMBO, J. D.; GANGULY, A.; BISTRAN, B. R.; MENARD, M. P. The antiproliferative effects of biological active isomers of conjugated linoleic acid in human colorectal and prostatic cancer cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 177, p. 163-172, 2002.

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, 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, 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, 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, 2001.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity. **Toxicological Science**, Orlando, v. 52, p. 107-110, 1999. Supplement 2.

PARK, Y. Conjugated linoleic acid (CLA): god or bad trans fat? **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.22, n. 5, p. 388-393, 2009.

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, 1997.

PARK, Y.; PARIZA, M. W.; PARK, Y. Co-supplementation of dietary calcium and conjugated linoleic acid (CLA) improves bone mass in mice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, p. 556-560, 2008.

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, 2000.

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, 1999.

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

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; DEL CLARO, G. R.; MELO, M. P.; PUGINE, S. P.; CUNHA, J. A. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 12, p. 1793-1799, 2007.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA Jr., L. C. G. **Físico-química do leite e derivados**: Métodos Analíticos. 2 ed.rev.apl. Juiz de Fora: EMPAMIG, 2001.

PETERS, J. M.; PARK, Y.; GONZALEZ, F. J.; PARIZA, M. W. Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1533, p. 233-242, 2001.

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, 2003.

PETROSKI, E. L.; PIRES NETO, C. S. Validação de equações antropométricas para a estimativa da densidade corporal em adultos. **Revista Brasileira de Atividade Física**, Londrina, v. 1, n. 3, p. 5-14, 1996.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PILBEAM, C. C.; HARRISON, J. R.; RAISZ, L. G. Prostaglandins and bone metabolism. **Principles of bone biology**. Ed. Academic Press. San Diego, Califórnia, USA. 2002. p. 979-994.

POIRIER H.; SHAPIRO J. S.; KIM R. J.; LAZAR M. A. Nutritional supplementation with *trans*- 10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. **Diabetes**, New York, v. 55, n. 6, p. 1634–1640, 2006.

POIRIER, H.; ROUAULT, C.; CLÉMENT, L.; NIOT, I.; MONNOT, M. C.; GUERRE-MILLO, M.; BESNARD, P. Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse. **Diabetologia**, New York, v. 48, p. 1059-1065, 2005.

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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 10, p. 2722-2731, 2001.

PSZCZOLA, D. E. Making fortification functional. **Food Technology**, Chicago, v. 59, n. 4, p. 44-61, 2005.

PURUSHOTHAM, A.; SHRODE, G. E.; WENDEL, A. A.; LIU, L.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, p. 676-684, 2007.

RAHMAN, M. M.; BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; FERNANDES, G. Conjugated linoleic acid protects against age-associated bone loss in C57BL/6 female mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, p. 467-474, 2007.

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 β -oxidation of fatty acid in OLETF rats. **Nutrition**, New York, v. 17, n. 5, p. 385-390, 2001.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 115, p. 3318-3325, 2005.

RAISZ, L. G. Physiologic and pathologic roles of prostaglandins and other eicosanoids in bone metabolism. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 2024S-2027S, 1995.

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, 1993.

RISÉRUS, U. M.; ARNER, P.; BRISMAR, K.; VESSBY, B. Treatment with dietary *trans10cis12* conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 25, n. 9, p. 1516-1521, 2002a.

RISÉRUS, U.; BASU, S.; JOVINGE, S.; FREDRIKSON, G. N.; ÄRNLÖV, J.; VESSBY, B. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress

and elevated C-reactive protein – a potencial link to fatty acid-induced insulin resistance.

Circulation, Baltimore, v. 106, p. 1925-1929, 2002b.

RISÉRUS, U.; BERGLUND, L.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. **International Journal of Obesity**, London, v. 25, p. 1129-1135, 2001.

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. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, n. 2, p. 279-283, 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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 5, p. 1548-1554, 2001.

ROCHE, H. M.; TERRES, A. M.; BLACK, I. B.; GIBNEY, M. J.; KELLEHER, D. Fatty acids and epithelial permeability: effect of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. **Gut**, London, v. 48, p. 797-802, 2001.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; FONTECHA, J. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: evaluation after processing and storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 2083-2090, 2007.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.

ROSS, B.; RUCKLIDGE, G.; REID, M.; ROSS, K.; DUNCAN, G.; NAVARRO, M. A.; ARBONES-MAINAR, J. M.; GUZMAN-GARCIA, M. A.; OSADA, J.; BROWNE, J.; LOSCHER, C. E.; ROCHE, H. M. Divergent mechanisms of *cis*9, *trans*11 and *trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 29, p. 1-21, 2005.

RYHÄNEN, E. L.; TALLAVAARA, K.; GRIINARI, J. M.; JAAKKOLA, S.; MANTERE-ALHONEN, S.; SHINGFIELD, K. J. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiveing grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p. 207-217, 2005.

SAKAGUCHI, K.; MORITA, I.; MUROTA, S. Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 50, p. 81-84, 1994.

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, 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, 1999.

