



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**



**RAFAELA DA SILVA MARINELI  
NUTRICIONISTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA), DOS  
FITOSTERÓIS E DE SUA COMBINAÇÃO NA REGULAÇÃO DE PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATOS  
*SPRAGUE DAWLEY.***

**Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR  
ORIENTADOR**

**CAMPINAS, 2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**RAFAELA DA SILVA MARINELI  
NUTRICIONISTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA), DOS  
FITOSTERÓIS E DE SUA COMBINAÇÃO NA REGULAÇÃO DE PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS, OXIDATIVOS E NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATOS  
*SPRAGUE DAWLEY***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ALIMENTOS  
E NUTRIÇÃO, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE NUTRIÇÃO  
EXPERIMENTAL E APLICADA À TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.**

**Prof. Dr. MARIO ROBERTO MAROSTICA JUNIOR  
ORIENTADOR**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Rafaela da Silva Marineli, aprovada pela comissão julgadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e orientada pelo Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior.

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M338a Marineli, Rafaela da Silva, 1986-  
Avaliação dos efeitos do ácido linoléico conjugado (CLA), dos fitosteróis e de sua combinação na regulação de parâmetros bioquímicos, oxidativos e na composição corporal de ratos Sprague Dawley / Rafaela da Silva Marineli. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Mario Roberto Marostica Junior.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido linoléico conjugado. 2. Fitosteróis. 3. Perfil lipídico. 4. Composição corporal. 5. Oxidação lipídica. I. Marostica Junior, Mario Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the effects of conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols and their combination in the regulation of biochemical and oxidative parameters and body composition in Sprague Dawley rats

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Conjugated linoleic acid

Phytosterols

Lipid profile

Body composition

Lipid oxidation

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Mario Roberto Marostica Junior [Orientador]

Lilia Zago Ferreira dos Santos

Renato Grimaldi

Data da defesa: 02/03/2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior (Orientador)**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**

---

**Profª. Dra. Lilia Zago Ferreira dos Santos (Titular)**

**Faculdade de Nutrição - UERJ**

---

**Prof. Dr. Renato Grimaldi (Titular)**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**

---

**Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva (Suplente)**

**Departamento de Nutrição – UNIFAL**

---

**Profª. Dra. Gláucia Maria Pastore (Suplente)**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**

**AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e tudo que sou.

À minha Mãe, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À minha irmã, pela confiança e admiração.

Ao meu pai pela educação e empenho à minha formação.

Ao meu namorado, pelo amor, apoio, dedicação e paciência.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Jr, pela orientação e por todo ensinamento e estímulo ao desenvolvimento das minhas habilidades e competências para a pesquisa.

À Dra. Soely Maria Pissini Machado Reis, pelo apoio técnico e profissionalismo.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha por todo auxílio técnico indispensável durante os ensaios biológicos.

À aluna do Curso Técnico em Nutrição do Colégio Técnico de Campinas, Larissa Bajay, pelo estágio prestado, ajuda, dedicação e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade construída.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras, em especial Daniel Barrera Arellano e Renato Grimaldi pelos ensinamentos e assistência nas análises dos suplementos.

À Helena do Instituto de Biologia, pela assistência na análise de ácidos graxos livres.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão do auxílio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

À Cognis Brasil pela doação dos suplementos de ácido linoléico conjugado, óleo de cártamo e fitosterol para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos membros da Banca Examinadora pelas sugestões e críticas convenientes ao aprimoramento do Trabalho.

Aos amigos do grupo de pesquisa “Compostos Bioativos, Nutrição e Saúde”, pelos momentos alegres e difíceis convividos.

Às queridas Lilia e Adriana, pelo apoio, orientações, ensinamentos e carinho desde o estágio no Laboratório de Lípidos até hoje, muito obrigada por tudo!

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição que contribuíram de forma importante para a realização desse Trabalho.

Aos amigos e família que de uma forma ou de outra estavam sempre presentes e interessados, incentivando o meu crescimento profissional e torcendo pelo meu sucesso.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de realizar este sonho.

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

“ Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina ”

“ Não tenha medo do caminho, tenha medo de não caminhar ”

" Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar."

(Autores desconhecidos)

## RESUMO GERAL

Têm-se atribuído inúmeros efeitos biológicos ao ácido linoléico conjugado (CLA) e aos fitosteróis. O CLA vem sendo estudado principalmente por sua ação anticarcinogênica, imunomoduladora, reguladora do balanço energético, pela alteração do perfil lipídico e da composição corporal, influência sobre o processo de resistência à insulina e aumento da oxidação lipídica. Os fitosteróis levam a redução dos níveis de colesterol sérico e, conseqüentemente, a prevenção de doenças cardiovasculares, além de outros efeitos benéficos reportados recentemente, como atividade antidiabetogênica e antioxidante. É possível que a interação entre CLA e fitosteróis melhore ou potencialize os seus efeitos biológicos isolados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos causados pela associação da suplementação de CLA e de fitosteróis no perfil lipídico, hormonal e oxidativo, na sensibilidade à insulina e na composição corporal *in vivo*. Foi realizado um ensaio biológico com 40 ratos machos *Sprague Dawley*, saudáveis, em crescimento, divididos em 5 grupos (n=8) e alimentados por 9 semanas com dieta normolipídica (AIN-93G) suplementada com 2% dos compostos lipídicos de interesse: grupo S com óleo de soja (padrão), grupo LA com óleo de cártamo (controle), grupo CLA com CLA Tonalin®, grupo P com fitosteróis Vegapure 95FF® e grupo CLA+P com uma mistura de CLA e fitosteróis. Foram determinados e avaliados: ingestão alimentar, ganho de peso, peso dos órgãos, composição corporal, perfil lipídico e hormonal, teste de tolerância à glicose e à insulina, conteúdo de lipídios hepáticos e fecais, enzimas antioxidantes e produtos primários e secundários da autooxidação lipídica. A associação entre CLA e fitosteróis não alterou a ingestão de dieta, ganho de peso, composição corporal, peso dos rins, coração e fígado, mas reduziu o peso do tecido adiposo epididimal (-42%), sem alteração no conteúdo de lipídios hepáticos e perfil lipídico sérico; aumentou a concentração de

insulina sérica sem comprometer a sensibilidade à insulina, já que os testes de tolerância à glicose e à insulina e os índices de HOMA-IR não diferiram entre os grupos. Além disso, o consumo isolado da mistura dos isômeros do CLA diminuiu o consumo de dieta, sem alteração do ganho de peso dos animais, reduziu os níveis de leptina sérica e aumentou o peso do fígado dos animais sem alterar o conteúdo de lipídios hepáticos. O consumo isolado de fitosteróis reduziu a glicose sanguínea, melhorando o índice de HOMA-BCF, e aumentou a excreção de lipídios fecais em 6 vezes, com ou sem a adição de CLA. Quanto ao perfil oxidativo, o grupo CLA+P não apresentou alteração nos valores plasmáticos de MDA e GSH, na atividade das enzimas SOD, GRd e GPx, mas restaurou os níveis de isoprostana e a atividade de catalase aos valores basais, as quais estiveram aumentadas com a suplementação de CLA. A suplementação com CLA+P também reduziu os produtos primários e secundários da peroxidação lipídica no fígado. A suplementação isolada de fitosteróis e de CLA também foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no fígado dos animais e os valores plasmáticos de MDA. Tendo em vista os resultados encontrados, pôde-se concluir que a associação entre a suplementação de CLA e fitosteróis não apresentou efeito sobre a composição corporal, perfil hormonal e lipídico, mas atuou positivamente na redução do tecido adiposo, sem comprometer a sensibilidade à insulina e induzir a hepatomegalia ou esteatose hepática. Além disso, o efeito sinérgico entre esses compostos melhorou o perfil oxidativo e reduziu a peroxidação lipídica nos animais. Porém, os mecanismos responsáveis por tais alterações não foram elucidados, sendo necessárias outras investigações.

**Palavras-chave:** ácido linoléico conjugado (CLA), fitosteróis, composição corporal, perfil lipídico, perfil hormonal, resistência à insulina, oxidação lipídica.

## ABSTRACT

Several biological effects have been assigned to the conjugated linoleic acid (CLA) and phytosterols. CLA has been studied mainly by anticarcinogenic actions, immunomodulatory, regulation of energy balance, modulation of circulating lipids and body composition, influence on the process of insulin resistance and increase in lipid oxidation. Phytosterols provide a reduction in serum cholesterol levels and prevent cardiovascular disease, and other biological effects reported recently, as antidiabetic and antioxidant activity. It is possible that the interaction between CLA and phytosterols improves or potentiate their isolated effects. The aim of this work was to evaluate the effects of dietary CLA associated with phytosterols on lipid, hormonal and oxidative profile, insulin sensitivity and body composition *in vivo*. A biological assay was conducted with 40 male healthy *Sprague Dawley* rats divided into 5 groups (n = 8) and fed for 9 weeks with a standard lipid diet (AIN-93G) supplemented with 2% of lipid compounds of interest: group S with soybean oil (standard), group LA with safflower oil (control), group CLA with CLA Tonalin®, group P with phytosterols Vegarupe 95FF®, and group CLA+P with a mixture of CLA and phytosterols. Food intake, weight gain, organs weight, body composition, lipid and hormonal profile, glucose tolerance test and insulin tolerance test, hepatic and fecal lipid content, antioxidant enzymes, primary and secondary lipid autoxidation products were determined. The association between CLA and phytosterols did not alter food intake, weight gain, body composition, kidneys, heart and liver weight, but reduced epididymal adipose tissue weight (-42%), without change in hepatic lipids content and lipid profile, increased serum insulin concentration, without impairment of insulin sensitivity, since the glucose tolerance test, insulin tolerance test and HOMA-IR index did not differ among the groups. In addition, the isolated consumption of mixture CLA isomers reduced food intake,

without alter the weight gain of animals, reduced serum leptin and increased animals liver weight without change the hepatic lipid content. And the isolated consumption of phytosterols reduced blood glucose, improving the HOMA-BCF index, and increased lipid fecal excretion by 6 times, with or without the addition of CLA. For the oxidative profile, CLA+P group showed no change in plasma MDA and GSH levels, SOD, GPx and GRd activity, but restored the levels of isoprostane and catalase activity to baseline, which were increased with CLA supplementation. Supplementation with CLA+P also reduced the primary and secondary products of lipid peroxidation in the liver. Supplementation of isolated phytosterols and CLA was also able to reduce lipid peroxidation in liver and plasma levels of MDA. We concluded that the association between phytosterols and CLA supplementation had no effect on body composition, hormonal and lipid profile, but acted positively on the reduction of adipose tissue without impairment of insulin sensitivity and hepatic steatosis or hepatomegaly. In addition, the synergistic effect between these compounds improved the oxidative profile and reduced lipid peroxidation in animals. However, the mechanisms responsible for these changes were not elucidated, so further investigations are necessary.

**Key words:** conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols, body composition, lipid profile, hormonal profile, insulin resistance, lipid oxidation.

## LISTA DE FIGURAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura dos isômeros <i>trans-10, cis-12 CLA</i> ; <i>cis-9, trans-11 CLA</i> e do Ácido linoléico..... | 8  |
| <b>Figura 2.</b> Esquema metabólico proposto para biossíntese de <i>cis-9, trans-11 CLA</i> .....                          | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura química de alguns fitosteróis.....                                                              | 27 |

## LISTA DE FIGURAS ARTIGO I

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Liver (A), kidneys (B), heart (C) and epididimal fat tissue (D) weights of <i>Sprague Dawley</i> rats fed supplemented diets.....          | 70 |
| <b>Figure 2.</b> Fecal lipis content in <i>Sprague Dawley</i> rats fed supplemented diets.....                                                              | 72 |
| <b>Figure 3.</b> Fasting serum leptin (A), ghrelin (B), adiponectin (C), and insulin (D) in <i>Sprague Dawley</i> rats fed supplemented diets.....          | 74 |
| <b>Figure 4.</b> Blood glucose after a intravenous glucose (A,B) and insulin (C,D) administration in <i>Sprague Dawley</i> rats fed supplemented diets..... | 75 |

## LISTA DE FIGURAS ARTIGO II

|                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 1.</b> Plasma levels of CAT (A), isoprostane (B), GSH (C), GRd (D), GPx (E), SOD (F) and MDA (G) in <i>Sprague Dawley</i> rats fed supplemented diets..... | 100 |
| <b>Figure 2.</b> Hepatic MDA (A) and peroxide index (B) in <i>Sprague Dawley</i> rats fed supplemented diets.....                                                    | 101 |

## LISTA DE TABELAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Conteúdo de CLA (mg/g de gordura) e porcentagem do isômero <i>cis-9, trans-11</i> em alguns alimentos..... | 11 |
| <b>Tabela 2.</b> Conteúdo de fitosteróis em alguns alimentos (mg/100g).....                                                 | 28 |

## LISTA DE TABELAS ARTIGO I

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> Composition of the experimental diets (g/kg).....                                                                                       | 62 |
| <b>Table 2.</b> Proximate composition (g/100g) and energy density (Kcal/100g) of the experimental diets.....                                            | 63 |
| <b>Table 3.</b> Body weights, weight gain, food intake, food efficiency ratio (FER) and body composition in rats fed S, LA, CLA, P and CLA+P diets..... | 69 |
| <b>Table 4.</b> Fasting serum lipids, hepatic lipid content and serum glucose in rats fed S, LA, CLA, P and CLA+P diets.....                            | 71 |

## LISTA DE TABELAS ARTIGO II

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> Fatty acids profiles of lipid supplements used to prepare the experimental diets.....                 | 92 |
| <b>Table 2.</b> Phytosterols profiles of lipid supplements used to prepare the experimental diets.....                | 93 |
| <b>Table 3.</b> Composition of the experimental diets (g/kg).....                                                     | 95 |
| <b>Table 4.</b> Cumulative body weight gain and cumulative food intake in rats fed S, LA, CLA, P and CLA+P diets..... | 98 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC = ATP-binding cassette

ACAT = Acyl cholesterol acyl transferase / acil-CoA-colesterol acil transferase

ACC = Acetil CoA carboxilase

ANOVA = One-way analysis of variance

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

ApoB = Apolipoproteína B

AUC = Area under the curve / área sob a curva

CAT = Catalase

CLA = Conjugated linoleic acid / ácido linoléico conjugado

COX-2 = Cicloxigenase 2

CPT = Carnitina palmitoil transferase / carnitina palmitoiltransferase

DNA = Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribinucleico

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

FAS = Fatty acid sintase / ácido graxo sintase

FDA = Food and Drug Administration

FER = Feed efficiency ratio / coeficiente de eficiência alimentar

GC = Gas chromatography / cromatografia gasosa

GLUT4 = Transportador de glucose dependente de insulina

GPx = Glutathione peroxidase / glutathione peroxidase

GRd = Glutathione reductase / glutathione redutase

GRAS = Generally Recognized as Safe

GSH = Glutathione / Glutathione

HDL = High density lipoprotein / lipoproteína de alta densidade

HGT = Hemo Gluco test

HOMA-BCF = Homeostasis model assessment of beta cell function / Modelo de avaliação da homeostase de função da célula beta

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

iGTT = Intraperitoneal glucose tolerance test / teste de tolerância à glicose intraperitoneal

IL = Interleucin / interleucina

ITT = Insulin tolerance test / teste de tolerância à insulina

LDL = Low density lipoprotein / lipoproteína de baixa densidade

LPL = Lipase lipoprotéica

MDA = Malondialdeído

NEFA = Nonesterified fatty acid / ácidos graxos não esterificados

NF- $\kappa$ B – Fator nuclear Kappa  $\beta$

PPAR = Peroxisome proliferators activated receptors / receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RNA<sub>m</sub> = Messenger Ribonucleic Acid / ácido ribonucleico mensageiro

ROS = Reactive oxygen species / espécies reativas do oxigênio

RWL = Relative organs weights / peso relativo dos órgãos

SCD = Stearoil – CoA desaturase / estearoil – CoA dessaturase

SOD = Superóxido dismutase

SREBP-1 = Sterol regulatory element binding protein-1

TBARS = Thiobarbituric acid reactive substances / substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF = Tumor necrose factor / fator de necrose tumoral

ZDF = Zucker diabetic fatty rats

## SUMÁRIO

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 1   |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....      | 6   |
| REFERÊNCIAS.....                | 39  |
| CAPÍTULO I.....                 | 57  |
| ARTIGO I.....                   | 58  |
| CAPÍTULO II.....                | 87  |
| ARTIGO II.....                  | 88  |
| CONCLUSÃO GERAL.....            | 111 |
| ANEXOS.....                     | 112 |

## ÍNDICE GERAL

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....                                                                                                                                      | 1  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                                                                           | 6  |
| 2.1 ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA).....                                                                                                                                | 7  |
| 2.1.1 Definição, caracterização e descoberta.....                                                                                                                       | 7  |
| 2.1.2 Síntese biológica e química, consumo humano e fontes alimentares.....                                                                                             | 9  |
| 2.1.3 Efeitos Biológicos do CLA.....                                                                                                                                    | 11 |
| 2.1.3.1 Prevenção de doenças cardiovasculares.....                                                                                                                      | 12 |
| 2.1.3.2 Alteração da composição corporal.....                                                                                                                           | 14 |
| 2.1.3.3 Influência no estresse oxidativo.....                                                                                                                           | 19 |
| 2.1.3.4 Alteração no metabolismo da glicose e insulina.....                                                                                                             | 23 |
| 2.1.3.5 Resposta imune, anti-inflamatória, saúde óssea e hepática.....                                                                                                  | 25 |
| 2.2 FITOSTERÓIS.....                                                                                                                                                    | 26 |
| 2.2.1 Definição, caracterização, alimentos fontes e consumo humano.....                                                                                                 | 26 |
| 2.2.2 Absorção, toxicidade e regulamentação.....                                                                                                                        | 29 |
| 2.2.3 Efeito hipocolesterolêmico dos fitosteróis.....                                                                                                                   | 30 |
| 2.2.3.1 Mecanismo de ação dos fitosteróis.....                                                                                                                          | 32 |
| 2.2.4 Outros efeitos biológicos.....                                                                                                                                    | 35 |
| 2.2.5 Associação entre CLA e fitosteróis.....                                                                                                                           | 38 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                        | 39 |
| CAPÍTULO I.....                                                                                                                                                         | 57 |
| Artigo I: Combination of conjugated linoleic acid with phytosterols reduces adipose tissue without impairment of insulin sensitivity in <i>Sprague Dawley</i> rats..... | 58 |

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abstract.....                                                                                                                         | 58  |
| Introduction.....                                                                                                                     | 59  |
| Materials and Methods.....                                                                                                            | 61  |
| Results.....                                                                                                                          | 67  |
| Discussion.....                                                                                                                       | 76  |
| Conclusion.....                                                                                                                       | 79  |
| References.....                                                                                                                       | 80  |
| CAPÍTULO II.....                                                                                                                      | 87  |
| Artigo II: Antioxidant effects of the combination of conjugated linolenic acid and<br>phytosterols in <i>Sprague Dawley</i> rats..... | 88  |
| Abstract.....                                                                                                                         | 88  |
| Introduction.....                                                                                                                     | 89  |
| Materials and Methods.....                                                                                                            | 91  |
| Results.....                                                                                                                          | 97  |
| Discussion.....                                                                                                                       | 101 |
| Conclusion.....                                                                                                                       | 105 |
| References.....                                                                                                                       | 105 |
| CONCLUSÃO GERAL.....                                                                                                                  | 111 |
| ANEXOS.....                                                                                                                           | 112 |

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

---

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A dieta e a nutrição são fatores que atuam diretamente na promoção e na manutenção de uma boa saúde, em todos os estágios da vida. As mudanças no estilo de vida da população nas últimas décadas, tais como a ingestão de alimentos hipercalóricos, sobretudo ricos em gorduras saturadas, combinados com o declínio do gasto energético associado ao sedentarismo e a fatores de ordem psicossocial, levaram ao aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (GARCÍA-CAÑAS *et al.*, 2010; VELLOSO, 2009).