SANTOS, A. C. **Efeito da adiponectina no controle hipotalâmico da fome**. 2008. 52p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) - Programa de Pós graduação em Medicina Experimental, Unicamp, Campinas, 2008.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Supplementation with commercial mixtures of conjugated linoleic acid in association with vitamin E and the process of lipid autoxidation in rats. **Lipids**, Champaign, v. 42, p. 845-854, 2007.

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, 1999.

SCHLEMMER, C. K.; COETZER, H.; CLAASSEN, N.; KRUGER, M. C. Oestrogen and essential fatty acid supplementation corrects bone loss due to ovariectomy in the female Sprague Dawley rat. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Amsterdam, v. 61, p. 381-390, 1999.

SHAHIN, A. M.; McGUIRE, M. K.; McGUIRE, M. A.; RITZENTHALER, K. L.; SHULTZ, T. D. Determination of c9,t11-CLA in major human plasma lipid classes using a combination of methylating methodologies. **Lipids**, Champaign, v. 38, n. 7, p. 793-800, 2003.

SHI, H.; CAVE, B.; INOUE, K.; BJORBAEK, C.; FLIER, J. Overexpression of suppressor of cytokine signaling in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. **Diabetes**, New York, v. 55, n. 3, p. 699-707, 2006.

SIMÓN, E.; MACARULLA, M. T.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; PORTILLO, M. P. Body fat lowering effect of conjugated linoleic acid is not due to increased lipolysis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 61, n. 2, p. 363–369, 2005.

SIMÓN, E.; MACARULLA, M. T.; CHURRUCA, I.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; PORTILLO, M. P. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid prevents adiposity but not insulin resistance induced by an atherogenic diet in hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, n. 2, p. 126-131, 2006.

SINNHUBER, R. O.; YU, T. C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. **Food Technology**, Chicago, v. 12, p. 9-12, 1958.

SIRI, W. E. Body composition from fluid spaces and density. In: BROZEK, J.; HENSCHEL, A. (Eds). **Techniques for measuring body composition**. Washington: National Academy of Science, 1961. p. 223-244.

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, 2001.

SLATER, B.; MARCHIONI, D. L.; FISBERG, R. M. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 599-605, 2004.

SLOAN, A. E. Top 10 global food trends. **Food Technology**, Chigaco, v. 59, n. 4, p. 20-32, 2005.

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

SONG, H. J.; SNEDDON, A. A.; HEYS, S. D.; WAHLE, K. W. Induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation in human prostate cancer cells by the *cis*-9, *trans*-11 but not the *trans*-10, *cis*-12 isomers of conjugated linoleic acid. **The Prostate**, New York, v. 66, p. 839-846, 2006.

SOUZA, H. B. A.; SOBRINHO A. G. S.; ZEOLA, N. M. B. L.; PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; LEONEL, F. R.; OBA, A.; LIMA, T. M. A. Avaliação de diferentes teores de gordura e antioxidante natural nos parâmetros qualitativos e sensoriais de embutido fresco de carne ovina. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 315-319, 2005.

STACHOWSKA, E.; GUTOWSKA, I.; SZUMILOWICZ, H.; BOBER, J.; CHULUBEK. Is conjugated linoleic acid a protective factor in atherosclerosis? Study with the use of neural networks. **Annual Academy of Medicine**, v. 51, n. 2, p. 27-32, 2005.

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, 2000.

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, 1997.

SUDA, K.; UDAGAWA, N.; SATO, N. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, p. 2504-2510, 2004.

SUKSOMBAT, W.; BOONMEE, T.; LOUNLAWAN, P. Effects of various levels of conjugated linoleic acid supplementation on fatty acid content and carcass composition of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 318-324, 2007.

SZYMCZYK, B.; PISULEWSKI, P.; SZCZUREK, W.; HANCZAKOWSKI, P. The effect of feeding conjugated linoleic acid (CLA) on rat growth performance, serum lipoproteins and subsequent lipid composition of selected rat tissues. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, London, v. 80, p. 1553-1558, 2000.

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, 2002.

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**, New York, v. 133, n. 3, p. 395-404, 2002.

TASHJAN Jr., A. H.; VOELKEL, E. F.; LAZZARO, M.; GOAD, D.; BOSMA, T.; LEVINE, L.; Tumor necrosis factor alpha (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calaria via a prostaglandin-mediated mechanism. **Endocrinology**, Baltimore, v. 120, p. 2029-2036, 1987.

TASHJAN Jr., A. H.; VOELKEL, E. F.; LAZZARO, M.; SINGER, F. R.; ROBERTS, A. B.; DERYNCK, R.; WINKLER, M. E.; LEVINE, L. Alpha and beta human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, p. 4535-4538, 1985.

TASHJIAN Jr., A. H.; HOHMANN, E. L.; ANTONIADES, H. N.; LEVINE, L. Platelet-derived growth factor stimulates bone resorption via a prostaglandin-mediated mechanism. **Endocrinology**, Baltimore, v. 111, p. 118-124, 1982.

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, 2003.

TERPSTRA, A. H. M.; Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, p.352-361, 2004.

TERRA, N. N.; CICHOSKI, A. J.; FREITAS, R. J. S. Valores de nitritos e TBARS durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 965-970, 2006.

THOMAS, T.; BURGUERA, B. Is leptin the link between fat and bone mass? **Journal of Bone and Mineral Research**, Amsterdam, v. 17, p. 1563-1569, 2002.

THOMAS, T.; GORI, F.; KHOSLA, S.; JENSEN, M. D.; BURGUERA, B.; RIGGS, B. L. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, p. 1630-1638, 1999.

THRUSH A. B.; CHABOWSKI A.; HEIGENHAUSER G. J.; MCBRIDE B. W.; OR-RASHID M.; DYCK D. J. Conjugated linoleic acid increases skeletal muscle ceramide content and decreases insulin sensitivity in overweight, non-diabetic humans. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, Guelph, v. 32, n. 3, p. 372-382, 2007.

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

TRICON, S.; BURGE, G. C.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C.; YAQOOB, P. The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 64, p. 171-182, 2005.

TROEN, B. R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental Gerontology**, Elmsford, v. 38, p. 605-614, 2003.

TROJÁKOVÁ, L.; RÉBLOVÁ, Z.; POKORNÝ, J. Determination of oxidative stability in mixtures of edible oil with nonlipidic substances. **Czech Journal of Food Science**, Praha, v. 19, n. 1, p. 19-23, 2001.

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, 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.

TSUZUKI, T.; IGARASHI, M.; IWATA, T.; YMAUCHI-SATO, Y.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, T. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α -tocopherol. **Lipids**, Champaign, v. 39, n. 5, p. 475-480, 2004.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Molecular Cell Biology**, London, v. 24, n. 12, p.5434–5446, 2004.

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, 1995.

VASCONCELOS, F. A. G. Tendências históricas dos estudos dietéticos no Brasil. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.14, n.1, p.197-219, 2007.

VERHULST, A.; JANSSEN, G; PARMENTIER, G.; EYSSEN, H. Isomerization of polyunsaturated long chain fatty acids by propionibacteria. **Society for Applied Microbiology**, Danvers, v. 9, p. 12-15, 1987.

VOORRIPS, L. E.; BRANTS, H. A.; KARDINAAL, A. F.; HIDDINK, G. J.; VAN DEN BRANDT, P. A.; GOLDBOHM, R. A. Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 76, p. 873-882, 2002.

VOTRUBA, S. B.; KIRCHNER, H.; TSCHÖP, M.; SALBE, A. D.; KRAKOFF, J. Morning ghrelin concentrations are not affected by short-term overfeeding and not predict *ad libitum* food intake in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 89, n. 3, p. 801-806, 2009.

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.

WATKINS, B. A.; LI, Y.; SEIFERT, M. F. Nutraceutical fatty acids as biochemical and molecular modulators of skeletal biology. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 20, p. 410S-416S, 2001. Supplement 5.

WATKINS, B. A.; SEIFERT, M. F. Conjugated linoleic acid and bone biology. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 19, n. 4, p. 478S-486S, 2000.

WEIGLE, D. S.; BUKOWSK, I. T. R.; FOSTER, D. C.; HOLDERMAN, S.; KRAMER, J. M.; LASSER, G.; LOFTON-DAY, C. E.; PRUNKARD, D. E.; RAYMOND, C.; KUIJPER, J. L. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 96, n. 4, p. 2065-2070, 1995.

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, 1998.

WON, J. C.; PARK, C. Y.; LEE, W. Y.; LEE, E. S.; OH, S. W.; PARK, S. W. Association of plasma levels of resistin with subcutaneous fat mass and markers of inflammation but not with metabolic determinants or insulin resistance. **Journal of Korean Medical Science**, Seoul, v. 24, n. 4, p. 695-700, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Agriculture Organization. Codex Alimentarius, Vol. H, CAC/RCP 31-1983 FIL 9C. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó**. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em 11 de junho de 2007.

WU, D. Modulation of immune and inflammatory response by dietary lipids. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 15, p. 43-47, 2004.

XU, X.; STORKSON, J.; KIM, S.; SUGIMOTO, K.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 663-667, 2003.

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, 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, 2000.

YANG, L.; LEUNG, L. K.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3072-3076, 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, 1999.

ZAMBELL, K. L.; KEIM, N. L.; VAN LOAN, M. D.; 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, 2000.

ZHANG, B.; GRAZIANO, M. P.; DOEBBER, T. W.; LEIBOWITZ, M. D.; WHITE-CARRINGTON, S.; SZALKOWSKI, 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, 1996.

ZULET, M. A.; MARTI, A.; PARRA, M. D.; MARTINEZ, J. A. Inflammation and conjugated linoleic acid: mechanisms of action and implications for human health. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 61, n. 3, p. 483-494, 2005.