Na busca por soluções para combater as alterações metabólicas do excesso de peso e as suas complicações, como diabetes mellitus, hipertensão, risco cardiovascular, estresse oxidativo, entre outras, existe um crescente interesse a respeito dos benefícios que a suplementação de componentes funcionais e estruturais dos alimentos, como alguns tipos de lipídios (em especial o ácido linoléico conjugado (CLA) e os fitosteróis), podem proporcionar à população (RACETTE *et al.*, 2010; GAULLIER *et al.*, 2007).

Desde o seu descobrimento no final da década de 70, têm-se atribuído ao CLA, um conjunto de isômeros geométricos e de posição do ácido linoléico, inúmeras propriedades fisiológicas. Algumas destas, como anticarcinogênica, antiaterosclerótica, alteração de perfil lipídico e hormonal, redução da gordura corporal e aumento da massa magra, regulação do balanço energético, modulação do sistema imune, melhora da mineralização óssea, proteção ao estresse oxidativo e prevenção e tratamento do diabetes mellitus estão sendo identificadas e bastante discutidas quando este ácido graxo de cadeia longa é oferecido na forma de suplemento. Como vários desses efeitos biológicos são controversos e ainda questionados em estudos com humanos, são

inúmeras as investigações no sentido de avaliar, também, os efeitos adversos do seu consumo, como causar ou favorecer a resistência à insulina, esteatose hepática e influenciar o processo de autoxidação lipídica *in vivo* (PARK, 2009; BOTELHO *et al.*, 2005; DESROCHES *et al.*, 2005; RISÉRUS *et al.*, 2004; PARIZA *et al.*, 1979).

Outros compostos classificados como lipídios e utilizados no enriquecimento de alguns alimentos são os fitosteróis (esteróis de plantas), presentes principalmente nos óleos vegetais, que podem ser encontrados na forma *in natura*, como esteróis livres ou ligados ao ácido graxo (ésteres). Pesquisas antigas e recentes atribuem aos fitosteróis a capacidade de diminuir a absorção do colesterol no intestino, levando a redução da concentração da fração LDL-colesterol (LDLc), e dessa forma, prevenir a aterosclerose, e consequentemente, o risco de desenvolver doenças cardiovasculares. Apesar da grande maioria das pesquisas estudarem o efeito hipocolesterolêmico dos fitosteróis, outras propriedades biológicas também são atribuídas a esses compostos, como a redução do risco de certos tipos de câncer, atividade anti-inflamatória, antidiabetogênica e antioxidante (RACETTE *et al.*, 2010; CALPE-BERDIEL *et al.*, 2008; AWAD *et al.*, 2008; FUHRMAN *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2006; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; BOUIC, 2001; LING; JONES, 1995).

Visto que as substâncias citadas têm comprovado efeito biológico e por isso podem beneficiar o estado de saúde da população, seja via suplementação ou por enriquecimento de alimentos, supõe-se que a interação entre CLA e fitosteróis melhore ou potencialize os seus efeitos fisiológicos isolados, atuando na composição corporal, na regulação dos níveis de lipoproteínas séricas e proporcione a redução dos efeitos adversos causados pelo CLA, como a autoxidação lipídica, esteatose hepática, atividade pró-oxidante e resistência à insulina por meio da melhor absorção dos fitosteróis pelo organismo, já que a união deste a um ácido graxo de cadeia longa aumenta sua

solubilidade em óleos e gorduras, mantendo sua eficiência mesmo em baixas doses (PARK, 2009; JANSEN *et al.*, 2006; BHATTACHARYA *et al.*, 2006; NTANIOS *et al.*, 2003; COULTATE, 2002).

Portanto, como ainda não existem estudos científicos que comprovem ou descartem tais hipóteses, o objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar os possíveis efeitos causados pela associação da suplementação de CLA e de fitosteróis sobre o consumo, ganho de peso, composição corporal, perfil lipídico e hormonal, resistência à insulina e oxidação lipídica em modelo animal, para fornecer mais subsídios à introdução destes compostos na dieta habitual da população (via suplemento ou enriquecimento de alimentos), como coadjuvante na prevenção e no controle de inúmeras desordens metabólicas crônicas. A partir disso, foram enfocados neste trabalho, os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a composição centesimal das dietas experimentais;
- Determinar a composição em ácidos graxos e em fitosteróis dos suplementos (CLA, óleo de cártamo, óleo de soja e fitosterol);
- Determinar os indicadores de autooxidação lipídica dos suplementos e das dietas experimentais;
- Avaliar e monitorar o consumo de dieta e ganho de peso dos animais;
- Determinar a composição corporal dos animais;
- Determinar o perfil lipídico (colesterol total, triacilgliceróis, HDL-colesterol e ácidos graxos livres séricos), hormonal (insulina, leptina, adiponectina e grelina séricas) e glicose sérica dos animais;
- Determinar o grau de resistência à insulina pelo Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e pelo Teste de Tolerância à Insulina (ITT), dos animais;

- Determinar as concentrações plasmáticas dos produtos da oxidação lipídica, malondialdeído, 8-isoprostana, glutathione total e de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase e catalase), dos animais;
- Quantificar o teor lipídico e os marcadores da oxidação lipídica, índice de peróxidos e malondialdeído, no fígado dos animais;
- Quantificar o teor lipídico das fezes dos animais.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

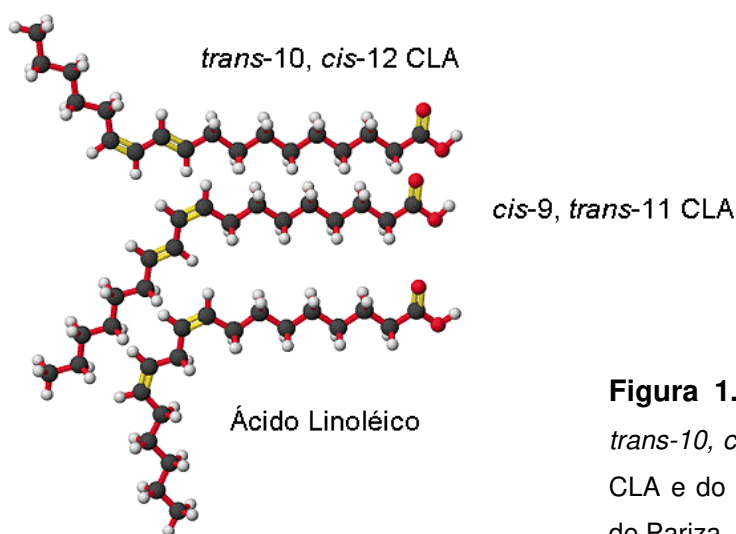
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA)

#### 2.1.1 Definição, caracterização e descoberta

O ácido linoléico conjugado (CLA) corresponde a uma série de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienóico (ácido linoléico, 18:2  $\omega$ -6), com duplas ligações conjugadas, ou seja, separadas somente por uma ligação simples carbono-carbono, sendo estas iniciadas, predominantemente, nos carbonos 9, 10 ou 11. Essas configurações podem ser do tipo *cis* ou *trans*, enquanto o ácido linoléico existe apenas na configuração *cis* (BHATTACHARYA *et al.*, 2006; CHOUINARD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999).

Este composto é encontrado em pequenas quantidades e em diversos alimentos, principalmente, na carne bovina, ovina, leite e derivados, e estima-se a existência de 56 possíveis isômeros, sendo o *cis-9, trans-11* (ácido rumênico) o mais abundante na natureza, correspondente a 80% dos isômeros, o qual tem sido reportado por sua ação anticarcinogênica e antioxidante (PARIZA; HA, 1990). Outro isômero que também possui atividade identificada é o *trans-10, cis-12* e está relacionado, principalmente, ao metabolismo energético (FUENTE; LUNA; JUÁREZ, 2006; PARK *et al.*, 1997) (Figura 1).

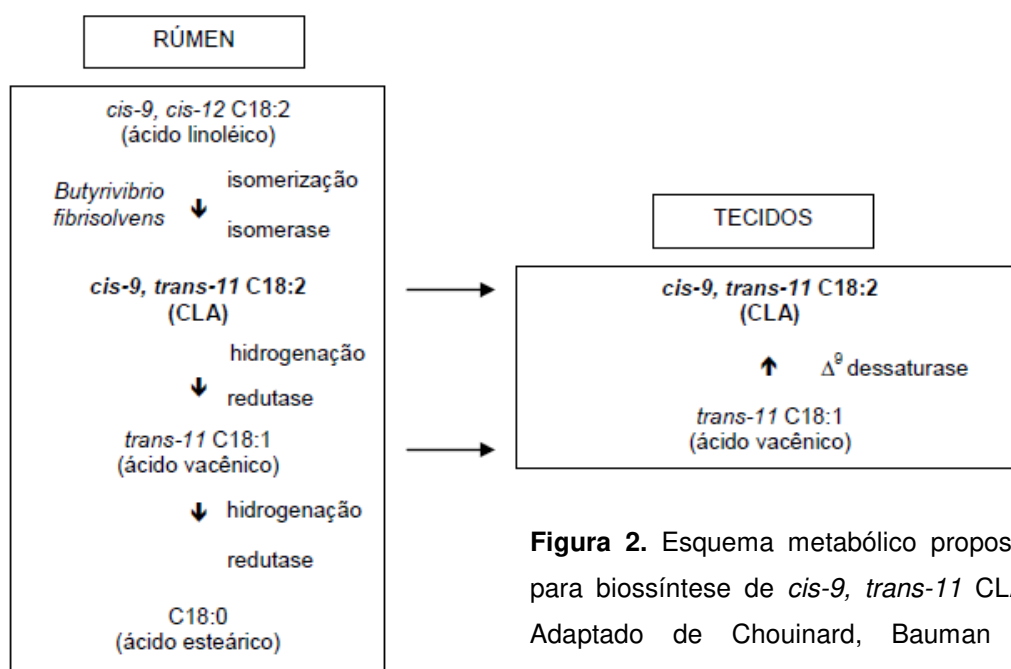


**Figura 1.** Estrutura dos isômeros *trans-10, cis-12 CLA*; *cis-9, trans-11 CLA* e do Ácido linoléico. Adaptado de Pariza, Park e Cook, 2001.

Desde seu descobrimento, no final da década de 70, em que Pariza e colaboradores após diversos estudos confirmaram a existência de substâncias com atividade antimutagênica (além das mutagênicas) no extrato de carnes grelhadas, a partir da caracterização de isômeros derivados do ácido linoléico que continham um sistema de dupla ligação conjugada (CLA) (HA; GRIMM; PARIZA, 1987; PARIZA *et al.*, 1983; PARIZA *et al.*, 1979), inúmeros estudos utilizando diferentes modelos experimentais têm atribuído ao CLA outros efeitos biológicos positivos à saúde humana, como a redução da aterosclerose, prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2, modulação do sistema imune, potencialização da mineralização óssea, alteração da composição corporal (redução da massa gorda e aumento da massa magra), entre outros. Entretanto, alguns destes efeitos são bastante contraditórios e vem sendo discutidos como adversos devido à suplementação deste composto, como a resistência à insulina, esteatose hepática, autooxidação de lipídios biológicos e atividade pró-oxidante (REYNOLDS; ROCHE, 2010; PARK, 2009; SEBEDIO; GNAEDIG; CHARDIGNY, 1999).

### 2.1.2 Síntese biológica e química, consumo humano e fontes alimentares

O CLA pode ser originado no rúmen de animais por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta, envolvendo a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*. Neste processo, o isômero *cis-9, trans-11* (ácido rumênico) é o primeiro intermediário formado a partir do ácido linoléico pela  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{11}$  *trans* isomerase, esse ácido graxo pode sofrer ação de uma redutase, originando a saturação da dupla ligação *cis-9* e, assim, formar o ácido vacênico (C18:1 *trans-11*) ou pode ser absorvido e incorporado aos tecidos a partir da dessaturação deste mesmo ácido graxo (C18:1 *trans-11*) por ação da enzima  $\Delta^9$  dessaturase, onde ocorre a incorporação de uma dupla ligação *cis* na posição 9, (originando o isômero *cis-9, trans-11* CLA). Dessa maneira, estudos mostram que 90% deste isômero está presente na gordura do leite de ruminantes, proveniente da atividade desta enzima (MARTIN; JENKINS, 2002; CORL *et al.*, 2001; GRIINARI *et al.*, 2000; CHOUIRNAD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999) (Figura 2).



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

Além da produção endógena, a síntese química do CLA também pode ocorrer a partir do ácido linoléico (C18:2  $\omega$ -6) de óleos de cártamo e girassol sob condições alcalinas, originando produtos com diferentes composições de ácidos graxos. Tal processo industrial varia de acordo com a fonte da matéria-prima utilizada e com as condições de isomerização (PARIZA; PARK; COOK, 2001; PARK *et al.*, 2000; CHOUINARD; BAUMAN; BAUMGARD, 1999). Dessa forma, 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).

O conteúdo natural de CLA nos alimentos varia de forma considerável e é dependente de diversos fatores, incluindo condições climáticas, estado nutricional, idade e raça do animal, assim como as condições de obtenção e manipulação dos produtos (DHIMAN; NAM; URE, 2005; ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003). No entanto, devido à escassez de informações disponíveis sobre o conteúdo deste composto nos alimentos, torna-se difícil determinar, de forma exata, o seu consumo dietético pela população. Segundo o estudo de Ritzenthaler e colaboradores (2001) a média de ingestão total de CLA (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) para homens e mulheres, não vegetarianos, é de aproximadamente 212 e 152mg/dia, respectivamente, valores estes distantes da ingestão recomendada pelos pesquisadores (3 g/dia) para que se observe efeito benéfico (STANTON *et al.*, 1997) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Conteúdo de CLA (mg/g de gordura) e porcentagem do isômero *cis-9, trans-11* em alguns alimentos.

| <b>Alimento</b>           | <b>Total de CLA<br/>(mg/g de gordura)</b> | <b>Isômero <i>c9, t11</i><br/>(%)</b> |
|---------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| Leite semi-desnatado (2%) | 4,1                                       | 92                                    |
| Manteiga                  | 4,7                                       | 88                                    |
| Iogurte natural           | 4,8                                       | 84                                    |
| Queijo mussarela          | 4,9                                       | 95                                    |
| Queijo cottage            | 4,5                                       | 83                                    |
| Requeijão                 | 4,5                                       | nd                                    |
| Sorvete                   | 3,6                                       | nd                                    |
| Carne bovina              | 4,3                                       | 85                                    |
| Carne ovina               | 5,6                                       | 92                                    |
| Carne suína               | 0,6                                       | 82                                    |
| Carne de frango           | 0,9                                       | 84                                    |
| Salmão                    | 0,3                                       | nd                                    |
| Gema de ovo               | 0,6                                       | nd                                    |
| Óleo de girassol          | 0,4                                       | 38                                    |

nd: não detectado.

Adaptado de Gómez (2004) e Chin *et al.* (1992).

### 2.1.3 Efeitos Biológicos do CLA

O cenário atual das pesquisas com CLA estimula a comunidade científica a buscar um consenso sobre seus efeitos benéficos e adversos, seja em modelos animais ou em humanos. Dentre as propriedades biológicas, mais estudadas, atribuídas a este composto, além da anticarcinogênica, podem-se destacar:

### 2.1.3.1 Prevenção de doenças cardiovasculares

Tem sido relatada a capacidade deste composto em reduzir o risco de cardiopatias, seja de forma indireta, por meio do controle de fatores de risco associados (diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e dislipidemia), ou direta, por meio da redução de fatores pró-inflamatórios. A redução de lesões ateroscleróticas em coelhos e hamsters (KRITCHEVSKY *et al.*, 2004; LEE; PARIZA; NTAMBI, 1998; NICOLOSI *et al.*, 1997), e a diminuição de triacilgliceróis, colesterol total, LDL-colesterol (LDL-c) e aumento do HDL-colesterol (HDL-c) séricos em diversos modelos animais, também são atribuídas a suplementação com os isômeros do CLA (HALADE; RAHMAN; FERNANDES 2010; ANDREOLI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2008; NOTO *et al.*, 2006; BHATTACHARYA *et al.*, 2006; MCLEOD *et al.*, 2004; KRITCHEVSKY *et al.*, 2000). Porém, alguns estudos em humanos mostram pouca ou nenhuma interferência nas concentrações de lipídios séricos e das lipoproteínas durante sua suplementação (NAUMANN *et al.*, 2006; TRICON *et al.*, 2004; PETRIDOU; MOUGIOS; SAGREDOS, 2003; SMEDMAN; VESSBY, 2001).

É discutido que o CLA afeta tais parâmetros por meio da redução da pressão sanguínea, ou pelo envolvimento de receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR, fundamental para a lipogênese), da enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD) (essencial para a formação de colesterol e triacilgliceróis) e do elemento regulador SREBPs (Sterol regulatory element binding protein-1) (chave na síntese de ácido graxo) (BHATTACHARYA *et al.*, 2006; PETERSON; MATITASHVILI; BAUMAN, 2004; CHOI *et al.*, 2001). Além disso, seu efeito antiaterogênico poderia ser explicado pela ação deste composto na inibição da cicloxigenase, modificação do metabolismo de lipídios hepáticos e da atividade anti-inflamatória (BELURY, 2002).

Alguns estudos em animais que investigaram os efeitos da suplementação dos isômeros do CLA em proporções iguais (*cis-9*, *tras-11* e *trans-10*, *cis-12*), correspondendo a 0,1-5% da ingestão dietética, relataram consistentemente que o CLA inibiu a aterogênese (MITCHELL; MCLEOD, 2008), e alguns, mas não todos, encontraram melhora dos marcadores do risco cardiovascular (BHATTACHARYA *et al.*, 2006). No entanto, os efeitos divergentes dos isômeros têm sido reportados, sendo o isômero *cis-9*, *trans-11* (1,0-2,1%) ativo na inibição da aterogênese e na melhora do perfil lipídico (ARBONES-MAINAR *et al.*, 2006; ROOS *et al.*, 2005). Enquanto em seres humanos, tal isômero parece não ter efeito significativo sobre os marcadores do risco cardiovascular, como lipídios sanguíneos (SLUIJS *et al.*, 2010; RISÉRUS *et al.*, 2004), marcadores inflamatórios (NAUMANN *et al.*, 2006; RISÉRUS *et al.*, 2004) e na pressão sanguínea (SLUIJS *et al.*, 2010).