7 ANEXOS

ANEXO 1



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1098-1, sobre "A SUPLEMENTAÇÃO EM CÁPSULA E O CONSUMO DE LEITE ENRIQUECIDO COM ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO: EFEITO SOBRE PERFIL LIPÍDICO, COMPOSIÇÃO CORPORAL, AUTOXIDAÇÃO LIPÍDICA E RESISTÊNCIA À INSULINA EM RATOS", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira / Adriana Prais Botelho / Lilia Zago Ferreira dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 27 de setembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1098-1, entitled "CONJUGATED LINOLEIC ACID CAPSULE SUPPLEMENTATION AND ENRICHED MILK CONSUMPTION: EFFECT ON LIPID PROFILE, BODY COMPOSITION, LIPID AUTOXIDATION AND INSULIN RESISTANCE IN RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 27, 2006.

Campinas, 27 de setembro de 2006.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

ANEXO 2



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 29/09/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 493/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)

CAAE: 0382.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "A SUPLEMENTAÇÃO EM CÁPSULA E O CONSUMO DE LEITE ENRIQUECIDO COM ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO: EFEITO SOBRE PERFIL LIPÍDICO, COMPOSIÇÃO CORPORAL, AUTOXIDAÇÃO LIPÍDICA E RESISTÊNCIA À INSULINA EM HUMANOS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lilia Zago Ferreira dos Santos

INSTITUIÇÃO: Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/09/2006

II - OBJETIVOS

Objetivo Geral: Comparar o efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado (CLA) e do consumo de leite enriquecido com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico, composição corporal, autoxidação lipídica e resistência à insulina em humanos por meio de ensaio clínico.

Objetivos específicos: determinar o perfil de ácidos graxos do suplemento de CLA e do leite enriquecido com CLA a fim de obter a concentração dos isômeros predominantes t10,c12 e c9,t11; Avaliar a aceitação e a intenção de compra do leite enriquecido e com CLA; Avaliar a estabilidade oxidativa do leite enriquecido com CLA; Avaliar e monitorar a ingestão dietética; Determinar o perfil bioquímico e hemograma completo; Determinar a composição corporal; Determinar o perfil hormonal; Determinar hidroperóxidos e malondialdéico; Determinar a concentração 8-iso-PGF-isoprostana; Determinar glutatona total e as atividades das enzimas glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatona-S-transferase, superóxido dismutase e catalase; Determinar LDL oxidada; Determinar glicose e resistência à insulina.

III - SUMÁRIO

Estudo de coorte prospectiva uni-cego. O uso de Ácido Linoléico Conjugado não está na lista de alegações de propriedade funcional e/ou a saúde aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e está em fase de pesquisa para a aprovação. Serão utilizados os suplementos, que são uma mistura comercial de CLA Tonalin e óleo de cártamo, provenientes da Cognis Brasil Ltda e o Leite enriquecido: leite desnatado enriquecido com 0,6% da mistura comercial da CLA para obter um leite semi-desnatado com 1,1% de gordura, caracterizado como leite UHT semi desnatado enriquecido com CLA

O leite enriquecido será produzido e fornecido através da parceria entre o Grupo de Pesquisa e o

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

Grupo Avipa-Elegê Alimentos. Será feita uma pesquisa de intenção de compra do leite enriquecido. Os participantes terão que assinar antes o TCLE. Será feita uma avaliação da estabilidade de oxidativa do leite enriquecido, por meio do índice de peróxido segundo AOC e melandialdéico.

A população será de 20 homens classificados como sobrepeso segundo o índice de massa corporal, que sejam sedentários ou praticantes de atividades física. O recrutamento será feito através de folhetos espalhados em locais públicos, contendo informações sobre os critérios de inclusão para o estudo.

Critérios de Inclusão: idade entre 35-55 anos, IMC 25-30kg/m², perfil bioquímico, hemograma normal, limite de pressão arterial:140x90mmHg, sorologia negativa para hepatite e HIV, ausência de história de doença pancreática e esteatorréia, sem uso de medicação continua e suplemento nutricional. Orçamento está descrito, com recursos provenientes da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Critérios de exclusão: doenças cardiovasculares, resistência à insulina e/ou diabetes, neoplasias, distúrbios neurológicos, intolerância à lactose, alergia a proteína do leite de vaca, alteração do peso corporal de 3 kg nos últimos três meses, uso de medicamentos com o objetivo de perda de peso, uso de suplemento nutricional com o objetivo de ganho muscular ou perda de gordura corporal, antecedente de consumo de álcool e narcóticos e fumantes.

Critério para suspensão da pesquisa: será suspensa por tempo indeterminado se houver surto de problemas gastrintestinais (diarréia, vômito e dores abdominais) entre os participantes.