Entretanto, os efeitos deste composto no decréscimo da pressão sanguínea, mas não da agregação plaquetária, também foram relatados (IWATA *et al.*, 2007; WHIGHAM *et al.*, 2004), assim como diversos estudos que não encontraram nenhuma alteração no perfil lipídico em animais (PARRA; SERRA; PALOU, 2010; COOPER *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2004).

Apesar de contraditórios, estudos realizados com a administração de CLA por meio de ensaio biológico e clínico, têm demonstrado um possível efeito antiaterogênico deste ácido graxo, sendo que os mecanismos para tal efeito ainda não estão totalmente esclarecidos (STACHOWSKA *et al.*, 2005; PETRIDOU; MOUGIOS; SAGREDOS, 2003; MOUGIOS *et al.*, 2001).

### 2.1.3.2 Alteração da composição corporal

Diversos estudos realizados em animais experimentais e em humanos vêm demonstrando a capacidade do CLA em reduzir a gordura corporal (WHIGHAM; WATRAS; SCHOELLER, 2007; PARK; PARIZA, 2007; GAULLIER *et al.*, 2007; 2005; BOTELHO *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 1999; 1997) e aumentar a massa magra (STECK *et al.*, 2007; BHATTACHARYA *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 1999; 1997), seja por meio do consumo de alimentos enriquecidos ou da sua suplementação. Existem evidências de que o isômero *trans-10, cis-12* seja o responsável pelas alterações na composição corporal (PARK; PARIZA, 2007; PARK *et al.*, 1999).

Diversos mecanismos são propostos para explicar tais alterações ocasionadas pelo consumo de CLA, os quais são: redução da ingestão alimentar pela supressão do apetite, aumento do gasto energético, aumento da lipólise e diminuição da lipogênese, alteração da atividade das enzimas relacionadas à síntese e oxidação de ácidos graxos, diminuição da proliferação e diferenciação de pré-adipócitos, modificação da concentração de proteínas reguladoras do consumo alimentar, alteração da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, modulação de adipocinas e citocinas, entre outros (KENNEDY *et al.*, 2010; SO; TSE; LI, 2009; PARK; PARIZA, 2007; CAO *et al.*, 2007).

Inúmeras proteínas envolvidas na lipogênese, como a lipase lipoprotéica (LPL), acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e SCD, estão diminuídas tanto na suplementação do isômero *trans-10, cis-12* isolado, quanto na administração da mistura de isômeros do CLA (LAROSA *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2004; 2003). Acredita-se que a diminuição da atividade da LPL possa restringir os ácidos graxos disponíveis capazes de serem ressintetizados a triacilgliceróis, e assim, reduzir a deposição lipídica

(PARIZA; PARK; COOK, 2001). Alguns estudos mostram a redução da atividade dessa enzima em culturas de adipócitos 3T3-L1 quando estas foram tratadas com CLA (BOTELHO; SANTOS-ZAGO; OLIVEIRA, 2009; PARK *et al.*, 1999). As enzimas ACC e FAS também apresentaram alterações frente à suplementação com este composto, como pode ser observado no estudo de Tsuboyama-Kasaoka e colaboradores (2000) que quantificaram o RNAm para ACC e FAS em camundongos alimentados com 1% de CLA por 5 meses, estes animais apresentaram redução de 72% e 88% dos níveis de RNAm dessas enzimas, respectivamente.

O PPAR $\gamma$ , principal ativador de genes lipogênicos e importante fator de transcrição envolvido na adipogênese, tem sua atividade inibida principalmente pelo isômero *trans-10, cis-12*, como observado em diversos estudos, sendo esta uma das explicações para o efeito antilipogênico deste isômero (KENNEDY *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2002; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000).

Os pré-adipócitos são células capazes de proliferar-se facilmente, sendo este um dos mecanismos responsáveis por aumentar a deposição de gordura nos tecidos (BELURY, 2002). Diversas pesquisas foram realizadas considerando que a diminuição da proliferação dos pré-adipócitos, por suplementação com CLA, pode causar diminuição do número de células capazes de armazenar lipídios, e consequentemente, reduzir o tecido adiposo (PARIZA; PARK; COOK, 2000; EVANS *et al.*, 2000; SATORY; SMITH, 1999). Do mesmo modo, a diminuição do tamanho destas células também contribui para a redução do tecido adiposo. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que pré-adipócitos 3T3-L1 suplementados com CLA diminuem o conteúdo de triacilgliceróis, e consequentemente, o tamanho dos adipócitos (BROWN; EVANS; MCINTOSH, 2001; AZAIN *et al.*, 2000; EVANS *et al.*, 2000).

Outros achados indicam que o consumo dietético de CLA induz o aumento da oxidação dos ácidos graxos, o que também contribui para a diminuição do tamanho dos adipócitos (EVANS; BROWN; MCINTOSH, 2002; SAKONO *et al.*, 1999). A carnitina palmitoiltransferase (CPT) é a enzima responsável pelo transporte inicial de ácidos graxos para o interior da mitocôndria para serem oxidados (enzima chave na  $\beta$ -oxidação). Rahman e colaboradores (2001) observaram aumento na atividade da CPT no fígado, no tecido adiposo e muscular de ratos que foram suplementados com CLA.

O aumento do gasto energético por meio da elevação da taxa de metabolismo basal, da termogênese e da oxidação lipídica em animais é também reportado como outro mecanismo capaz de diminuir a deposição de gordura em espécies tratadas com CLA (TERPSTRA *et al.*, 2002; RYDER *et al.*, 2001; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; WEST *et al.*, 2000).

O tecido adiposo também é capaz de secretar inúmeros fatores regulatórios. A leptina, por exemplo, é um hormônio sintetizado pelos adipócitos e secretado no plasma, que regula o apetite e o gasto de energia, via sistema hipotalâmico. A quantidade de leptina produzida e sua concentração plasmática são dependentes do conteúdo da gordura corporal e da ingestão de alimentos, estando aumentada no período pós-prandial (HERMSDORFF; VIEIRA; MONTEIRO, 2006; ROMERO; ZANESCO, 2006; ROSADO *et al.*, 2006). Vários estudos têm mostrado, *in vitro* e *in vivo*, que o CLA causa um efeito inibitório importante na expressão gênica e secreção da leptina acompanhado da redução do acúmulo de gordura em diferentes modelos experimentais (HALADE; RAHMAN; FERNANDES 2010; PARRA; SERRA; PALOU, 2010; ZHOU *et al.*, 2008; BOTELHO; SANTOS-ZAGO; OLIVEIRA, 2008; PÉREZ-MATUTE *et al.*, 2007; AHN *et al.*, 2006; YAMASAKI *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2001).

A adiponectina é uma proteína de 247 aminoácidos, também secretada pelo tecido adiposo. Esse hormônio desempenha, em seres humanos e animais, um papel importante na regulação da obesidade, modulação do metabolismo de glicose e lipídios em tecidos sensíveis à insulina, protegendo contra desordens metabólicas e inflamação, e também aumenta a ação da insulina, promovendo proteção à resistência deste hormônio. Os níveis circulantes de adiponectina são negativamente correlacionados com a gordura corporal e circunferência da cintura, estando diminuídos em indivíduos obesos (LAGO *et al.*, 2009; VÁZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008). Assim como diferentes classes de ácidos graxos são capazes de induzir a secreção de adiponectina (SCHAEFFLER *et al.*, 2008; COLL; FAROOQI; O'RAHILLY, 2007; MATSUZAWA *et al.*, 2004), a ingestão de CLA também exerce influência nos níveis secretados desse hormônio, mas ainda sem resultados conclusivos (MILLER *et al.*, 2008; PÉREZ-MATUTE *et al.*, 2007).

Alguns estudos têm reportado aumento na expressão e concentração sérica de adiponectina em ratos Zucker diabéticos alimentados com uma mistura de isômeros de CLA (1,0%) (NAGAO *et al.*, 2003), e um aumento na secreção deste hormônio em culturas de adipócitos 3T3-L1 tratados com o isômero *cis-9, trans-11* (AHN *et al.*, 2006). Porém, outros estudos têm mostrado que o CLA diminui a produção de adiponectina em camundongos (PARRA; SERRA; PALOU, 2010; COOPER *et al.*, 2008), enquanto em humanos, pouco ou nenhum efeito da suplementação com CLA, nos níveis de adiponectina, tem sido observado (GAULLIER *et al.*, 2007).

A grelina, outra adipocina composta por 28 aminoácidos, sintetizada e secretada principalmente pelas células oxínticas da mucosa do estômago, tem sido estudada quanto a sua ação reguladora sobre a secreção de insulina e metabolismo de glicose, além das funções biológicas relacionadas ao controle do apetite e da fome. Estudos em modelos animais indicam que esse hormônio orexígeno, desempenha

importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético, além disso, mostram que são os tipos de nutrientes presentes na refeição, e não o seu volume, os responsáveis pelo aumento ou decréscimo pós-prandial dos níveis plasmáticos de grelina (VOTRUBA *et al.*, 2009; ERDMANN *et al.*, 2004; NAKAZATO *et al.*, 2001), porém estudos avaliando esta adipocina após a suplementação com CLA ainda são escassos. Deste modo, podemos dizer que os hormônios relatados regulam o balanço energético, e são relevantes nos mecanismos de manutenção do peso corporal e prevenção da obesidade (ROMERO; ZANESCO, 2006).

Apesar de muitos destes trabalhos terem apresentado resultados benéficos com o uso de suplementos de CLA, algumas pesquisas apontam dados contraditórios e não conclusivos sobre a redução de peso e alteração na composição corporal (DESROCHES *et al.*, 2005; TRICON *et al.*, 2005; PETRIDOU; MOUGIOS; SAGREDOS, 2003; ZAMBELL *et al.*, 2000). Tal diferença observada entre os ensaios biológicos e clínicos pode ser explicada por diferentes isômeros utilizados, a dose administrada de CLA, além da idade, peso, gordura corporal ou estado metabólico dos animais e humanos (KENNEDY *et al.*, 2010).

Em humanos, o teor administrado de CLA (1,4-4,2g/dia) é muito inferior as doses equivalentes utilizadas em animais experimentais, devido aos efeitos adversos relatados, com exceção do estudo de Wanders e colaboradores (2010) que a partir do enriquecimento de alimentos (margarina, pães e iogurtes) com uma mistura dos isômeros *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* CLA (80:20), verificou que a ingestão diária de 19,3g desse composto (aproximadamente 7% da ingestão energética diária), durante 3 semanas, não causou efeitos clínicos relevantes na função hepática e renal, em 19 sujeitos saudáveis.

Neste sentido, são necessários mais estudos objetivando investigar a suplementação de CLA na redução da gordura corporal, principalmente em longo prazo, para determinar o tempo mais adequado de tratamento e a dose necessária para atingir efeitos benéficos, visto ser esta propriedade fisiológica desejada pela população que busca o consumo desse ácido graxo conjugado como um coadjuvante na melhora da qualidade de vida (SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008).

### **2.1.3.3 Influência no estresse oxidativo**

O efeito deste composto sobre o processo de autooxidação lipídica vem sendo bastante estudado nos últimos anos, com resultados conflitantes, os quais ainda não permitem conclusões a respeito de sua ação antioxidante. A presença de duplas ligações na configuração *trans* em isômeros do CLA contribui para a estabilidade do mesmo à oxidação, se comparada ao ácido linoléico. Entretanto, ao se considerar que a conjugação das duplas ligações é um dos primeiros passos da autooxidação lipídica, e que a partir daí se iniciam as reações em cadeia do processo oxidativo, o CLA poderia atuar como pró-oxidante (SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008).

A peroxidação lipídica é considerada um processo celular básico de deterioração induzida pelo estresse oxidativo e ocorre nos tecidos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, podendo levar a lesão e morte tecidual, provocando doenças em organismos vivos, como câncer, doença cardiovascular e neurodegenerativas (HALLIWELL, 1994). Durante o processo de peroxidação lipídica o hidroperóxido é produzido como produto primário e o TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) ou MDA (malondialdeído), como produto secundário da autooxidação lipídica, os quais são

utilizados como indicadores do estresse oxidativo celular em diversas pesquisas (YAMASAKI *et al.*, 2000).

Outros parâmetros também são avaliados, como eicosanóides resultantes da oxidação pela via enzimática e não enzimática, como 15-ceto-dihidroPGF<sub>2</sub>, 8-iso-PGF<sub>2α</sub>isoprostana, respectivamente; além da avaliação da atividade biológica dos sistemas enzimáticos de proteção à oxidação e de reparo aos danos causados por tal processo como, a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) (YAMASAKI *et al.*, 2000; CANTWELL *et al.*, 1999; VAN DEN BERG, COOK, TRIBBLE, 1995).

A partir da década de 90, os pesquisadores começaram a afirmar que o CLA aumenta o estresse oxidativo em sistemas biológicos, atuando como pró-oxidante em modelos animais e em humanos (RISÉRUS *et al.*, 2004; YAMASAKI *et al.*, 2000; BASU, SMEDMAN; VESSBY, 2000).

Diversos estudos com o objetivo de avaliar a autooxidação lipídica, em modelos experimentais e ensaios clínicos, utilizaram como indicador da oxidação dos lipídios biológicos pela via não enzimática, o eicosanóide da série F denominado 8-iso-PGF<sub>2α</sub>isoprostana que é considerado um indicador bastante específico para avaliar o grau de estresse oxidativo em diversos modelos animais. Basu, Smedman e Vessby (2000) suplementaram indivíduos saudáveis com CLA por 12 semanas, e encontraram valores de 8-isoprostana urinárias e plasmáticas significativamente maiores nos grupos suplementados quando comparadas ao grupo controle, sugerindo que o CLA induz a peroxidação lipídica em humanos. Risérus e colaboradores (2004) suplementaram indivíduos obesos por um período de 12 semanas (3g/dia) com uma mistura dos isômeros de CLA, contendo predominantemente o isômero *cis-9, trans-11*. Foi encontrada uma concentração 50% maior de 8-isoprostana urinária após a suplementação com o isômero

em questão, quando comparado ao placebo, indicando que a oxidação lipídica esteve aumentada não somente pelo isômero *trans-10, cis-12*, mas também pelo *cis-9, trans-11*.

Em estudo realizado com ratos *Sprague Dawley* suplementados com 1 % e 2 % de CLA em relação à dieta (YAMASAKI *et al.*, 2000), foi observado um aumento significativo na concentração hepática de produtos primários e secundários da oxidação lipídica, como os hidroperóxidos e TBARS, respectivamente, o que levou os autores a afirmar que o CLA agiu como pró-oxidante.

Também é discutido o fato de a suplementação com CLA influenciar o processo de oxidação lipídica em roedores, sendo a atividade pró ou antioxidante dependente do tipo, concentração e dose em que é administrado (SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008; FLINTOFF-DYE; OMAE, 2005; AKAHOSHI *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados já citados, estudos de diversos grupos de pesquisa (MOON *et al.*, 2009; SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2009; 2007; ARAB *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2005; CANTWELL *et al.*, 1999; IP *et al.*, 1991) têm demonstrado a atividade antioxidante do CLA. Um dos primeiros estudos de avaliação das propriedades antioxidantes deste composto foi o de Ip e colaboradores (1991) que suplementaram ratos *Sprague Dawley* com diferentes concentrações de CLA (0,25 a 1,5%) durante 1 mês. A avaliação da ação antioxidante foi feita por meio da determinação da quantidade de TBARS no fígado e glândula mamária dos animais. Os autores confirmaram a ação antioxidante do CLA, que não foi diferente em decorrência da concentração. Cantwell e colaboradores (1999) demonstraram que este composto, em concentrações fisiológicas, não propicia a oxidação lipídica em hepatócitos normais de ratos e, portanto, não poderia ser considerado como um agente pró-oxidante.

Kim e colaboradores (2005) demonstraram que a suplementação com 1,5 % de mistura de CLA em relação à dieta em ratos *Sprague Dawley* reduziu

significativamente a concentração hepática de TBARS e, também, a atividade da enzima antioxidante SOD, aumentou a atividade de GPx, sem alterar a atividade de CAT e a concentração de TBARS no plasma, permitindo concluir que o CLA atuou como um antioxidante.

Outro achado de extrema importância nesse contexto é o de Arab e colaboradores (2006), que demonstraram em fibroblastos humanos que o contato durante 7 dias com o isômero *cis-9, trans-11* de CLA foi o único, em comparação com outros 7 ácidos graxos poliinsaturados, que aumentou de forma significativa a síntese de glutatona sem nenhuma alteração no balanço oxidativo celular.

Recentemente, Santos-Zago, Botelho e Oliveira (2009; 2007) analisaram a oxidação lipídica em ratos, sendo que os indicadores MDA sérico e atividade sérica da CAT mostraram que o CLA pode atuar como um agente antioxidante, enquanto os valores do eicosanóide 8-isoprostana e de peróxidos hepáticos mostraram uma potencial atividade pró-oxidante.

Portanto, podemos dizer que os efeitos desse suplemento no estresse oxidativo são contraditórios e ainda não existe um consenso sobre sua ação no processo de oxidação dos lipídios biológicos, já que muitos resultados apontam para as propriedades antioxidantes, enquanto outros a um possível efeito pró-oxidante deste composto. Flintoff-Dye e Omaye (2005) mostraram que o CLA atuou como pró-oxidante, antioxidante e, posteriormente como pró-oxidante conforme foram aumentados os níveis de enriquecimento do composto *in vitro*. O aparente efeito paradoxal dos isômeros do CLA é intrigante, no entanto, tal efeito pode ser um exemplo da hormese, segundo os autores do estudo.

Diante das divergências encontradas em relação ao efeito do CLA no estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro*, é indispensável que se estude exaustivamente a atuação deste

composto nos processos de oxidação lipídica, a fim de esclarecer o efeito benéfico ou adverso para esta propriedade e evitar, então, riscos à saúde da população que poderia consumir tal suplemento (SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008).

#### **2.1.3.4 Alteração no metabolismo da glicose e insulina**

A ação do CLA sobre a inibição da entrada de glicose nos adipócitos, por sua capacidade de inibir a atividade do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4), pode levar à alteração no metabolismo deste hormônio e causar situações de hiperinsulinemia e hiperglicemia (KANG *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2002).

Além deste mecanismo, 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 que, por sua vez, está relacionado com a resistência à insulina local e geral, propiciando o desenvolvimento de diabetes lipoatrófica (SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008). Tal situação já foi observada em camundongos (CLÉMENT *et al.*, 2002; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000) e em humanos (PETRIDOU; MOUGIOS; SAGREDOS, 2003; RISÉRUS *et al.*, 2004; 2002).

Dessa forma, a suplementação com CLA tem sido constantemente mencionada, na literatura, como indutora da resistência à insulina em animais e humanos (SIMÓN *et al.*, 2006; WANG; JONES, 2004), possivelmente pela ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual regula a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como TNF (fator de necrose tumoral) e interleucinas (IL-6 e IL-8), explicaria o aumento da sensibilidade à insulina. Essas citocinas pró-inflamatórias seriam as responsáveis pela redução da expressão do transportador GLUT4 e pela inibição da

atividade do receptor de insulina, caracterizando o quadro de sensibilidade ao hormônio (CHUNG *et al.*, 2005; RISÉBUS *et al.*, 2004).

Entretanto, outros estudos como os de Roos e colaboradores (2005) e de Choi e colaboradores (2004) discutem os mecanismos que explicam a melhora da resistência à insulina, particularmente pelo isômero *cis*-9, *trans*-11, devido ao aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo e no fígado e a elevação do gasto energético. Halade, Rahman e Fernandes (2010) também observaram normalização da tolerância à glicose e diminuição dos ácidos graxos livres circulantes após a suplementação de uma mistura de isômeros de CLA em ratas da linhagem Zucker. Corroborando com esses achados, outros grupos de pesquisa também encontraram resultados positivos, ou seja, a melhora da tolerância à glicose e da resistência à insulina em ratos e humanos (ZHOU *et al.*, 2008; NAGAO *et al.*, 2003; TEACHEY *et al.*, 2003; BELURY; MAHON; BANNI, 2003), enquanto outros trabalhos reúnem dados que levam a conclusão de que ambos os isômeros de CLA não apresentam efeitos adversos sobre as concentrações plasmáticas de glicose e insulina e sobre a sensibilidade à ação da insulina (PARRA; SERRA; PALOU 2010; TAYLOR *et al.*, 2006; TRICÓN *et al.*, 2004).

Diante destes resultados, pode-se dizer que a relação entre o consumo de CLA e a sensibilidade à insulina depende da espécie estudada e do estado metabólico em questão, não havendo um consenso sobre a real atuação deste composto sobre os mecanismos de ação citados anteriormente, assim sendo, pesquisas mais abrangentes devem ser realizadas buscando elucidar o efeito deste composto tanto em indivíduos saudáveis, como em portadores de diabetes mellitus tipo 2 (HARGRAVE *et al.*, 2003).

### 2.1.3.5 Resposta imune, anti-inflamatória, saúde óssea e hepática

É importante ressaltar que também existem outras propriedades biológicas atribuídas a este composto. Algumas pesquisas mostram que o CLA pode alterar as respostas imunes e inflamatórias, 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). Propriedades anti-inflamatórias do CLA foram relatadas, como a redução da inflamação do cólon, modulação da produção de citocinas, leucotrienos e prostaglandinas, estando a melhora da resposta imune relacionada, principalmente, à regulação dos PPARs e à modulação do TNF- $\alpha$ , que por sua vez, seria capaz de alterar o efeito dos eicosanoides (PARK, 2009; BHATTACHARYA *et al.*, 2006).

Apesar do CLA estar sendo reportado pela potencialização da mineralização óssea, indicada pela modificação do peso de cinzas corporais, densidade óssea, conteúdo mineral ósseo, cálcio, magnésio ou fosfato, os efeitos da suplementação deste composto sobre o conteúdo de cinzas e massa óssea corporal ainda são controversos (KELLY; CASHMAN, 2004; PARK *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1997). Recentemente, foi relatado que a inconsistência da ação deste suplemento na massa óssea, pode ser dada, pelo menos em parte, pela interação entre CLA e o conteúdo de cálcio da dieta (PARK; PARIZA; PARK, 2008). Além disso, alguns estudos têm mostrado que a suplementação com CLA reduz a atividade dos osteoclastos, diminuindo a reabsorção óssea, enquanto outros não relataram efeitos sobre os marcadores da reabsorção óssea (PARK, 2009).

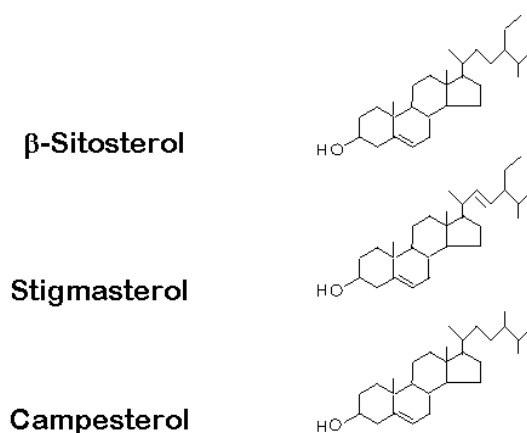
Existem resultados controversos na literatura de que o CLA, particularmente o isômero *trans-10, cis-12*, causa hipertrofia do fígado acompanhado pelo aumento do conteúdo lipídico no tecido e esteatose hepática em animais (HALADE; RAHMAN;

FERNANDES 2010; ANDREOLI *et al.*, 2009; CLÉMENT *et al.*, 2002; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000;), enquanto algumas investigações, utilizando diferentes modelos experimentais, não encontraram diferença no peso do fígado ou nos lipídios hepáticos (PARRA; SERRA; PALOU, 2010; RAHMAN *et al.*, 2001) e outros encontraram diminuição da esteatose hepática, melhora da função e favorecimento do metabolismo lipídico neste órgão (PURUSHOTHAM *et al.*, 2007; NOTO *et al.*, 2006).

## **2.2 FITOSTERÓIS**

### **2.2.1 Definição, caracterização, alimentos fontes e consumo humano**

Os fitosteróis, ou esteróis de plantas, classificados como importantes componentes das células vegetais, são derivados do esqualeno e formam o grupo de triterpenos, contendo, em sua maioria, 28 ou 29 átomos de carbono e uma ou duas ligações duplas carbono-carbono, o que contribui para a imensa variedade desses compostos na natureza, onde mais de 250 moléculas já foram identificadas. Dentre os fitosteróis mais comuns, estão o  $\beta$ -sitosterol (C-29), o campesterol (C-28), e o stigmasterol (C-29), contribuindo com 98% da ingestão dietética em humanos, sendo o  $\beta$ -sitosterol o mais abundante (Figura 3) (FERNANDEZ; VEGA-LOPEZ, 2005; BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004; LING; JONES, 1995).



**Figura 3** - Estrutura química de alguns fitosteróis. Adaptado de Awad e Fink (2000).

Entre as fontes alimentares de fitosteróis, destacam-se os óleos vegetais, sementes, nozes, castanhas e vegetais em geral (RYAN *et al.*, 2007; MORTON *et al.*, 1995), podendo estar presente em diferentes formas nos alimentos (livre, esterificado a ácidos graxos, glicosídeos ou ácidos fenólicos), sendo seu teor total definido pela soma destas formas (TOIVO *et al.*, 2001; AKIHISA; KOKKE; TAMURA, 1991). A Tabela 2 apresenta o conteúdo de fitosteróis em alguns alimentos.

Estima-se um consumo dietético, natural, de 100 a 400 mg/dia de fitosteróis, em indivíduos de diversos países, sendo os vegetarianos os que ingerem maiores quantidades (HEARTY *et al.*, 2008; JIMÉNEZ-ESCRIG; SANTOS-HIDALGO; SAURA-CALIXTO, 2006; MORTON *et al.*, 1995).

Inicialmente, os fitosteróis eram utilizados como agentes farmacológicos, mas com o reconhecimento de que fazem parte de uma dieta normal, surgiu a ideia de sua administração na forma de produtos alimentares convencionais. Dessa forma, os avanços na indústria de alimentos têm permitido melhorar a sua solubilidade, incorporação e biodisponibilidade em uma grande variedade de gêneros alimentícios, seja na forma livre ou esterificada, como margarinas (principalmente), sucos de frutas, produtos lácteos, de

panificação e outros veículos, facilitando o enriquecimento de alimentos com o composto em questão (ST ONGE; JONES, 2003).

**Tabela 2.** Conteúdo de fitosteróis em alguns alimentos (mg/100g).

| <b>Alimento</b>         | <b>Total de fitosteróis<br/>(mg/100g)*</b> |
|-------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Óleos e gorduras</b> |                                            |
| Óleo de milho           | 509-1557                                   |
| Óleo de girassol        | 374-725                                    |
| Óleo de soja            | 229-459                                    |
| Óleo de oliva           | 144-150                                    |
| Óleo de palma           | 71-117                                     |
| Margarina               | 92-721                                     |
| <b>Cereais</b>          |                                            |
| Milho                   | 178                                        |
| Trigo                   | 60-69                                      |
| Arroz                   | 30                                         |
| <b>Frutas</b>           |                                            |
| Maracujá                | 44                                         |
| Banana                  | 17                                         |
| Maçã                    | 13                                         |
| Laranja                 | 7                                          |
| <b>Vegetais</b>         |                                            |
| Couve-flor              | 40                                         |
| Brócolis                | 39                                         |
| Alface                  | 38                                         |
| Azeitona verde          | 35                                         |
| Cenoura                 | 16                                         |
| <b>Sementes e Nozes</b> |                                            |
| Nozes                   | 127                                        |
| Semente de girassol     | 300                                        |

\*Soma de sitosterol, campesterol, estigmasterol, sitostanol e campestanol.

Adaptado de Marangoni e Poli (2010) e Piironen *et al.* (2000).

### 2.2.2 Absorção, toxicidade e regulamentação

A partir de 1912, alguns estudos passaram a investigar a absorção dos fitosteróis em animais, e mostraram que o sitosterol, estigmasterol e ergosterol não eram absorvidos por roedores e coelhos (SCHFNHEIMER, 1931; ELLIS; GARDNER, 1912). Porém, outros estudos reportaram, a partir de novos métodos de avaliação da absorção desses compostos, que os fitosteróis são absorvidos em certa medida, mas a extensão e o nível real da absorção ainda são desconhecidos. Um estudo mais recente que avaliou a absorção de esteróis de plantas em vários modelos experimentais encontrou que a absorção varia de 0% (coelhos) a 4% (ratos), e 6% (humanos) em relação à ingestão (POLLAK; KRITCHEVSKY, 1981). Salen e colaboradores (1970) suplementaram indivíduos com concentração variável de sitosterol (240-320 mg) e estimaram uma absorção entre 1,5 a 5% deste composto.

A diferença das taxas de absorção entre esteróis e estanois varia de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e com o grau de saturação, sendo que as maiores estruturas apresentam menor absorção, devido à maior hidrofobicidade destes compostos. Além disso, esteróis de plantas são menos absorvidos que o próprio colesterol, estando a taxa de absorção deste último em aproximadamente 60% do total ingerido (OSTLUND-JR *et al.*, 2002; BOSNER *et al.*, 1999).

A partir do ano de 2000, os fitosteróis foram reconhecidos como seguros para o uso como ingrediente em óleos vegetais, para a população em geral, pela Food and Drug Administration (FDA) e desde então diversos alimentos funcionais são produzidos com a adição ou enriquecimento deste composto (HICKS; MOREAU, 2001; FDA, 2000). Estudos conduzidos a partir desta certificação confirmam que os fitosteróis são bem

tolerados e não causam efeitos adversos quando suplementados em doses diárias de até 9g durante 8 semanas em homens e mulheres saudáveis (DAVIDSON *et al.*, 2001).

De acordo com a legislação brasileira, os alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde contendo fitosteróis devem estar associados a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis, para a obtenção dos benefícios desejados. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a porção do produto pronto para consumo deve fornecer no mínimo 0,8 g de fitosteróis livres, estando a recomendação diária do produto, entre 1 a 3 porções, o que deve garantir uma ingestão entre 1 a 3 g de fitosteróis livres por dia. Os fitosteróis referem-se tanto aos esteróis e estanóis livres quanto aos esterificados (ANVISA, 2008).

Quando avaliada a toxicidade da suplementação de fitosteróis, observou-se que uma dose diária de 6,6 g/kg, durante 90 dias, não foi suficiente para causar efeitos indesejáveis em ratos (HEPBURN; HORNER; SMITH, 1999). Os mesmos autores também não observaram efeitos tóxicos em animais suplementados com até 5,0% de fitosteróis. Além disso, o consumo deste composto é considerado seguro e os efeitos adversos são incomuns em adultos, provavelmente por ser excretado rapidamente via bile, o que praticamente impossibilita a intoxicação por doses elevadas (LEA; HEPBURN, 2006; COULTATE, 2002). Dessa forma, como os fitosteróis não podem ser sintetizados endogenamente por seres humanos, seus níveis circulantes são baixos e dependentes da dieta e da eficiência de sua absorção.

### **2.2.3 Efeito hipocolesterolêmico dos fitosteróis**

Desde 1950, diversos estudos têm atribuído aos fitosteróis a propriedade de inibir a absorção do colesterol, devido, principalmente, a competição na luz intestinal, e

assim reduzir os níveis de colesterol sanguíneo, como demonstrado em modelos experimentais e em humanos, e consequentemente, atuar como coadjuvante à prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (RACETTE *et al.*, 2010; KATAN *et al.*, 2003; POLLAK, 1953).

Dessa forma, um suplemento adicionado à dieta que seja seguro e bem tolerado pode ser útil no manejo não farmacológico da hipercolesterolemia visando uma redução mais rápida do LDL-c. A eficácia da sua ação hipocolesterolêmica tem sido confirmada em indivíduos normocolesterolêmicos, hipercolesterolêmicos e em diabéticos do tipo 2 (BAÑULS *et al.*, 2010; LAU; JOURNOUD; JONES, 2005; RICHELLE *et al.*, 2004).

Pollak (1953) mostrou, pela primeira vez, que os esteróis de plantas poderiam reduzir significativamente os níveis de colesterol plasmático de seres humanos. A concentração plasmática de colesterol total de 26 indivíduos saudáveis alimentados com cerca de 8,1 g de esteróis vegetais ao dia, durante 2 semanas, foi reduzida em aproximadamente 28%. Um resumo de 52 estudos revelou que uma média de 17 indivíduos alimentados com 13 g de fitosteróis por dia, durante 3 a 5 semanas, promoveu uma redução de 20% nos níveis de colesterol sanguíneo, mesmo com a suplementação advinda de diferentes fontes alimentares (POLLAK; KRITCHEVSKY, 1981).

A eficácia dos fitosteróis como agente hipocolesterolêmico também foi avaliada em uma revisão conduzida por Katan e colaboradores (2003). Nessa metanálise de 41 ensaios com vários produtos alimentares enriquecidos, os autores encontraram que a dose ideal de esteróis ou estanois vegetais (2-2,5 g/dia), promove uma redução de 10% na concentração sérica de LDL-c, enquanto doses mais elevadas fornecem apenas um pequeno efeito adicional. Entre os estudos, as reduções variaram entre 4 e 19%, o que

pode, pelo menos em parte, ser explicado pelas diferenças nas características basais dos sujeitos.

No estudo de Ntanios e colaboradores (2003), 130 hamsters receberam dietas hiperlipídicas (30% do valor energético), com colesterol (0,12% do valor energético) e diferentes concentrações de fitosteróis (0,24 a 2,84%), por doze semanas. Os autores observaram que a deposição de gordura nos hepatócitos e a consequente palidez hepática foram relacionadas inversamente à quantidade de fitosteróis ingerido pelos animais. A eficácia da proteção à dieta hipercolesterolêmica, em relação ao colesterol total e LDL-c, foi encontrada em todas as dietas suplementadas com fitosteróis.

Recentemente, 108 indivíduos com síndrome metabólica foram suplementados com fitosteróis (4 g/dia), durante 2 meses. Os resultados mostraram uma redução significativa do colesterol total (15,9%), LDL-c (20,3%), e das concentrações de triacilgliceróis (19,1%) no grupo de intervenção em relação ao grupo controle, mesmo os pacientes mantendo sua dieta habitual. Não foram observadas diferenças nos níveis de HDL-c, glicose, proteína C reativa, níveis de fibrinogênio e pressão arterial (SIALVERA *et al.*, 2011).

Entretanto, geralmente, não são notificadas alterações significativas nas concentrações séricas de HDL-c ou nos níveis de triacilgliceróis, em estudos clínicos e experimentais (BRUFAUA; CANELAB; RAFECAS, 2008; QUILEZ; GARCIA-LORDA; SALAS-SALVADO, 2003).

#### **2.2.3.1 Mecanismo de ação dos fitosteróis**

Tem sido demonstrado que os fitosteróis são benéficos como parte de uma dieta equilibrada, e sua eficácia não parece estar relacionada com alterações na ingestão

de colesterol dietético, provavelmente porque a excreção biliar de colesterol no intestino (cerca de 2 g/dia) é consideravelmente maior do que a ingestão de colesterol pela dieta (aproximadamente 300 mg/dia) (BAÑULS *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ-MIJARES *et al.*, 2010).

O mecanismo exato pelo qual os fitosteróis inibem a recaptção dietética e endógena de colesterol pelo intestino não é totalmente compreendido, embora várias teorias tenham sido propostas. Uma delas sugere que no intestino, o colesterol já marginalmente solúvel é precipitado em um estado não-absorvível pela presença de fitosteróis e estanóis. Uma segunda teoria se baseia no fato de que o colesterol deve compor as "micelas mistas", junto aos sais biliares e fosfolípidios, para ser absorvido pela corrente sanguínea. Neste processo, os fitosteróis levariam a uma menor solubilização do colesterol nas micelas, diminuindo a sua absorção e, por sua vez, aumentando a excreção fecal de colesterol e seus metabólitos (MARANGONI; POLI, 2010; HICKS; MOREAU, 2001). Alguns estudos sugerem que o  $\beta$ -sitosterol tem uma afinidade maior pelas micelas biliares, em comparação ao colesterol, e que os fitosteróis têm o potencial de reduzir a absorção de colesterol em 30% a 50% (JONES *et al.*, 2000; LING; JONES, 1995).

Uma vez dentro do enterócito, o colesterol e uma pequena fração de fitosteróis são esterificados pela acil-CoA-colesterol acil transferase (ACAT), embalados em quilomícrons e secretados no sistema linfático. O colesterol não esterificado e os fitosteróis são transportados de volta para o lúmen intestinal pelas proteínas transportadoras ABC (ABCG5 e ABCG8) (YU *et al.*, 2002). Outro mecanismo proposto para tal ação seria a indução da expressão dos transportadores ABCA1 pelos fitoesteróis, sendo estes transportadores incapazes de diferenciar o colesterol e o  $\beta$ -sitosterol, aumentando assim o efluxo do colesterol (PLAT; MENSINK, 2005). Estudos *in vitro*

mostraram também que a esterificação mediada pela ACAT é menos eficiente para os fitosteróis do que para o colesterol (FIELD; MATHUR, 1983), sendo esta responsável por reduzir a concentração intracelular de colesterol livre e tem sido sugerido que os fitosteróis podem suprimir a atividade ACAT, e consequentemente, reduzir a absorção intestinal de colesterol (MICALLEF; GARG, 2009).

No estudo de Chein e colaboradores (2010), 80 hamsters receberam dietas hiperlipídicas (12%) com alto teor de colesterol (0,5%) e 0,74% de fitosteróis e/ou 0,37%, 0,74% e 1,85% de uma mistura de leite em pó fermentado com fitosteróis, durante 4 semanas. Os resultados demonstraram que esta mistura poderia diminuir significativamente os níveis de colesterol total, triacilgliceróis séricos, lipídios hepáticos e índice aterogênico (LDL-c/HDL-c), enquanto também poderia aumentar significativamente o nível de colesterol fecal. Tais achados confirmam que o efeito redutor do colesterol pelo fitosterol não é apenas devido à inibição da absorção intestinal de colesterol da dieta, mas também devido à interferência da reabsorção biliar de colesterol. Os autores também encontraram uma redução significativa no peso do fígado de hamsters alimentados com 0,74% de fitosteróis, estando este achado em concordância com os resultados de Ntanios e Jones (1998) que reportaram uma redução de 20% do peso deste órgão em hamsters alimentados com dieta rica em colesterol e 1% de sitostanol.