O leite será oferecido em quantidades iguais em 3 copos descartável e codificado, em cabines privativas e individuais. Serão aplicados questionários, antes e durante a intervenção, para avaliação quantitativa e qualitativa do consumo alimentar dos sujeitos. Será coletado sangue, por 4 vezes, para determinar o perfil bioquímico sanguíneo e hemograma, que será coletado e avaliado pelo Serviço Laboratório de Hematologia do Hemocentro e do Laboratório de Patologia Clínica do HC. Será aplicado um protocolo de antropometria.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem fundamentado. O uso do CLA não está aprovado pela Anvisa até o momento, mas é aprovado o uso em outros países. Há uma carta de compromisso do Grupo Avipa-Elegê-Ltda, que irá fornecer o leite. Será feita uma pesquisa de intenção de compra do leite enriquecido. Há dois TCLE, um para avaliação sensorial do leite e outra para a intervenção. Ambos estão adequados. O orçamento está descrito e será proveniente da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de setembro de 2006.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a Intervenção

Propósito da Pesquisa: levando em consideração o conceito de alimentos funcionais, que relaciona a dieta com o processo saúde-doença, esta pesquisa tem o objetivo de avaliar as propriedades benéficas para a saúde, como a redução da composição corporal, do consumo de ácido linoléico conjugado (CLA) por meio de cápsulas e leite UHT semi-desnatado enriquecido. Para que você possa participar da Pesquisa, será necessária a realização dos exames de HIV e pesquisa de HbsAg e anti-HCV, que será feita uma única vez. Durante esta Pesquisa você terá que consumir diariamente durante 3 meses 3 cápsulas do suplemento ou 500 mL de leite que serão fornecidos pelos pesquisadores. Você terá que responder um questionário para fornecer informações pessoais e sobre sua alimentação. Os pesquisadores também irão obter seus dados antropométricos (peso, altura, dobras da pele no braço, costa e abdome e porcentagem de gordura corporal). Você terá que fazer exames de sangue (lipídios totais, triacilglicerol, colesterol total e frações, creatinina, uréia, ácido úrico, fosfatase alcalina, cálcio sérico, fósforo inorgânico, glicemia de jejum, aspartato aminotransferase - TGO, alanina aminotransferase – TGP), hemograma completo e urina 3 vezes ao longo do estudo (antes de começar a tomar as cápsulas ou o leite, depois de 6 semanas e depois de 12 semanas).

Observação: Caso o resultado da sorologia para HIV e hepatite seja positivo e/ou haja qualquer alteração do perfil bioquímico e hemograma você não poderá participar do estudo e será encaminhado para o devido tratamento.

Desconfortos e riscos potenciais: o procedimento de coleta de sangue para os exames não oferecerá riscos e desconfortos, uma vez que será realizado por profissionais capacitados e devidamente treinados utilizando material estéril e descartável. O consumo do suplemento ou do leite, bem como os procedimentos que você será submetido ao longo do estudo não causarão desconforto. O CLA já existe naturalmente no leite e também nas carnes, portanto, você já o consome com frequência na sua dieta. Ao consumir o suplemento ou o leite enriquecido você irá ingerir uma quantidade de CLA mais alta, mas que está dentro da faixa utilizada pela grande maioria das pesquisas com CLA em humanos. Alguns estudos têm relatado a hipótese de que o CLA possa aumentar as chances de produzir radicais livres e problemas de controle de glicose e lipídios no sangue, no entanto, até agora os dados são insuficientes para tirar qualquer conclusão a respeito. É importante que você saiba que suplementos de CLA estão disponíveis no mercado, enquanto que o leite enriquecido ou algum similar a este ainda não existe no mercado brasileiro.

Informações adicionais: a participação desta etapa da Pesquisa é inteiramente voluntária; você pode recusar-se a participar ou pode abandonar em qualquer que seja a fase da Pesquisa sem qualquer penalização ou prejuízo; qualquer dúvida que você tenha a respeito da Pesquisa será esclarecida pelos pesquisadores antes e durante a realização da mesma; os pesquisadores garantirão o sigilo e a preservação da sua privacidade.

Consentimento:

Após ter conhecido o propósito da Pesquisa “A suplementação em cápsula e o consumo de leite enriquecido com ácido linoléico conjugado: efeito sobre perfil lipídico, composição corporal, autoxidação lipídica e resistência à insulina em humanos”, bem como seus desconfortos e riscos potenciais, concordo em participar voluntariamente da Pesquisa e permito que todas as informações sejam utilizadas para o propósito da mesma.

Nome

Assinatura

Campinas, ____/____/____

Nome e telefone dos pesquisadores responsáveis pela Pesquisa:

Lilia Zago Ferreira dos Santos (19) 3867 XXXX

Adriana Prais Botelho (19) 3232 XXXX

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: (19) 3521 8936

ANEXO 4

1. IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE

Id	Nome		
Data da entrev. ___/___/___		Data nasc. ___/___/___	Idade
Endereço		nº	
Complemento		Bairro	CEP
Tel. (res)	Tel. (cel)		Tel. (com)
Email:		Termo de consentimento () SIM () NÃO	

2. INDICADORES DE SAÚDE

Possui hipertensão arterial () SIM () NÃO			
Possui algum tipo de doença pancreática? () SIM Qual? () NÃO			
Diarréia atual () SIM () NÃO			
Diarréia no último mês? () SIM Quanto tempo? () NÃO			
Já observou gordura em suas fezes? () SIM () NÃO			
Tomou medicamento recentemente? () SIM () NÃO			Qual?
Quando?			
Toma algum tipo de medicação contínua? () SIM () NÃO			Qual?
Atividade física () SIM () NÃO		Qual?	