No mesmo contexto, Nomaguchi e colaboradores (2011) investigaram o efeito da administração oral de fitosteróis derivados da *Aloe vera* em camundongos obesos e encontraram uma redução significativa dos níveis de triacilgliceróis hepáticos e séricos. Tais compostos agiram como ligantes das formas  $\alpha$  e  $\gamma$  do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo (PPAR), modificando a expressão dos genes envolvidos no transporte e oxidação de ácidos graxos, e cetogênese no fígado dos animais. Também demonstraram que a alteração gênica induzida pelo tratamento com os fitosteróis foi

relacionada ao transporte de lipídios, à lipogênese, gliconeogênese e sinalização dos PPARs.

#### **2.2.4 Outros efeitos biológicos**

Além do efeito hipocolesterolêmico e antiaterosclerótico deste composto, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que os fitosteróis, principalmente o  $\beta$ -sitosterol, exercem outras propriedades terapêuticas, como anticarcinogênica, oferecendo proteção contra câncer de cólon, mama e próstata pela prevenção e/ou retardo do crescimento de células tumorais (AWAD *et al.* 2008, 2001, 1998; BRADFORD; AWAD, 2007); imunomodulatória, anti-inflamatória (NAVARRO; DE LAS; VILLAR, 2001; BOUIC *et al.*, 2001;1996), antioxidante (FERRETTI; BACCHETTI; MASCIANGELO, 2010; MANNARINO *et al.*, 2009; FUHRMAN *et al.*, 2007; SUMMANEN *et al.*, 2003; RENSBURG *et al.*, 2000) e antidiabetogênica (MISAWA *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2006; WASAN *et al.*, 2003).

Homma e colaboradores (2003) verificaram que a redução significativa da concentração plasmática de LDL-c e da apolipoproteína B (ApoB), em sujeitos suplementados com fitosteróis (2 g/dia), está associada ao decréscimo da LDL oxidada. Outras investigações, em humanos, têm confirmado que as alterações nas lipoproteínas, após a suplementação dietética deste composto, estão relacionadas à redução de marcadores da peroxidação lipídica (MANNARINO *et al.*, 2009). O efeito protetor da ingestão de fitosteróis contra o estresse oxidativo, relacionado a peroxidação de lipoproteínas, tem sido reportado por estudos em modelos animais (FUHRMAN *et al.*, 2007; SUMMANEN *et al.*, 2003).

Alguns pesquisadores investigaram as interações, *in vitro*, entre os fitosteróis ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, e stigmasterol) e lipoproteínas plasmáticas isoladas de sujeitos normolipêmicos, bem como o seu efeito antioxidante e a suscetibilidade a peroxidação lipídica induzida por íons de cobre. Os autores verificaram que os fitosteróis exercem um efeito protetor contra a peroxidação lipídica do LDL-c, por meio da sua inibição, e previnem as alterações físico-químicas causadas por esta lipoproteína (FERRETTI; BACCHETTI; MASCIANGELO, 2010).

Mannarino e colaboradores (2009) avaliaram a ingestão de um produto lácteo enriquecido com fitosteróis durante 6 semanas em indivíduos hipercolesterolêmicos, e encontraram redução do LDL-c e colesterol total, sem alteração dos níveis de HDL-c e triacilgliceróis. O consumo de fitosteróis foi associado à redução significativa de 8-isoprostana plasmática, um indicador bastante específico para avaliar o grau de estresse oxidativo *in vivo*, sugerindo uma possível propriedade antioxidante para este composto. Rensburg e colaboradores (2000) reportaram que baixas concentrações de  $\beta$ -sitosterol e outros esteróis reduziram os níveis de TBARS, produto secundário da peroxidação lipídica, enquanto altas concentrações de  $\beta$ -sitosterol promoveram o aumento deste marcador *in vitro*. Porém, o efeito potencial do consumo de fitosteróis nesses biomarcadores ainda é recente e pouco estudado.

Alguns estudos também mostram evidências de que os fitosteróis podem ter atividade antioxidante em alimentos. White e Armstrong (1986) demonstraram que o  $\Delta^5$ avenasterol, mas não o  $\beta$ -sitosterol, extraídos de óleo de aveia, reduziu a deterioração de óleos aquecidos quando comparados ao controle. Estudos adicionais confirmaram que frações de fitosteróis apresentaram propriedades antioxidantes e antipolimerizantes, principalmente durante o processo de fritura, sendo sua atividade antioxidante atribuída à

formação de radical livre alílico e sua isomerização a outros radicais livres relativamente estáveis (WANG; HICKS; MOREAU, 2002; TIAN; WHITE, 1994).

Estudos recentes têm investigado e identificado os efeitos anti-hiperglicêmicos de fitosteróis derivados da *Aloe vera* em animais, a partir dos resultados de redução da glicemia em camundongos diabéticos, sugerindo que estes compostos controlam a glicose sanguínea, em longo prazo, e poderiam ser úteis para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (TANAKA *et al.*, 2006). Também foram demonstrados os efeitos benéficos dos fitosteróis de *Aloe vera* na hiperglicemia e na redução do acúmulo de gordura visceral após a administração destes compostos (25 µg/kg/dia) durante 44 dias em ratos diabéticos e obesos ZDF (*Zucker diabetic fatty*) (MISAWA *et al.*, 2008). Corroborando com estes achados, Nomaguchi e colaboradores (2011) também verificaram uma redução significativa no ganho de peso corporal e tecido adiposo em camundongos obesos, sugerindo que estes compostos poderiam atuar positivamente na prevenção da obesidade visceral e contribuir para o controle da síndrome metabólica. Entretanto, os mecanismos de tal efeito ainda não foram esclarecidos.

No mesmo contexto, Wasan e colaboradores (2003) avaliaram a ingestão de fitostanóis durante 30 dias em ratos magros e obesos e não encontraram alteração no peso corporal e nas concentrações de glicose, insulina e leptina. Também não houve alteração da tolerância à glicose nos ratos magros e normoglicêmicos, mas houve uma melhora significativa deste parâmetro no grupo obeso, após o tratamento. Entretanto, outro estudo não encontrou diferença no ganho de peso, consumo de dieta, e nos testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina tanto na fase de progressão ou regressão, após o tratamento com 2% de fitosteróis em dietas hiperlipídicas em camundongos (CALPE-BERDIEL *et al.*, 2008).

### 2.2.5 Associação entre CLA e fitosteróis

Até o momento, são escassos, na literatura, trabalhos que analisem os efeitos biológicos simultâneos de CLA e fitosteróis. Daly e colaboradores (2009) avaliaram, recentemente, os efeitos *in vitro*, dos fitosteróis e do CLA sobre a viabilidade e crescimento de células tumorais intestinais humanas (Caco-2), pela determinação do potencial efeito genoprotetor, por meio de testes de modulação da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e da atividade apoptótica. As células Caco-2 foram tratadas, por 48 horas, com os fitoesteróis campesterol,  $\beta$ -sitosterol ou  $\beta$ -sitoestanol, e com os isômeros de CLA *cis*-10, *trans*-12 e *trans*-9, *trans*-11 (em conjunto e isolados). Os três fitosteróis reduziram tanto a viabilidade como o crescimento das células Caco-2, enquanto o CLA apresentou efeito isômero-específico (inibição e estimulação do crescimento das células Caco-2). Em uma concentração de 25 $\mu$ M, os 2 isômeros de CLA aumentaram a atividade oxidante, sem causar danos ao DNA ou indução a mutagênese. Os fitoesteróis e o CLA não atuaram como genoprotetor e não induziram apoptose ou modularam a produção de COX-2. Portanto, os autores puderam concluir que os fitosteróis e os isômeros de CLA testados não foram tóxicos para as células Caco-2, em baixas concentrações, e não apresentaram potencial atividade anticancerígena.

Tendo em vista os efeitos biológicos atribuídos aos fitosteróis e ao CLA, são necessárias investigações mais detalhadas e em maior número que avaliem o impacto fisiológico da sua suplementação, em longo prazo, e em concentrações aceitáveis, *in vivo*, para que estes compostos possam ser utilizados como estratégia segura e eficaz na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis.

## REFERÊNCIAS

AHN, I.S.; CHOI, B.H.; HA, J.H. et al. Isomer-specific effect of conjugated linoleic acid on inflammatory adipokines associated with fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Medicinal Food**, v.9, p.307-312, 2006.

AKAHOSHI, A.; KOBA, K.; OHKURA-KAKU, S. et al. Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats. **Nutrition Research**, v.23, p.1691-1701, 2003.

AKIHISA, T.; KOKKE, W.C.M.C.; Tamura, T. Naturally occurring sterols and related compounds from plants. In: PATTERSON, G.W.; NESS, W.D. (Eds.). Physiology and Biochemistry of Sterols, **American Oil Chemists' Society**, Champaign, IL, p.172–228, 1991.

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**, v.86, p.1941-1946, 2003.

ANDREOLI, M.F.; GONZALEZ, M.A.; MARTINELLI, M.I. et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. **Nutrition**, v.25, p.445-452, 2009.

ANVISA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 01/11/2011.

ARAB, K.; ROSSARY, A.; SOULÈRE, L.; STEGHENS JP. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. **British Journal of Nutrition**, v.96, p.811-9, 2006.

ARBONES-MAINAR, J.M.; NAVARRO, M.A.; GUZMAN, M.A. et al. Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice. **Atherosclerosis**, v.189, p.318–27, 2006.

AWAD, A.B.; FINK, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.2127-2130, 2000.

AWAD, A.B.; BARTA, S.L.; FINK, C.S. et al. b-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.52, p.419-426, 2008.

AWAD, A.B.; FINK, C.S.; WILLIAMS, H. et al. In vitro and in vivo (SCID mice) effect of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. **European Journal of Cancer Prevention**, v.10, p.507-513, 2001.

AWAD, A.B.; VON HOLTZ, R.L.; CONE, J.P. et al. b-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. **Anticancer Research**. v.18, p.471-473, 1998.

AZAIN, M.J.; HAUSMAN, D.B.; SISK, M.B. et al. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1548-1554, 2000.

BAÑULS, C.; MARTÍNEZ-TRIGUERO, M.L.; LÓPEZ-RUIZ, A. et al. Evaluation of cardiovascular risk and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic subjects on a standard healthy diet including low-fat milk enriched with plant sterols. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.881-6, 2010.

BASU, S.; SMEDMAN, A.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. **FEBS Letters**, v.468, p.33–36, 2000.

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

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**, v.133, p.257S-260S, 2003.

BERGER, A.; JONES, P.J.; ABUMWEIS, S.S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. **Lipids in Health and Disease**, v.3, p.1-19, 2004.

BHATTACHARYA, A.; RAHMAN M.M.; SUN, D. et al. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. **Nutrition journal**, v.135, p.1124-30, 2005.

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

BOSNER, M.S., LANGE, L.G.; STENSON, W.F. et al. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v.40, p.302–308, 1999.

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**, v.58, 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**, v.22, p.767-771, 2009.

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

BOUIC, P.J.D.; ETSEBETH, S.; LIEBENBERG, R.W. et al. Beta-sitosterol and betasitosterol glucoside stimulate human peripheral lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. **International Journal of Immunopharmacology**, v.18, p.693-700, 1996.

BOUIC, P.J. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.4, p.471-475, 2001.

BRADFORD, P.G.; AWAD, A.B. Phytosterols as anticancer compounds. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, p.161-170, 2007.

BROWN, J.; BOYSEN, M.; CHUNG, S. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.26735-26747, 2004.

BROWN, M.; SANDBERG-BOYSEN, M.; SKOV, S. et al. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  by conjugated linoleic acid (CLA) in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, v.44, p.1287-300, 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**, v.12, p.381-387, 2001.

BRUFAUA, G.; CANELAB, M.A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v.28, p.217-225, 2008.

CALPE-BERDIEL, L.; ESCOLÀ-GIL, J.C.; ROTLLAN, N. et al. Phytosterols do not change susceptibility to obesity, insulin resistance, and diabetes induced by a high-fat diet in mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.57, p.1497-1501, 2008.

CANTWELL, H.; DEVERY, R.; O'SHEA, M. et al. The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. **Lipids**, v.34, p.833-9, 1999.

CAO, Z.P.; WANG, F.; XIANG, X.S. et al. Intracerebroventricular administration of conjugated linoleic acid (CLA) inhibits food intake by decreasing gene expression of NPY and AgRP. **Neuroscience Letters**, v.418, p.217-221, 2007.

CHEIN, Y.L.; WU, L.Y.; LEE, T.C. et al. Cholesterol-lowering effect of phytosterol-containing lactic-fermented milk powder in hamsters. **Food Chemistry**, v.119, p.1121-1126, 2010.

CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M. et al. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.5, p.694-701, 1992.

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

CHOI, Y.; PARK, Y.; PARIZA, M.W. et al. Regulation of stearyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.284, p.689-693, 2001.

CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, B.A.; BAUMGARD, M.A. An update on conjugated linoleic acid. In: Cornell Nutrition Conference Feed Manufactory, 1999. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1999, p. 93-101.

CHUNG, S.; BROWN, J.M.; PROVO, J.N. et al. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte resistance through NFkB-dependent cytokine production. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.38445-56, 2005.

CLÉMENT, L.; POIRIER, H.; NIOT, I. et al. Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. **Journal of Lipid Research**, v.43, p.1400-9, 2002.

COLL, A.P.; FAROOQI, I.S.; O'RAHILLY, S. The Hormonal Control of Food Intake. **Cell**, v.129, p.251-262, 2007.

COOPER, M.H.; MILLER, J.R.; MITCHELL, P.L. et al. Conjugated linoleic acid isomers have no effect on atherosclerosis and adverse effects on lipoprotein and liver lipid metabolism in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a high-cholesterol diet. **Atherosclerosis**, v.200, p.294-302, 2008.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A. et al. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.622-630, 2001.

COULTATE, T.P. Food: the chemistry of its components. 4th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.

DALY, T.J.; AHERNE, S.A.; O'CONNOR, T.P. et al. Lack of genoprotective effect of phytosterols and conjugated linoleic acids on Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1791-1796, 2009.

DAVIDSON, M.H.; MAKI, K.C.; UMPOROWICZ, D.M. et al. Safety and tolerability of esterified phytosterols administered in reduced-fat spread and salad dressing to healthy adult men and women. **Journal of the American College of Nutrition**, v.20, p.307-19, 2001.

DESROCHES, S.; CHOUINARD, P.Y.; GALIBOIS, I. et al. 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**, v.82, p.309-319, 2005.

DHIMAN, T.R.; NAM, S.H.; URE, A.L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.463-82, 2005.

ELLIS, G.W.; GARDNER, J.A. The origin and destiny of cholesterol in the organism VIII. On the cholesterol content of the liver of rabbits under various diets and during inanition. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.84, p.461-70, 1912.

ERDMANN, J.; TÖPSCH, R.; LIPPL, F. et al. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, p.3048-3054, 2004.

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**, v.13, p.508-516, 2002.

EVANS, M.; GEIGERMAN, C.; COOK, J. et al. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, v.35, p.899-910, 2000.

FDA. Food labeling: Health claims. Plant sterol/stanol esters and coronary heart disease. Interim Final Rule. **Federal Register**, v.65, p.54685-54739, 2000.

FERNANDEZ, M.L.; VEGA-LOPEZ, S. Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. **Cardiovascular Drug Reviews**, v.23, p.57-70, 2005.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T; MASCIANGELO, S. Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low-density lipoproteins. **Nutrition**, v.26, p.296-304, 2010.

FIELD, F.J.; MATHUR, S.N. Beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. **Journal of lipid research**, v.24, p.409-17, 1983.

FLINTOFF-DYE, N.L.; OMAYE, S.T. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. **Nutrition Research**, v.25, p.1-12, 2005.

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

FUHRMAN, B.; PLAT, D.; HERZOG, Y. et al. Consumption of a novel dietary formula of plant sterol esters of canola oil fatty acids, in a canola oil matrix containing 1,3-diacylglycerol, reduces oxidative stress in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.2028-33, 2007.

GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; LEÓN, C. et al. Advances in nutrigenomics research: Novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p.290-304, 2010.

GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HØIVIK, H.O. et al. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. **The British Journal of Nutrition**, v.97, p.550-60, 2007.

GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HOYE, K. et al. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.778-784, 2005.

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

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta 9$  desaturase. **Journal of Nutrition**, v.130, 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**, v.8, p.1881-1887, 1987.

HALADE, G.V.; RAHMAN, D.; FERNANDES, G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57B1/6J mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.332-337, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

HARGRAVE, K.M.; AZAIN, M.J.; KACHMAN, S.D. et al. Conjugated linoleic acid does not improve insulin tolerance in mice. **Obesity Research**, v.11, p.1104-1115, 2003.

HEARTY, A.P.; DUFFY, E.; GIBNEY, M.J. Intake estimates of naturally occurring phytosterols using deterministic and probabilistic methods in a representative Irish population. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.21, p.1-14, 2008.

HEPBURN, P.A.; HORNER, A.S.; SMITH, M. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 2. Subchronic 90-day oral toxicity study on phytosterol esters - a novel functional food. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.521-532, 1999.

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

HERNÁNDEZ-MIJARES, A.; BAÑULS, C.; ROCHA, M. et al. Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. **The British Journal of Nutrition**, v.104, p.1018-25, 2010.

HICKS, K.B.; MOREAU, R.A. Phytosterols and phytostanols: Functional food cholesterol busters. **Food Technology**, v.55, p.63-67, 2001.

HOMMA, Y.; IKEDA, I.; ISHIKAWA, T. et al. Decrease in plasma low-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, cholesteryl ester transfer protein, and oxidized low-density lipoprotein by plant stanol ester-containing spread: a randomized, placebocontrolled trial. **Nutrition**, v.19, p.369-74, 2003.

IP, C.; CHIN, F.C.; SCIMECA, J. et al. Mamary câncer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. **Cancer Research**, v. 51, p.6118-6124, 1991.

IWATA, T.; KAMEGAI, T.; YAMAUCHI-SATO, Y. et al. Safety of dietary conjugated linoleic acid (CLA) in a 12-weeks trial in healthy overweight Japanese male volunteers. **Journal of Oleo Science**, v.56, p.517-525, 2007.

JANSEN P.J.; LÜTJOHANN D.; ABILDAYEVA K. et al. Dietary plant sterols accumulate in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1761, p.445-453, 2006.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SANTOS-HIDALGO, A.B.; SAURA-CALIXTO, F. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3462-3471, 2006.

JONES, P.J.; RAEINI-SARJAZ, M.; NTANIOS, F.Y. et al. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. **Journal of Lipid Research**, v.41, p.697–705, 2000.

KANG, K.; LIU, W.; ALBRIGHT, K.J. et al. Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.795-7999, 2003.

KATAN, M.B.; GRUNDY, S.M.; JONES, P. et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. **Mayo Clinic Proceedings**, v.78, p.965-78, 2003.

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**, v.71, p.295-301, 2004.

KENNEDY, A.; CHUNG, S.; LAPOINT, K. et al. Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPARgamma activity in primary cultures of human adipocytes. **Nutrition Journal**, v.138, p.455-61, 2008.

KENNEDY, A.; MARTINEZA, K.; SCHMIDT, S. et al. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.171-179, 2010.

KIM, H.K.; KIM, S.R.; AHN, J.Y. et al. Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.51, p.8-15, 2005.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S. et al. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions. **Lipids**, v.39, p.611-616, 2004.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; WRIGHT, S. et al. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, p.472S- 477S, 2000.

LAGO, F.; GÓMEZ, R.; GÓMEZ-REINO, J.J. et al. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v.34, p.500-510, 2009.

LAROSA, P.C.; MINER, J.; XIA, Y. et al. Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. **Physiological Genomics**, v.27, p.282-94, 2006.

LAU, V.W.Y.; JOURNOUD, M.; JONES, P.J.H. Plant sterols are efficacious in lowering plasma LDL and non-HDL cholesterol in hypercholesterolemic type 2 diabetic and nondiabetic persons. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.1351-8, 2005.

LEA, L.J.; HEPBURN, P.A. Safety evaluation of phytosterol-esters. Part 9. Results of a European post-launch monitoring programme. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1213-22, 2006.

LEE, K.N.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.248, p.817-821, 1998.

LING, W.H.; JONES, P.J. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v.57, p.195-206, 1995.

MANNARINO, E.; PIRRO, M.; CORTESE, C. et al. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: a multicenter Italian study. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v.19, p.84-90, 2009.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v.61, p.193–199, 2010.

MARTIN, S.A.; JENKINS, T.C. Factors affecting conjugated linoleic acid trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, v.80, p.3347-3352, 2002.

MATSUZAWA, Y.; FUNAHASHI, T.; KIHARA, S. et al. Adiponectin and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, p.29-33, 2004.

MCLEOD, R.S.; LEBLANC, A.M.; LANGILLE, M.A. et al. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.1169S-1174S, 2004.

MICALLEF, M.A.; GARG, M.L. Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.927–939, 2009.

MILLER, J.R.; SIRIPURKPONG, P.; HAWES J. et al. The trans- 10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. **Journal of Lipid Research**, v.49, p.550-62, 2008.

MISAWA, E.; TANAKA, M.; NOMAGUCHI, K. et al. Administration of phytosterols isolated from *Aloe vera* gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. **Obesity Research & Clinical Practice**, v.2, p.239-245, 2008.

MITCHELL, P.L.; MCLEOD, R.S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. **Biochemistry and Cell Biology**, v.86, p.293–301, 2008.

MOON, H.S.; LEE, H.G.; SEO, J.H. et al. Antiobesity effect of PEGylated conjugated linoleic acid on high-fat diet-induced obese C57BL/6J (ob/ob) mice: attenuation of insulin resistance and enhancement of antioxidant defenses. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.187-94, 2009.

MOREAU, R.A.; WHITAKER, B.D.; HICKS, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and healthpromoting uses. **Progress in Lipid Research**, v.41, p.457-500, 2002.

MORTON, G.M.; LEE, S.M.; BUSS, D.H. et al. Intakes and major dietary sources of cholesterol or phytosterols in the British diet. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v.8, p.429-440, 1995.

MOUGIOS, V.; MATSAKAS, A.; PETRIDOU, A. et al. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid in human serum lipids and body fat. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.12, p.585-594, 2001.

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

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATEET, Y. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v.409, p.194-198, 2001.

NAUMANN, E.; CARPENTIER, Y.A.; SAEBO, A. et al. Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) do not affect the plasma lipoprotein profile in moderately overweight subjects with LDL phenotype B. **Atherosclerosis**, v.188, p.167–74, 2006.

NAVARRO, A.; DE LAS, H.B.; VILLAR, A. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.470-473, 2001.

NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D. et al. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Artery**, v.22, p.266-277, 1997.

NOMAGUCHI, K.; TANAKA, M.; MISAWA, E. et al. *Aloe vera* phytosterols act as ligands for PPAR and improve the expression levels of PPAR target genes in the livers of mice with diet-induced obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v.5, p.190-201, 2011.

NOTO, A.; ZAHRAKKA, P.; YURKOVA, N. et al. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. **Lipids**, v. 41, p.179–88, 2006.

NTANIOS, F.Y.; JONES, P.J. Effects of variable dietary sitostanol concentrations on plasma lipid profile and phytosterol metabolism in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1390, p.237–244, 1998.

NTANIOS, F.Y., KOOIJ, A.J.V.; DECKERE, E.A.M. et al. Effects of various amounts of dietary plant sterol esters on plasma and hepatic sterol concentration and aortic foam cell formation of cholesterol-fed hamsters. **Atherosclerosis**, v.169, p.41-50, 2003.

OSTLUND-JR, R.E.; MCGILL, J.B.; ZENG, C.M. et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytosterols in humans. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.282, p.911–916, 2002.

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.; LORETZ, L.J.; STORKSON, J.M. et al. Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. **Cancer Research**, v.43, 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**, v.223, p.8-13, 2000.

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

PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, S.F. et al. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, v.7, p.63-69, 1979.

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

PARK, Y.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W. et al. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v.32, p.853-858, 1997.

PARK, Y., PARIZA, M.W. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). **Food Research International**, v.40, p.311–323, 2007.

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**, v.73, p.C556–C560, 2008.

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

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; NTAMBI, J.M. et al. Inhibition on hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1486, p.285-292, 2000.

PARRA, P.; SERRA, F.; PALOU, A. Moderate doses of conjugated linoleic acid isomers mix contribute to lowering body fat content maintaining insulin sensitivity and a noninflammatory pattern in adipose tissue in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.107-15, 2010.

PÉREZ-MATUTE, P.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J.A. et al. Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.268, p.50-58, 2007.

PETERSON, D.G.; MATITASHVILI, E.A.; BAUMAN, D.E. The inhibitory effect of trans- 10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.2523-2527, 2004.

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

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A. et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.939-66, 2000.

PLAT, J.; MENSINK, R.P. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. **The American journal of cardiology**, v.96, p.15D-22D, 2005.

POLLAK, O.J. Reduction of blood cholesterol in man. **Circulation**, v.7, p.702-6, 1953.

POLLAK, O.J.; KRITCHEVSKY, D. Sitosterol. Basel: S. KARGER; 1981.

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

QUILEZ, J.; GARCIA-LORDA, P.; SALAS-SALVADO, J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. **Clinical Nutrition**, v.22, p.343–351, 2003.

RACETTE, S.B.; LIN, X.; LEFEVRE, M. et al. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.32-8, 2010.

RAHMAN, S.M.; WANG, Y.M.; YOTSUMOTO, H. et al. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. **Nutrition**, v.17, p.385-390, 2001.

REYNOLDS, H.M.; ROCHE, C.M. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signaling. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.82, p.199-204, 2010.

RICHELLE, M.; ENSLEN, M.; HAGER, C. et al. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.171-7, 2004.

RISÉRUS, U.; VESSBY, B.; ÄRNLÖV, J. et al. Effects of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.279-83, 2004.

RISÉRUS, U.M.; ARNER, P.; BRISMAR, K. et al. Treatment with dietary trans10, cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v.25, p.1516-21, 2002.

RITZENTHALER, K.L.; MCGUIRE, M.K.; FALEN, R. et al. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **Journal of Nutrition**, v.131, p.1548-1554, 2001.

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

ROOS, B.; RUCKLIDGE, G.; REID, M. et al. Divergent mechanisms of cis9, trans11-and trans10, cis12-conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach. **The FASEB Journal**, v.29, p.1746-8, 2005.

ROSADO, E.L.; MONTEIRO, J.B.; CHAIA, V. et al. Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona. **Nutrición Hospitalaria**, v.21, p.686-693, 2006.

RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P. et al. Phytosterol, tocopherol, and squalene content of selected nuts, seeds, legumes and grains. **Planta Medica**, v.73, p.630, 2007.

RYDER, J.W.; PORTOCARRERO, C.P.; SONG, X.M. et al. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. **Diabetes**, v.50, p.1149-57, 2001.

SAKONO, M.; MIYANAGA, F.; KAWAHARA, S. et al. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by rat liver. **Lipids**, v.34, p.997-1000, 1999.

SALEN, G.; AHRENS, E.H.; GRUNDY, S.M. Metabolism of beta-sitosterol in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.49, p.952-67, 1970.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, v.21, p.195-221, 2008.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípidos totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípidos biológicos de ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, v.22, p.39-49, 2009.

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**, v.42, p.845-854, 2007.

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

SCHAEFFLER, A.; GROSS, P.; BUETTNER, R. et al. Fatty acid-induced induction of toll-like receptor-4/nuclear factor- $\kappa$ B pathway in adipocytes links nutritional signaling with innate immunity. **Immunology**, v.126, p.233-245, 2008.

SCHFNHEIMER, R. New contributions in sterol metabolism. **Science**, v.74, p.579- 84, 1931.

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

SIALVERA, T.E.; POUNIS, G.D.; KOUTELIDAKIS, A.E. et al. Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v.x, n.x, p.xx-xx, 2011.

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

SLUIJS, I.; PLANTINGA, Y.; ROOS, B. et al. Dietary supplementation with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid and aortic stiffness in overweight and obese adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.175-83, 2010.

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

SO, M.H.H.; TSE, I.M.Y.; LI, E.T.S. Dietary fat concentration influences the effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on temporal patterns of energy intake and hypothalamic expression of appetite-controlling genes in mice. **The Journal of Nutrition**, v.139, p.145-151, 2009.

ST ONGE, M.P.; JONES, P.J. Phytosterols and human lipid metabolism: efficacy, safety, and novel foods. **Lipids**, v.38, p.367-75, 2003.

STACHOWSKA, E.; GUTOWSKA, I.; SZUMILOWICZ, H. et al. Is conjugated linoleic acid a protective factor in atherosclerosis? Study with the use of neural networks. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v.51, p.27-32, 2005.

STANTON, C.; LAWLESS, F.; MURPHY, J. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) - a health-promoting component of dairy fats. **Farm & Food**, v.7, p.19-20, 1997.

STECK, S.E.; CHALECKI, A.M.; MILLER, P. et al. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1188-93, 2007.

SUMMANEN, J.; YRJÖNEN, T.; CHRISTIANSEN, L. et al. Effects of microcrystalline plant sterol suspension and a powdered plant sterol supplement on hypercholesterolemia in genetically obese Zucker rats. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.55, p.1673-9, 2003.

TANAKA M, MISAWA E, ITO Y. et al. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as antidiabetic compounds. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.1418-22, 2006.

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

TAYLOR, J.S.W.; WILLIAMS, R.R.; JAMES, P. et al. Conjugated linoleic acid impairs endothelial function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.26, p.307-12, 2006.

TEACHEY, M.K.; TAYLOR, Z.C.; MAIER, T. et al. Interactions of conjugated linoleic acid and lipoic acid on insulin action in the obese Zucker rat. **Metabolism**, v.52, p.1167-74, 2003.

TERPSTRA, A.H.; BEYNEN, A.C.; EVERTS H. et al. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.940-5, 2002.

TIAN, L.L.; WHITE, P.J. Antipolymerization Activity of Oat Extract in Soybean and Cottonseed Oils Under Frying Conditions, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p.1087–1094, 1994.

TOIVO, J.; PHILLIPS, K.; LAMPI, A.M. et al. Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.631–643, 2001.

TRICON, S.; BURDGE, G.C.; KEW, S. et al. Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.614-20, 2004.

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

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K. et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, v.49, p.1534-1542, 2000.

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

VAN RENSBURG, S.J.; DANIELS, W.M.; VAN, J.M. et al. A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydro-epiandrosterone sulphate and melatonin *in vitro* lipid peroxidation. **Metabolic Brain Disease**, v.15, p.257–265, 2000.

VÁZQUEZ-VELA, M.E.F.; TORRES, N.; TOVAR, A.R. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. **Archives of Medical Research**, v.39, p.715-728, 2008.

VELLOSO, L.A. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, p.151-158, 2009.

VOTRUBA, S.B.; KIRCHNER, H.; TSCHÖP, M. et al. Morning ghrelin concentrations are not affected by short-term overfeeding and not predict ad libitum food intake in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, p.801-806, 2009.

WANDERS, L.; LEDER, J.D.; BANGA, M.B. et al. A high intake of conjugated linoleic acid does not affect liver and kidney function tests in healthy human subjects. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.587-590, 2010.

WANG, T.; HICKS, K.B.; MOREAU, R. Antioxidant Activity of Phytosterols, Oryzanol, and Other Phytosterol Conjugates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.79, p.1201-1206, 2002.

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

WEST, D.B.; BLOHM, F.Y.; TRUETT, A.A. et al. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.2471-7, 2000.

WHIGHAM, L.D.; O'SHEA, M.; MOHEDE, I.C. et al. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1701-1709, 2004.

WHIGHAM, L.D.; WATRAS, A.C.; SCHOELLER, D.A. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, p.1203-1211, 2007.

WHITE, P.J.; ARMSTRONG, L.S. Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, p.525–9, 1986.

YAMASAKI, M.; IKEDA, A.; OJI, M. et al. Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-levels diets. **Nutrition**, v.19, p.30-35, 2003.

YAMASAKI, M.; MANSO, K.; MISHIMA, H. et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.6367-71, 2000.

YU, L.; HAMMER, R.E.; LI-HAWKINS, J. et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.99, p.16237-42, 2002.

ZAMBELL, K.L.; KEIM, N.L.; VAN LOAN, M. D. et al. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. **Lipids**, v.35, p.777-782, 2000.

ZHOU, X.R.; SUN, C.H.; LIU, J.R. et al. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR $\gamma$  gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. **Growth Hormone & IGF Research**, v.18, p.361-368, 2008.

## CAPÍTULO I

---

## ARTIGO I

### COMBINATION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID WITH PHYTOSTEROLS REDUCES ADIPOSE TISSUE WITHOUT IMPAIRMENT OF INSULIN SENSITIVITY IN *SPRAGUE* *DAWLEY* RATS

RAFAELA DA SILVA MARINELI<sup>1\*</sup>, SABRINA ALVES LENQUISTE<sup>1</sup>, MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JR.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, São Paulo State, Brazil.

\*Corresponding author. Email address: [rafanutr@fea.unicamp.br](mailto:rafanutr@fea.unicamp.br) Tel.: +55 19 3521-4068; fax: +55 19 3521-4060. Address: Monteiro Lobato st., 80, zip code 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

#### Acknowledgment

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank *Cognis Brasil Ltd* for supplements supplying.

#### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and phytosterols supplementation, alone or in combination, on hormonal and lipid profiles and in insulin resistance in animals.

**Methods:** Forty *Sprague Dawley* rats received diets supplemented with 2% of lipid compounds of interest: soybean oil (group S) (standard), linoleic acid from safflower oil (group LA) (control), mixture of *c9,t11* and *t10,c12* CLA (group CLA), phytosterols (group

P) and mixture of CLA and phytosterols (group CLA+P) for 9 weeks. Food intake, body and organs weight, serum lipid and hormone profile, insulin sensibility, glucose tolerance, hepatic and fecal lipids content and body composition were evaluated.

**Results:** The animals that received the combination of CLA and phytosterols did not show modifications on food intake, weight gain, body composition, kidneys, heart and liver weights, but they showed a clear decrease on epididymal adipose tissue (-42%); modification on hepatic lipids content and in serum lipid profile were not detected; and increase in serum insulin concentrations was observed without promoting insulin resistance. In addition, CLA supplementation decreased serum leptin concentrations and increased the liver weight without modifications on hepatic lipids content. The ingestion of phytosterols by the animals resulted in decreased serum glucose, improved homeostasis model assessment of beta cell function (HOMA-BCF) and increased fecal lipids excretion (6 times) with or without addition of CLA.

**Conclusion:** In summary the animals that received the combination of CLA+P showed a reduction in adipose tissue and did not show hepatomegaly or impairment of insulin sensitivity. Further studies are needed to elucidate the mechanisms of action of this association in the parameters evaluated.

**Key words:** Conjugated linoleic acid, phytosterols, lipid profile, leptin, adiponectin, body fat, insulin resistance.

## Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) represents a group of positional and geometric isomers derived from linoleic acid (LA, 18:2n-6) [1]. CLA is naturally produced in ruminant animals by the process of bacterial biohydrogenation of LA in the rumen and via  $\Delta^9$ -desaturase of *trans*-11 octadecanoic acid [2]. They are found in meats, such as beef, lamb

and dairy products including milk and cheese [3]. The most abundant CLA isomer found in natural foods is *cis-9, trans-11* (*c9,t11*) isomer [4]. Commercial preparations of CLA are usually a 1:1 mixture of *c9,t11* and *trans-10, cis-12* (*t10,c12*) isomers with other isomers as minor components [1].

The first biological effect of CLA was published by Ha, Grimm and Pariza [5]. Since then, many other papers have been addressed the possible role of CLA on health using animal models and cell cultures derived from humans. In some animal models, dietary CLA showed to prevent atherosclerosis, modulate circulating lipids, improve immune function, enhance of bone mineralization, prevent impaired glucose tolerance in diabetes, decrease body fat and increase lean body mass. Several of these effects are controversial and are still questioned in humans [6,7].

In addition, some adverse results have been demonstrated in some animal models, like hepatomegaly, hepatic steatosis, lipoatrophy, increase susceptibility to lipid autoxidation and insulin resistance [8-10]. The precise actions and the biochemical mechanisms by which CLA mediates the beneficial or detrimental effects remain unclear.

Phytosterols (plant sterols) are bioactive components of all vegetable foods. In plants, more than 200 different types of phytosterols have been reported and the principal plant sterols are  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol [11]. They are found in all plant-based foods, such as fruit, vegetables, nuts, seeds, cereals and most concentrated source can be found in vegetable oils [12]. Phytosterols have been shown to be effective, safe and no adverse effects have been observed when added to an increasing variety of foodstuffs [13].

They have been used as blood cholesterol-lowering agents for the last half century and the effect of these compounds on plasma lipid levels has been tested in animals and humans [14-16]. One mechanism that could be involved in the

hypocholesterolemic action is the physical competition between phytosterols and cholesterol for incorporation into micelles, which compromises cholesterol absorption [17]. Although most studies have focused on the cholesterol-lowering activity of phytosterols, other biological properties such as antidiabetic agents have also been attributed to these plant compounds [18-20].

Because they are substances with proven biological effect, it is possible that the interaction between CLA and phytosterols improves or potentiates their effects by increasing phytosterols absorption, acting on body composition, regulating the levels of lipoproteins and reducing insulin resistance. Therefore, the aim of this work was to investigate the effect of dietary CLA and phytosterols supplementation, alone or in combination, on hormonal and lipid profiles and in insulin resistance in rats.

## **Materials and Methods**

### **Supplements**

Safflower oil (76.62% of linoleic acid), conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®) (80% of *c9,t11* and *t10,c12* in a 1:1 ratio, and 20% of other isomers) and phytosterol Vegapure® 95FF (50% of total phytosterol, from which 44.88% of  $\beta$ -sitosterol, 29.59% of campesterol and 19.42% of stigmasterol) were supplied by *Cognis Brasil Ltd.* These values were used to calculate the addition of 2% of lipid compounds of interest to the diets.