Frequência		
Faz uso de algum tipo de suplemento nutricional? (especialmente para perda de peso ou ganho de massa muscular) () SIM () NÃO		
Qual?	Quantidade	Frequência
Possui algum tipo de doença cardiovascular? () SIM () NÃO		
Qual?		
Tem ou teve algum tipo de neoplasia? () SIM () NÃO		
Qual?	Quando?	
Possui algum problema emocional? () SIM Qual? () NÃO		
Possui algum tipo de desconforto gastrointestinal ao ingerir leite e/ou derivados? () SIM Qual? () NÃO		
Possui intolerância à lactose? () SIM () NÃO		
Possui alergia à alguma proteína do leite? (caseína, lactoglobulina e/ou lactoalbumina) () SIM Qual? () NÃO		
Engordou e/ou emagreceu 3 kg nos últimos 3 meses? () SIM () NÃO		
Faz uso de bebidas alcoólicas? () SIM Qual? () NÃO		
Dose	Frequência	
Faz uso de algum tipo de droga? () SIM () NÃO		

Fuma? () SIM () NÃO	Quantidade	Frequência
Infecção () SIM () NÃO	Qual?	Quando?
Esteve doente nos últimos 15 dias? () SIM () NÃO	O que teve?	

3. OUTRAS OBSERVAÇÕES

ANEXO 5

Nome: _____ Data: ___/___/___

Dia da semana: _____

Refeição	Horário	Alimento ou Bebida Consumidos/ Preparação	Quantidade	Marca	Local

Quantidade em medidas: colher de chá, colher de sobremesa, colher de sopa, xícara de café, xícara de chá, pires de chá, copo de requeijão, concha (pequena, média, grande), prato (raso, cheio, fundo).

Guia Explicativo para preenchimento do Registro Alimentar: este guia contém informações para auxiliá-lo na anotação dos alimentos que consumir no dia, visando a avaliação da sua alimentação. Você deve anotar criteriosamente tudo o que comer e beber, registrando também os horários, as quantidades, as marcas de produtos, as preparações e o local onde o alimento foi consumido. No quadro abaixo estão exemplos que poderão ser usados como modelo para o registro das quantidades de alimentos que você consumir.

Exemplo de formulário preenchido

Refeição	Horário	Alimento ou Bebida Consumidos/ Preparação	Quantidade	Marca	Local
Café da manhã	6:30 h	Leite	1 xícara		Casa
Café da manhã		Nescau	1 colh. de sobremesa		casa
Café da manhã		Açúcar	1 colh. de sobremesa		casa
Café da manhã		Pão Francês Margarina	1 unidade 2 colh. de chá		casa
Café da manhã		Queijo mussarela	2 fatias finas		casa
Lanche da manhã	10:00 h	Batata chips	1 pacote 200g	Ruffles	Escritório
Lanche da manhã		Suco de laranja artificial	1 unidade 200ml	Tampico	Escritório
Almoço	12:00 h	Arroz cozido	2 colh. de servir	---	Refeitório do escritório
Almoço		Feijão	1 concha média	----	Refeitório do escritório
Almoço		Carne assada	2 fatias finas	----	Refeitório do escritório
Almoço		Macarrão ao sugo Queijo parmesão ralado	2 colh. de servir 2 colh. de chá	----	Refeitório do escritório
Almoço		Salada de alface com tomate temperada com azeite, sal e limão	1 pires de chá	----	Refeitório do escritório
Lanche da tarde	15:00 h	Iogurte de morango batido com Leite Açúcar	1 pote de 200g de iogurte 1 copo de requeijão de leite 1 colh. Sobremesa	Danone	Lanchonete do Shopping

Lanche da tarde		Pastel de carne	1 unidade		Lanchonete do Shopping
Jantar	18:30 h	1 Sanduíche misto quente	2 fatias de pão de forma 2 fatias finas de presunto 2 fatias de muzzarella. 2 fatias de tomate 2 colh. de chá de margarina.	Pullman Frígor Éder	Casa da mãe
Jantar	18:30 h	Refrigerante - Guaraná	1 lata de 300ml	Antártica	Casa da mãe
Jantar	18:30 h	Brigadeiro	3 unidades		Casa da mãe
Ceia	22:00 h	Chá de camomila Açúcar	1 xícara 1 colh. Sobremesa		Casa

Orientações:

Sempre que possível, **anotar os alimentos em unidade ou medida tradicional**. Por exemplo:

- Frutas: unidade ou fatia (ex: 1 maçã pequena, 1 fatia de melão média, etc.);
- Pão: unidade ou fatia (especificar o tipo de pão. Ex: francês, de forma, etc.);
- Queijo: fatia (especificar o tipo. Ex: fresco, mussarela, etc.); especificar a espessura da fatia (fina, média e grossa);
- Bolacha: unidade (indicar qual o tipo e a marca. Ex: chocolate recheada - marca Bauduco);
- Pastel: unidade pequena, média ou grande (indicar sempre o recheio. Ex: pastel de feira – tipo pizza);
- Esfiha: unidade (indicar se é aberta ou fechada e qual o recheio – Ex: de carne, aberta, do grupo Habibs);
- Lanches: ex: Mc Donald's – Big Mac; se for caseiro, especificar os ingredientes.