### **Diet analysis**

AIN93G was prepared monthly according to the American Society for Nutrition [21]. Net protein content was 12% [22]. After prepared, the diet was packed in dark polyethylene bags and stored at -20 °C to minimize the oxidation of fatty acids. Protein content and ashes were performed as described by Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [23]. Total lipids were determined by the method of Bligh and Dyer [24].

Carbohydrates were calculated by the difference, and total energy value was estimated using the isoperibol automatic calorimeter (PARR 1261) with oxygen pump (PARR 1108). The formulation and the chemical composition of diets are presented in Tables 1 and 2.

Table 1. Composition of the experimental diets (g/kg)

| <b>Ingredient</b>       | <b>S</b> | <b>LA</b> | <b>CLA</b> | <b>P</b> | <b>CLA+P</b> |
|-------------------------|----------|-----------|------------|----------|--------------|
| Casein (78% protein)*   | 153.24   | 153.24    | 153.24     | 153.24   | 153.24       |
| Corn starch             | 427      | 427       | 427        | 427      | 427          |
| Maltodextrin            | 141.8    | 141.8     | 141.8      | 141.8    | 141.8        |
| Sucrose                 | 107.43   | 107.43    | 107.43     | 107.43   | 107.43       |
| Soybean oil             | 90       | 70        | 70         | 70       | 70           |
| Cellulose               | 50       | 50        | 50         | 50       | 50           |
| Mineral mix**           | 35       | 35        | 35         | 35       | 35           |
| Vitamin mix**           | 10       | 10        | 10         | 10       | 10           |
| L-cystine               | 3        | 3         | 3          | 3        | 3            |
| Choline bitartrate      | 2.5      | 2.5       | 2.5        | 2.5      | 2.5          |
| Tert-Butyl Hydroquinone | 0.014    | 0.014     | 0.014      | 0.014    | 0.014        |
| Phytosterol Vegapure®   | -        | -         | -          | 40       | 40           |
| 95FF                    | -        | -         | -          | -        | -            |
| Safflower oil           | -        | 26.1      | -          | -        | -            |
| CLA Tonalin®            | -        | -         | 25.3       | -        | 25.3         |

\*To provide 12 g of protein/100 g of diet. \*\*Vitamin and mineral mixtures were prepared according to Reeves et al. [21]. S: diet supplemented with soybean oil, LA: diet supplemented with safflower oil, CLA: diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA), P: diet supplemented with phytosterols and CLA+P: diet supplemented with conjugated linoleic acid plus phytosterols.

Table 2. Proximate composition (g/100g) and energy density (Kcal/100g) of the experimental diets\*

| <b>Ingredient*</b> | <b>S</b>                   | <b>LA</b>                   | <b>CLA</b>                 | <b>P</b>                   | <b>CLA+P</b>              |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Protein (N = 6.25) | 12.56 ± 0.15               | 12.63 ± 0.32                | 12.43 ± 0.12               | 11.91 ± 0.12               | 12.56 ± 0.25              |
| Fat                | 9.11 ± 0.06 <sup>d</sup>   | 9.51 ± 0.03 <sup>c</sup>    | 9.20 ± 0.03 <sup>d</sup>   | 10.57 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 12.71 ± 0.06 <sup>a</sup> |
| Ash                | 2.67 ± 0.02                | 2.63 ± 0.04                 | 2.6 ± 0.09                 | 2.47 ± 0.03                | 2.52 ± 0.05               |
| Humidity           | 7.75 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 7.65 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 7.5 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 7.06 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 7.01 ± 0.07 <sup>b</sup>  |
| Carbohydrates      | 67.91                      | 67.58                       | 68.27                      | 67.99                      | 65.2                      |
| Kcal/100g          | 440.79 ± 1.47 <sup>c</sup> | 445.95 ± 1.44 <sup>bc</sup> | 441.26 ± 1.18 <sup>c</sup> | 451.17 ± 0.48 <sup>b</sup> | 463.6 ± 0.08 <sup>a</sup> |

S: diet supplemented with soybean oil, LA: diet supplemented with safflower oil, CLA: diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA), P: diet supplemented with phytosterols and CLA+P: diet supplemented with conjugated linoleic acid plus phytosterols. \*Values expressed as means ± S.E.M. Means followed by at different letters in the same line indicate statistical differences by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). Carbohydrates content was determined by the difference.

## **Animals and dietary treatment**

This work was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA - IB/UNICAMP, Protocol no. 2296-1) and followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies. Forty male healthy recently weaned (aged from 21 to 23 days, weighing  $65.07 \pm 6.98$  g) *Sprague Dawley* rats were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation, University of Campinas. Animals remained in individual cages for 9 weeks, including an adaptation period of 7 days, with free access of water and feed, maintained in temperature controlled room ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 60-70% humidity) and 12 hours light/dark cycle. Animals were randomly divided in five experimental groups (n=8/group) that received diets supplemented with 2% of the compound of interest of each lipid supplement: group S (standard) received diet supplemented with soybean oil (2%); group LA (control) received diet supplemented with linoleic acid from safflower oil (2.6%); group CLA received diet supplemented with a mixture of *c9,t11* and *t10,c12* CLA Tonalin® (2.5%); group P received diet supplemented with phytosterol Vegapure® 95FF (4%); and group CLA+P received diet supplemented with a mixture of CLA (2.5%) and phytosterols (4%). The weight gain was monitored weekly and the food intake every 2 days during the experimental period. The feed efficiency ratio (FER= weight gain (g) / food intake (g)) was calculated.

## **Blood and tissue collection for biochemical analysis**

After 9 weeks on the experimental diet, the animals were sacrificed by decapitation preceded by 12 hour fasting. Blood samples were collected in polyethylene tubes to obtain serum. Tubes were centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  (3000 rpm for 15 minutes). After that, supernatant serum was separated, and stored in polypropylene microtubes at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the day of the analysis. Liver, heart, kidneys and epididymal fat were removed and weighed. Liver was frozen in liquid nitrogen and after was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis. The relative

organs weights (RWL= (wet liver weight (g) x 100) / final body weight (g)) were also calculated.

### **Measurement of serum metabolites**

Serum total cholesterol (01400), high-density lipoprotein (HDL-cholesterol) (08900), triglycerides (02700), glucose (02200) (Laborlab Laboratory Products Ltd. Brazil) and nonesterified fatty acid (NEFA) (HR Series NEFA-HR 2, ACS-ACOD *method*, Wako Pure Industries, Ltd. Osaka, Japan) were determined using commercial enzymatic colorimetric assays kits following manufacturer's protocol. Serum adiponectin (EZRADP-62K), ghrelin (EZRGRT-91K), insulin (EZRMI-13K) and leptin (EZRL-83K) were analyzed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (Millipore, MA, USA) following manufacturer's protocol.

### **Insulin Resistance and $\beta$ Cell Function**

The degree of insulin resistance was estimated by a homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), which was calculated according to the formula:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{fasting serum glucose (mmol/L)} \times \text{fasting serum insulin (mU/L)}] / 22.5$$

$\beta$  cell function was assessed by the homeostasis model assessment of  $\beta$  cell function (HOMA-BCF) score and calculated as follows:

$$\text{HOMA-BCF} = [20 \times \text{fasting serum insulin (mU/L)}] / [\text{fasting serum glucose (mmol/L)} - 3.5].$$

Insulin values for the calculations were expressed in international units (1 IU=0.04167 mg) [25].

### **Intraperitoneal glucose tolerance test (iGTT) and insulin tolerance test (ITT)**

The iGTT and ITT were performed 2 and 1 week before the sacrifice, respectively. For iGTT, blood sample was collected from the tail vein after 12-h-fasting and glucose was determined by Hemo Gluco test (HGT) (*Optium mini blood glucose monitoring system, Abbott*). After that, an intraperitoneal injection of D-glucose (1.1 mmol/kg) was administered and blood samples were again drawn at 30, 60, 90 and 120 min for determination of glucose. For the insulin tolerance test (ITT), blood sample was collected from the tail vein after 12-h-fasting and glucose was determined by HGT. After that, an intraperitoneal injection of human insulin (0.75 Mu/kg) was administered and blood samples were again drawn at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min for determination of glucose. The iGTT results were expressed as the area under the curve of glucose concentration x time (AUC) and ITT results in mg/dL were used to calculate the rate constant for blood glucose disappearance ( $K_{ITT}$  %/min) using the formula  $0.693/(t_{1/2})$ . The glucose  $t_{1/2}$  was calculated from the slope of the least-squares analysis of the glucose concentrations during the linear phase of decline [26].

### **Determination of body composition**

The assessment of body composition was performed according to Park et al. [27]. The carcass was frozen, sliced, lyophilized, crushed and stored at -20°C. Body protein was determined by the semi-micro Kjeldahl method and ashes were quantified by means of sample incineration in a muffle furnace. These analyses were performed as described by AOAC [23]. Body total fat was determined by the method of Bligh and Dyer extraction [24].

## **Hepatic and fecal lipids content**

After euthanasia, liver was lyophilized, milled, and stored at -80°C for subsequent analyses. Feces were collected for 7 days during the final week of the experiment to determine the wet and dry weight by incubation for 24 hours at 60°C. Then, feces were milled and stored at -20°C. Hepatic and fecal total lipids contents were determined by the method of Bligh and Dyer extraction [24].

## **Statistical analysis**

Data are expressed as means values  $\pm$  S.E.M. Differences among the groups (S, LA, CLA, P and CLA+P) were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test using *Statistical Analysis System* 9.1.3 software [28].  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Feed intake and growth**

Daily food intake was statistically ( $p < 0.05$ ) lower in CLA group compared to P group. However, there was no significant difference among the experimental groups for initial or final body weight and weight gain ( $p > 0.05$ ) (Table 3).

### **Organs weight and body composition**

The average liver weight for CLA group was  $3.28 \pm 0.08$  g, which was 12% higher ( $p < 0.05$ ) compared to S and P groups, whose livers' average weights were  $2.91 \pm 0.06$  and  $2.88 \pm 0.08$ g, respectively (Fig.1A). However, it is possible to observe that there was no significant difference in hepatic lipid content among the groups ( $p > 0.05$ ) (Table 4).

There was no significant difference among the experimental groups for kidneys (Fig.1B) and heart (Fig.1C) weights ( $p>0.05$ ).

The group that received diet supplemented with CLA+P showed a decrease of 42% ( $p<0.05$ ) in epididymal adipose tissue weight ( $0.49 \pm 0.03$  g) compared to S ( $0.70 \pm 0.04$  g) and LA ( $0.75 \pm 0.07$  g) groups (Fig.1D). But this reduction was not sufficient to reduce body weight or total fat mass of animals, since there was no significant difference for any components of the body composition, such as body fat, body protein and ashes among the experimental groups ( $p>0.05$ ) (Table 3).

Table 3. Body weights, weight gain, food intake, food efficiency ratio (FER) and body composition in rats fed S, LA, CLA, P and CLA+P diets.\*

| Variables                | S                          | LA                        | CLA                        | P                         | CLA+P                     |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Initial body weight (g)  | 90.11 ± 9.0                | 89.61 ± 7.83              | 84.16 ± 7.69               | 89.90 ± 7.53              | 83.51 ± 7.04              |
| Final body weight (g)    | 179.94 ± 10.94             | 181.13 ± 10.76            | 171.86 ± 8.21              | 181.93 ± 11.08            | 185.29 ± 9.67             |
| Body weight gain (g/day) | 1.43 ± 0.05                | 1.45 ± 0.06               | 1.39 ± 0.04                | 1.46 ± 0.09               | 1.62 ± 0.08               |
| Food intake (g/day)      | 7.46 ± 0.43 <sup>ab</sup>  | 7.62 ± 0.33 <sup>ab</sup> | 7.09 ± 0.31 <sup>b</sup>   | 8.18 ± 0.41 <sup>a</sup>  | 7.82 ± 0.37 <sup>ab</sup> |
| Food intake (kcal/day)   | 32.90 ± 1.88 <sup>ab</sup> | 34.0 ± 1.49 <sup>ab</sup> | 31.98 ± 1.38 <sup>b</sup>  | 36.88 ± 1.87 <sup>a</sup> | 36.26 ± 1.74 <sup>a</sup> |
| FER                      | 0.19 ± 0.01 <sup>ab</sup>  | 0.19 ± 0.01 <sup>ab</sup> | 0.20 ± 0.01 <sup>ab</sup>  | 0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>  |
| % body composition**     |                            |                           |                            |                           |                           |
| Fat                      | 7.3 ± 0.18                 | 7.94 ± 0.51               | 6.81 ± 0.13                | 6.77 ± 0.42               | 6.96 ± 0.33               |
| Protein (N = 6.25)       | 20.58 ± 0.36               | 21.9 ± 0.54               | 21.25 ± 0.27               | 21.26 ± 0.17              | 21.52 ± 0.25              |
| Ash                      | 3.87 ± 0.07                | 4.16 ± 0.07               | 4.04 ± 0.06                | 3.97 ± 0.08               | 3.86 ± 0.09               |
| Humidity                 | 68.04 ± 0.28 <sup>a</sup>  | 65.57 ± 0.85 <sup>b</sup> | 67.49 ± 0.39 <sup>ab</sup> | 68.0 ± 0.42 <sup>a</sup>  | 67.66 ± 0.43 <sup>a</sup> |

S: group receiving diet supplemented with soybean oil, LA: group receiving diet supplemented with safflower oil, CLA: group receiving diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA), P: group receiving diet supplemented with phytosterols, and CLA+P: group receiving diet supplemented with conjugated linoleic acid plus phytosterols.\*Values expressed as means ± S.E.M, n=8/group. Means followed by at different letters in the same line indicate statistical differences by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).\*\*Values expressed on dry basis.

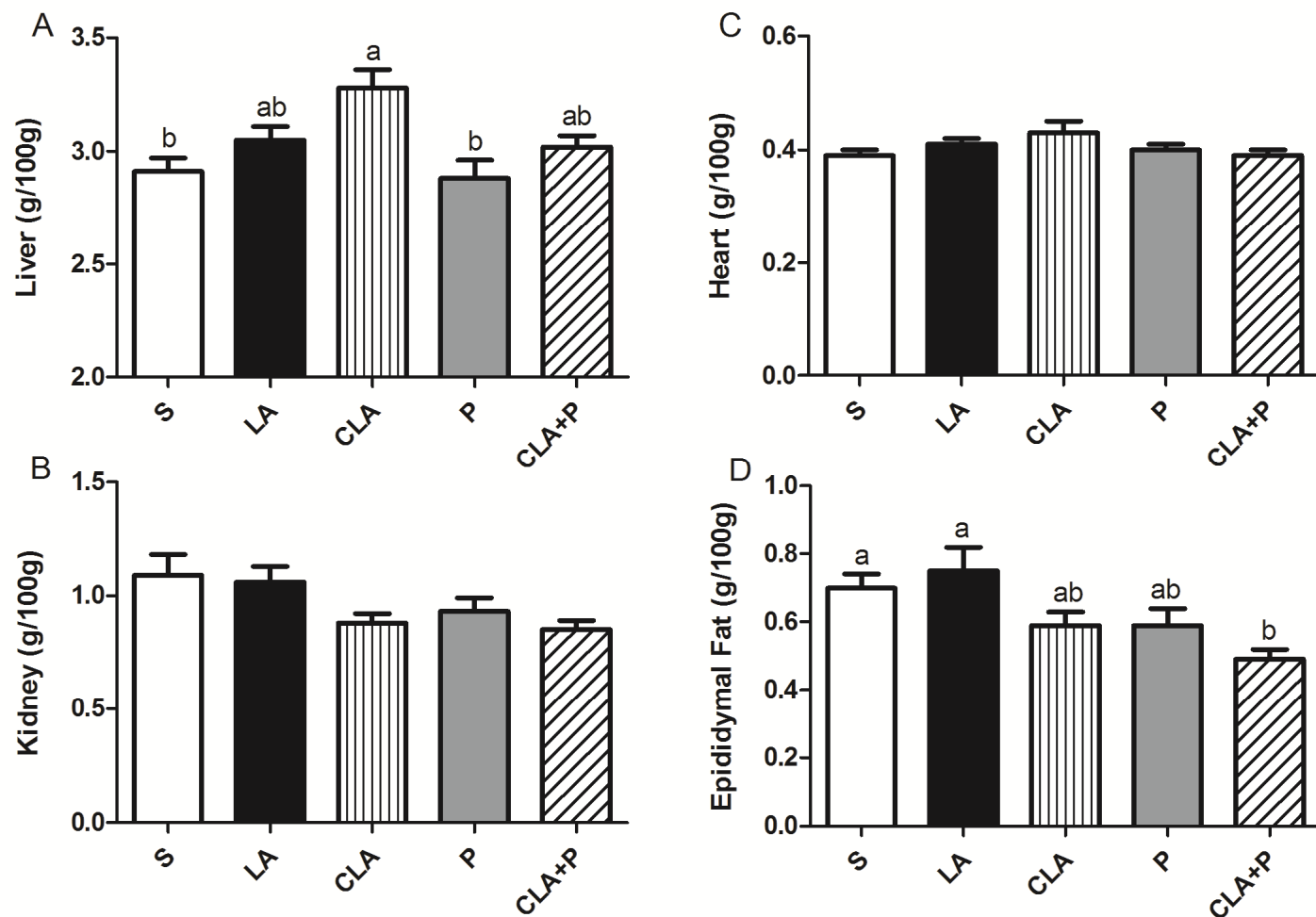


Fig. 1. Liver (A), kidneys (B), heart (C) and epididymal fat tissue (D) weights of *Sprague Dawley* rats fed supplemented diets containing soybean oil (S), safflower oil (LA), conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols (P) and conjugated linoleic acid with phytosterols (CLA+P) for 9 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n=8/group. Values with different letters indicate significant difference by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

Table 4. Fasting serum lipids, hepatic lipid content and serum glucose in rats fed S, LA, CLA, P and CLA+P diets\*

| <b>Variables</b>          | <b>S</b>                    | <b>LA</b>                  | <b>CLA</b>                   | <b>P</b>                    | <b>CLA+P</b>                 |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Serum cholesterol (mg/dL) | 57.29 ± 1.6                 | 63.89 ± 2.4                | 60.73 ± 0.66                 | 60.92 ± 2.52                | 62.02 ± 2.01                 |
| HDL- cholesterol (mg/dL)  | 35.41 ± 2.24                | 37.06 ± 2.79               | 36.72 ± 2.42                 | 39.64 ± 1.89                | 41.32 ± 2.16                 |
| Triglycerides (mg/dL)     | 69.71 ± 5.24                | 71.58 ± 8.83               | 73.43 ± 5.17                 | 77.91 ± 4.81                | 74.29 ± 7.74                 |
| NEFA (mmol/L)             | 0.60 ± 0.05                 | 0.62 ± 0.05                | 0.61 ± 0.06                  | 0.75 ± 0.08                 | 0.76 ± 0.02                  |
| Hepatic lipids (g/100g)   | 18.13 ± 0.75                | 16.62 ± 0.76               | 15.40 ± 0.5                  | 16.77 ± 0.39                | 17.13 ± 0.57                 |
| Glucose (mg/dL)           | 117.23 ± 3.43 <sup>ab</sup> | 134.92 ± 5.03 <sup>a</sup> | 130.96 ± 7.1 <sup>ab</sup>   | 113.54 ± 3.42 <sup>b</sup>  | 126.64 ± 3.63 <sup>ab</sup>  |
| HOMA-IR                   | 3.84 ± 0.76                 | 6.27 ± 1.25                | 5.71 ± 0.87                  | 5.34 ± 0.6                  | 6.45 ± 0.77                  |
| HOMA-BCF                  | 94.22 ± 20.64 <sup>b</sup>  | 93.87 ± 17.98 <sup>b</sup> | 107.79 ± 19.95 <sup>ab</sup> | 141.96 ± 19.01 <sup>a</sup> | 117.68 ± 14.92 <sup>ab</sup> |

S: group receiving diet supplemented with soybean oil, LA: group receiving diet supplemented with safflower oil, CLA: group receiving diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA), P: group receiving diet supplemented with phytosterols and CLA+P: group receiving diet supplemented with conjugated linoleic acid plus phytosterols. HDL-cholesterol: high-density lipoprotein; NEFA: non-esterified fatty acids. HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance; HOMA-BCF: Homeostasis model assessment of  $\beta$  cell function. \*Values expressed as means  $\pm$  S.E.M, n=8/group. Means followed by at different letters in the same line indicate statistical differences by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

## Lipid and hormone profile

There was no significant difference among the experimental groups for serum total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and NEFA ( $p>0.05$ ) (Table 4). Furthermore, we noted that the serum HDL-cholesterol values were 16% increased (not statistically significant) for CLA+P group.