Observações:

- Anotar sempre quando você adoça as bebidas (quantidade de açúcar ou adoçante);
- Quando o alimento for industrializado, indicar a marca (ex: 1 pote de iogurte Danone de 200g);
- Procure anotar os alimentos e as suas quantidades da melhor forma, se preferir e puder pode pesá-los;
- Anotar tudo o que você comer, mesmo se for um bombom ou balas durante o dia;
- Anotar tudo o que você beber, até mesmo água.

ANEXO 6

Protocolo para Antropometria

1. Peso:

- A balança deve ser periodicamente calibrada;
- O indivíduo deve usar roupas leves (eliminar o que for possível, especialmente sapatos, cintos, casacos, etc);
- Pedir para esvaziar a bexiga;
- O indivíduo deve se posicionar sobre a plataforma, com os pés colocados lado a lado e o peso distribuído igualmente entre os pés;
- Esperar o equilíbrio da balança e registrar o peso ao 0,1 kg.

2. Altura:

- Requer superfície vertical, com estadiômetro de parede afixado em superfície sem rodapé;
- O indivíduo descalço ou com meias, roupas leves para que o posicionamento do corpo possa ser visto;
- Retirar presilhas ou outros adereços do cabelo;
- Pesos distribuídos nos dois pés, calcanhares unidos, cabeça ereta de forma que o olhar esteja perpendicular ao corpo;
- Braços e mãos relaxados ao longo do corpo;
- Cabeça, costas, nádegas, panturrilhas e calcanhares encostados na superfície vertical;
- Qualquer indivíduo que não possa permanecer nesta posição deve ser mantido de forma a que as nádegas, costas e cabeça permaneçam em contato com a superfície;
- O indivíduo deve inspirar e manter posição ereta durante a medida;
- Posicionar um esquadro com 90 graus sobre o ponto mais alto da cabeça, comprimindo os cabelos, sem fazer força excessiva;
- Registrar a medida ao 0,1 cm.

3. Circunferência do braço:

- O sujeito deve estar ereto, com os braços livres e relaxados ao longo do tronco, palmas das mãos com a face para o tronco;
- Deve usar roupas que permitam expor o braço e ombros;
- Medir o ponto médio, flexionando o braço a 90 graus, com a palma da mão para cima; localizar a parte lateral do acrônio no ombro, e fazer uma marca de identificação;
- Localizar o ponto distal do olecrano na ulna (no cotovelo) e marcar com caneta;

- Medir a distância entre as marcas, e marcar o ponto médio;
- Com o braço relaxado, face da mão para o tronco; circular em volta do braço, com o final de modo a permitir a visualização pelo observador, e em compressão excessiva, tomar a medida ao 0,1 cm.

4. Circunferência de quadril:

- O indivíduo deve estar vestido com roupa que não comprima os tecidos moles do quadril, alterando sua dimensão e forma;
- Posicionado em pé, o indivíduo deve deixar os braços livres ao longo do tronco e os pés unidos;
- O observador deve estar sentado ao lado do indivíduo de forma a ter uma visão facilitada à altura da máxima circunferência dos quadris, para posicionar a fita em um plano horizontal;
- Um assistente pode ser útil para ajustar a posição da fita do outro lado do corpo;
- Tomar a medida ao 0,1 cm.

5. Circunferência de abdome:

- O indivíduo deve distribuir seu peso confortavelmente entre ambos os pés, separados cerca de 25 a 30 cm;
- Tomar a medida entre a última vértebra e a crista ilíaca, localizadas por palpação, marcar o ponto médio com caneta dermatográfica;
- O observador deve estar sentado ao lado do indivíduo para posicionar horizontalmente a fita, sem compressão acentuada;
- Tomar a medida ao 0,1 cm ao final de uma expiração normal do indivíduo.

6. Prega tricipital:

- É tomada verticalmente no ponto médio do braço, sobre o músculo tríceps (ver circunferência do braço para identificação do ponto médio);
- O indivíduo deve deixar o braço relaxado ao longo do tronco;
- O observador segura o adipômetro com a mão direita;
- A prega de pele e tecido subcutâneo é tomada gentilmente com a mão esquerda, por meio do indicador e polegar, aproximadamente a 1 cm da marca, de forma que as pontas do adipômetro sejam aplicadas perpendicularmente à prega;
- Registrar a medida ao 0,2 mm.

7. Prega bicipital:

- É tomada verticalmente no ponto médio do braço, sobre o músculo bíceps (ver circunferência do braço para identificação do ponto médio);
- O indivíduo deve deixar o braço relaxado ao longo do tronco;
- O observador segura o adipômetro com a mão direita;
- A prega de pele e tecido subcutâneo é tomada gentilmente com a mão esquerda, por meio do indicador e polegar, aproximadamente a 1 cm da marca, de forma que as pontas do adipômetro sejam aplicadas perpendicularmente à prega;
- Registrar a medida ao 0,2 mm.

8. Prega subescapular:

- É tomada gentilmente em uma linha diagonal, inclinada infra-lateral a aproximadamente 45 graus ao plano horizontal;
- O local certo está abaixo do ângulo inferior da escápula, para localizá-lo mais facilmente, pode-se solicitar ao indivíduo que dobre seu braço às costas;
- Com o braço relaxado ao longo do tronco, a medida é tomada aplicando-se o adipômetro a 1 cm com o polegar e indicador tomando a prega;
- Registrar a medida ao 0,2 mm.

9. Prega suprailíaca:

- O indivíduo deve estar trajando roupa que permita a exposição da crista supra-ílica, a qual deve ser localizada por palpação;
- Com o polegar e o indicador, toma-se a prega, gentilmente em uma linha diagonal, inclinada infra-lateral a aproximadamente 45 graus ao plano horizontal;
- Registrar a medida ao 0,2 mm.

ANEXO 7

Ficha de Avaliação da Aceitação e Intenção de Compra

Nome: _____ Idade: ____

Data: _____ Amostra: _____

Bem-vindo ao Laboratório de Análise Sensorial.
Você avaliará 2 amostras de leite UHT semi-desnatado.

1. Por favor, **OBSERVE** a amostra e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da **APARÊNCIA**.

Desgostei
muitíssimo

Gostei
muitíssimo

2. Por favor, **ASPIRE** a amostra e indique o quanto você gostou ou desgostou do **AROMA**.

Desgostei
muitíssimo

Gostei
muitíssimo

3. Por favor, **PROVE** a amostra, e com relação ao **SABOR**, indique o quanto você gostou ou desgostou da amostra.

Desgostei
muitíssimo

Gostei
muitíssimo

4. Por favor, avalie a amostra com relação a **IMPRESSÃO GLOBAL** (aparência, aroma, sabor e textura), e indique na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou.

Desgostei
muitíssimo

Gostei
muitíssimo

5. Se esta amostra estivesse à venda, qual seria sua atitude?

- Certamente não compraria
- Provavelmente não compraria
- Tenho dúvida se compraria ou não
- Provavelmente compraria
- Certamente compraria

ANEXO 8

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Avaliação Sensorial do Leite

Propósito da Pesquisa: levando em consideração o conceito de alimentos funcionais, que relaciona a dieta com o processo saúde-doença, esta pesquisa tem o objetivo de avaliar as propriedades benéficas para a saúde, como a redução da composição corporal, de leite enriquecido com ácido linoléico conjugado (CLA). Esta é uma etapa da Pesquisa em que possíveis consumidores do leite enriquecido com CLA irão fazer uma análise da aparência, aroma, sabor, aceitação global e intenção de compra deste produto. Para isto você terá que provar pequenas quantidades de amostras de leite enriquecido com CLA, dizer o quanto você gostou ou desgostou e qual a sua intenção de compra deste produto, utilizando uma ficha que lhe será fornecida no momento do teste.

Desconfortos e riscos potenciais: o procedimento que você fará não apresenta risco de qualquer natureza ou desconforto. O CLA já existe naturalmente no leite e também nas carnes, portanto, você já o consome com frequência na sua dieta. Neste leite enriquecido que você provará a quantidade de CLA está aumentada para um valor que está dentro da faixa utilizada pela grande maioria das pesquisas com CLA em humanos. É importante que você saiba que este produto ou algum similar a este ainda não existe no mercado brasileiro.

Informações adicionais: a participação desta etapa da Pesquisa é inteiramente voluntária; você pode recusar-se a participar ou pode abandonar em qualquer que seja a fase da Pesquisa sem qualquer penalização ou prejuízo; qualquer dúvida que você tenha a respeito da Pesquisa será esclarecida pelos pesquisadores antes e durante a realização da mesma; os pesquisadores garantirão o sigilo e a preservação da sua privacidade.

Consentimento:

Após ter conhecido o propósito de uma das etapas da Pesquisa “A suplementação em cápsula e o consumo de leite enriquecido com ácido linoléico conjugado: efeito sobre perfil lipídico, composição corporal, autoxidação lipídica e resistência à insulina em humanos”, bem como seus desconfortos e riscos potenciais, concordo em realizar o procedimento de avaliação sensorial do leite enriquecido com CLA e permito que todas as informações sejam utilizadas para o propósito da Pesquisa.

Nome

Assinatura

Campinas, ____/____/____

Nome e telefone dos pesquisadores responsáveis pela Pesquisa:

Lilia Zago Ferreira dos Santos (19) 3867 XXXX

Adriana Prais Botelho (19) 3232 XXXX

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: (19) 3521 8936