The fecal fat excretion was 6 times higher for P and CLA+P groups compared to other groups ( $p<0.05$ ) (Fig. 2).

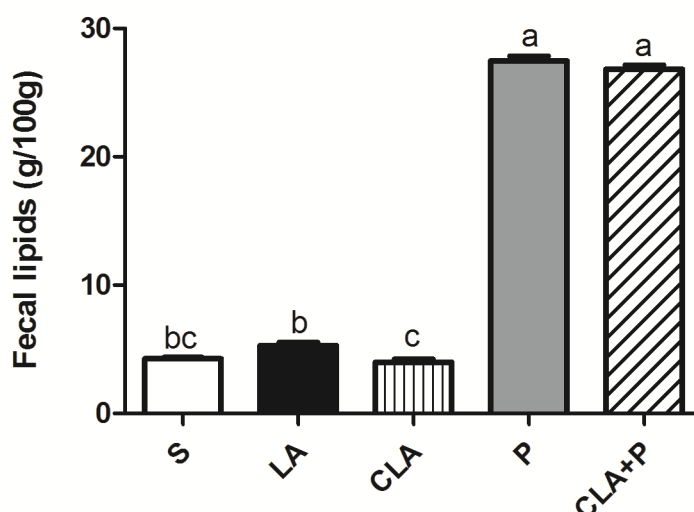


Fig. 2. Fecal lipids content in *Sprague Dawley* rats fed supplemented diets containing soybean oil (S), safflower oil (LA), conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols (P) and conjugated linoleic acid with phytosterols (CLA+P) for 9 weeks. Feces were collected for seven consecutive days prior to sacrifice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M;  $n=8$ /group. Values with different letters indicate significant difference by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

The fasting serum leptin concentration in CLA group was  $0.75 \pm 0.16$  ng/mL, which was significantly lower ( $p<0.05$ ) compared to the concentration of control group (LA) ( $1.88 \pm 0.51$  ng/mL) (Fig.3A). There was no significant difference among the experimental groups for serum ghrelin concentrations ( $p>0.05$ ) (Fig.3B). But differences in serum adiponectin concentrations were observed for CLA and P groups, with highest and lowest

values, respectively, while CLA+P group showed adiponectin levels similar to S group (Fig.3C).

### **Insulin resistance**

The fasting serum glucose concentration decreased significantly ( $p < 0.05$ ) in P group compared to the LA group (Table 4). Fasting serum insulin concentration was significantly ( $p < 0.05$ ) increased in animals that received diet supplemented with CLA+P compared to the S group (Fig.3D). Changes in HOMA-IR were not observed in experimental groups ( $p > 0.05$ ), but alterations in  $\beta$  cell function were observed in P group which was significantly ( $p < 0.05$ ) increased compared to S and LA groups, as indicated by HOMA-BCF. In this way, the group that received diet supplemented with phytosterols presented a better  $\beta$  cell secretory capacity, which is confirmed by the reduction of blood glucose (Table 4).

There was no significant difference among the experimental groups for the intraperitoneal glucose tolerance test (iGTT) (Fig 4A,B) and insulin tolerance test (ITT) ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4C,D).

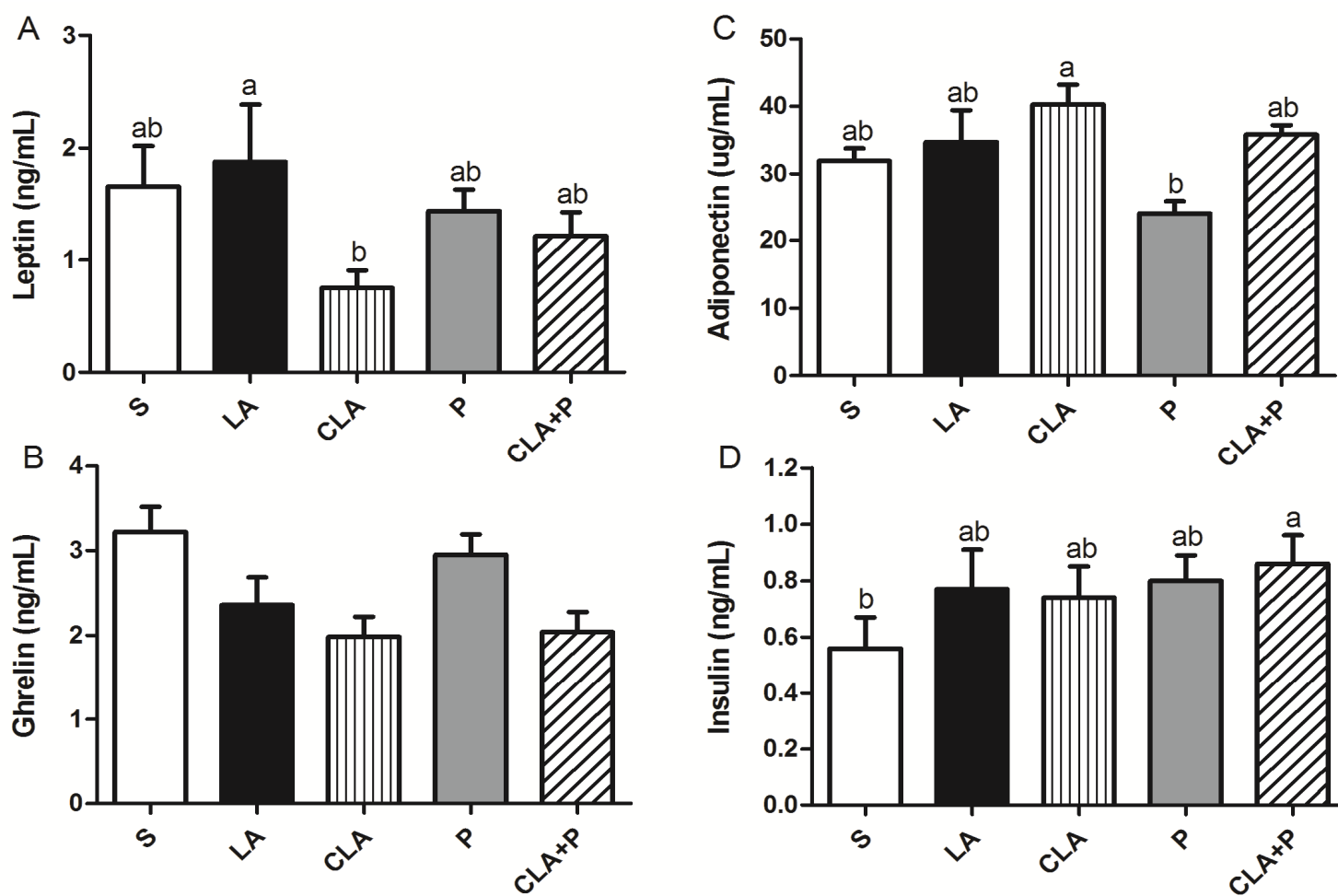


Fig. 3. Fasting serum leptin (A), ghrelin (B), adiponectin (C), and insulin (D) in *Sprague Dawley* rats fed supplemented diets containing soybean oil (S), safflower oil (LA), conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols (P) and conjugated linoleic acid with phytosterols (CLA+P) for 9 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n=8/group. Values with different letters indicate significant difference by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

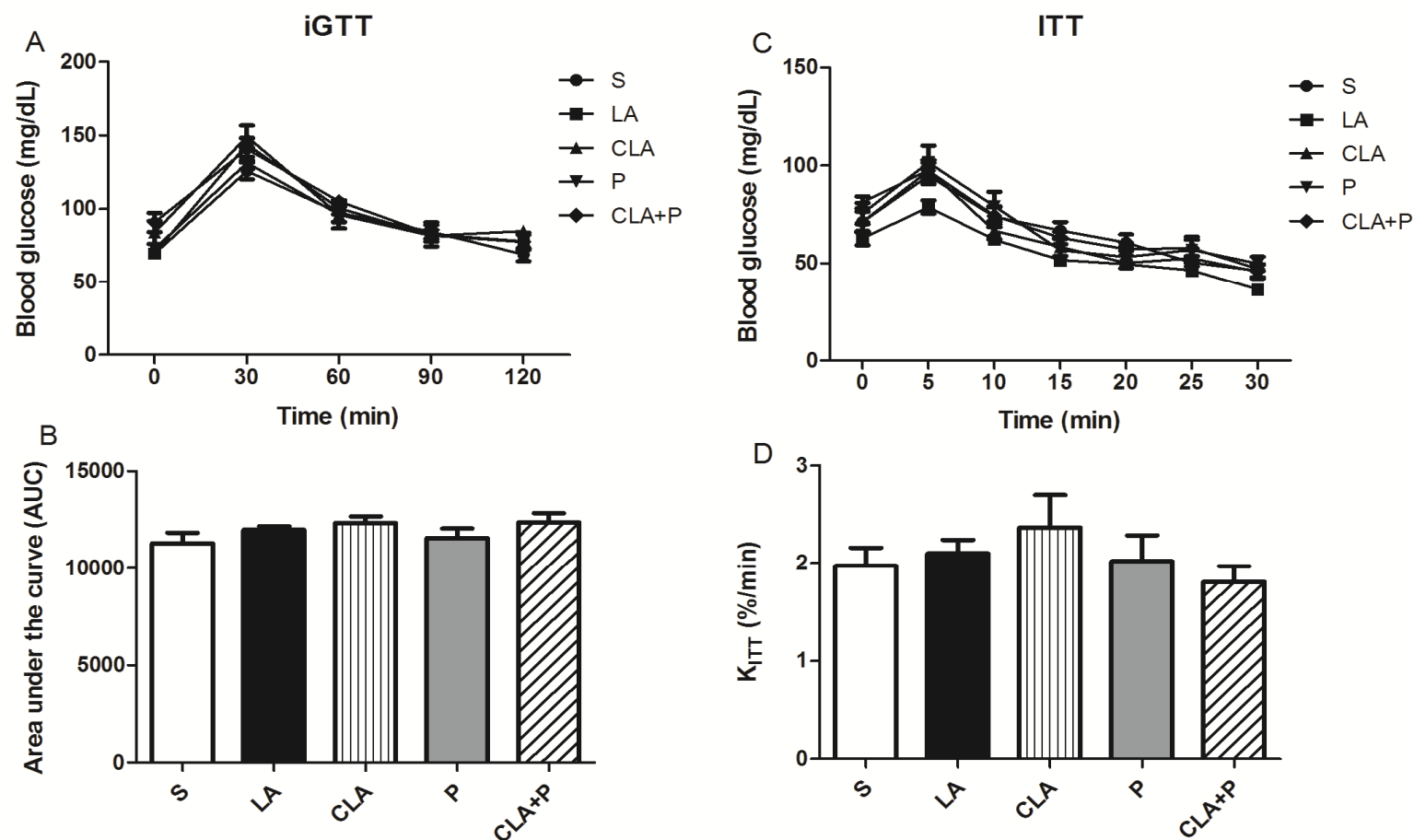


Fig. 4. Blood glucose after a intravenous glucose (A,B) and insulin (C,D) administration: 1.1 mmol/kg glucose and 0.75 Mu/kg insulin (i.p) in *Sprague Dawley* rats fed supplemented diets containing soybean oil (S), safflower oil (LA), conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols (P) and conjugated linoleic acid with phytosterols (CLA+P) for 9 weeks. The blood samples were collected from the tail vein at 30, 60, 90 and 120 min after the glucose injection for the iGTT and at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min after the insulin injection for the ITT. The iGTT and ITT were performed 2 and 1 week before the sacrifice, respectively, after 12-h-fasting. The iGTT (B) are expressed as area under the curve and the ITT results in mg/dL were used to calculate the rate constant for blood glucose disappearance ( $K_{ITT}$  %/min) (D). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n=8/group.

## Discussion

To our knowledge, this is the first study to investigate the potential effect of dietary association between CLA and phytosterols on hormonal and lipid profile and in insulin resistance in animals. However, many researchers have studied the effects of isolated CLA and phytosterols supplementation on different aspects in several distinct experimental animal models.

The studies about the effects of CLA on diet intake, body weight gain and body composition published so far were not conclusive. Some investigations reported that CLA can promote an increase in lean body mass, reduction on body weight gain and body fat mass and decrease energy intake [27,29-34]; some others observed no effect on food intake nor on body weight in animals [29,32,35-37]. Furthermore, the effects of CLA are related to the type and dose of the specific CLA isomer, the kind and amount of dietary fat, the time of feeding, and the animal model used, among other factors.

The supplements combination (CLA and phytosterols) also did not change weight gain and body composition, but decreased epididymal adipose tissue, despite the higher energy value of this combination compared with the other diets. These results are in agreement with those obtained by Misawa et al. [20], who reported that phytosterols isolated from *Aloe vera* gel reduced visceral fat mass without reduction of body weight and food intake in *Zucker diabetic fatty* (ZDF) rats after 44 days of treatment. Therefore, these finds suggest that the association between CLA and phytosterols could be used to prevent visceral fat obesity, which may contribute to prevention of metabolic syndrome.

Although the increased liver weight found in the group that received diet supplemented with CLA, there was no lipid accumulation in this organ. The data of the present study confirmed that CLA-induced liver enlargement in *Sprague Dawley* rats is

prevented by supplementation with phytosterols. There are paradoxical findings that CLA, particularly the *t10,c12* isomer, causes liver hypertrophy [10,38,39] accompanied by increase tissue lipid content and steatosis in mice [8,10,40], whereas some investigators using different animal models found no difference in liver weight or in hepatic lipids [33,41,42], and others found a decrease in hepatic steatosis [31,35,43], improve liver function and favorably modified lipid metabolism [43].

Furthermore, some authors have reported the influence of phytosterols on lipid metabolism in the liver, which could explain the reduction of this organ in the group fed with phytosterols. Chien *et al.* [44] showed that hamsters fed with 0.74% phytosterols showed significant lower liver weight, and the result was similar to the ones described by Ntanios and Jones [45], which reported that hamsters fed with high cholesterol diet and 1% sitostanol could reduce 20% relative liver weight. Other recent research demonstrated that *Aloe vera* phytosterols could act as ligands of PPAR and improve the lipid metabolism and energy production in the liver of mice fed with diet-induced obesity [46].

In the present data we did not find any difference in serum lipid profile among the experimental groups, which is consistent with some studies that used CLA or phytosterols supplemented in isolated form and found no significant effect on lipid levels [16,33,36,40,47], whereas others studies showed that both plant sterol and stanol esters lower serum total cholesterol or LDL-cholesterol concentrations, with no effect, either on serum HDL-cholesterol concentrations or on triacylglycerol levels [13,48,49].

The animals who received phytosterols showed increased in fecal fat excretion. Some studies showed that phytosterols are slightly absorbed, but the exact extent of absorption is not a consensus. Plant sterol absorption by various animal species showed absorption ranging from 0% (rabbit) to 4% (rat), and 6% (human) [50,51], which could explain the high level of fecal fat excretion in animals that received phytosterols, with or

without CLA. A higher fat excretion is related to a lower fat absorption, which would reduce serum cholesterol levels and the body weight of animals, but these changes were not found in our data, since the increase in fat excretion by phytosterols did not improve lipid profile in experimental groups.

Although the isolated supplementation of phytosterols had decreased serum glucose and improved HOMA-BCF, the association between CLA+P increased serum insulin concentration, without impairment of insulin sensitivity. The increase in serum insulin but not in serum glucose concentration, HOMA-IR and HOMA-BCF nor in glucose and insulin tolerance testes indicated a probably no conditions of insulin resistance present in the CLA+P-fed rats, that could be observed by the increase of glucose responsiveness of the insulin secreting pancreatic beta cells. Recently some authors found that phytosterols derived from *Aloe vera* or phytostanol phosphoryl ascorbate would be useful for the improvement of hyperglycemia and insulin resistance in ZDF and lean rats and diabetic db/db mice [18-20].

In the present data we also did not find impairment of insulin sensitivity by the CLA supplementation, since the levels of insulin, glucose, HOMA-IR, HOMA-BCF, iGTT and ITT were not modified in these animals, which are similar to the results of Parra, Serra and Palou [33]. Furthermore, the results obtained in various rodent models concerning the effects of CLA on insulin sensitivity have been controversial. Data from the literature show that CLA improves insulin sensitivity and glucose tolerance in rats and mice [47,52-54], whereas others studies showed that CLA exacerbates insulin resistance in mice [8,10,29]. These results suggest that the effects of CLA on insulin sensitivity depend on species and/or metabolic status.

The relationship between adipose tissue function and glucose and lipid metabolisms may be mediated, at least in part, by the plasma adipokines. A reduction in adiposity is

usually accompanied by a reduction in plasma leptin and increase in plasma adiponectin levels [55]. In the present work we found this hormonal change for the CLA group, but without reduction of body fat. Leptin, a product of the obese gene, is secreted primarily by adipocytes and plays an important role in regulating energy balance via its action on feed intake and energy expenditure [56]. Several investigations have shown a significant reduction in serum leptin concentration caused by the supplementation with CLA isomers accompanied by the reduction of fat accumulation in different experimental models [33,39,42,54,57].

Previous studies have shown an increase in adiponectin expression and serum concentrations in diabetic Zucker fa/fa rats fed a diet containing 1% of CLA mixture [52], also an increase in adiponectin secretion in cultures of differentiating 3T3-L1 adipocytes treated with the *c9,t11* CLA isomer [57] and that adiponectin protects against metabolic disorders and inflammation, enhances insulin action, suggesting that it protects against insulin resistance [52]. However, other studies have reported that CLA decreases adiponectin production in mice [33,36], whereas in humans, little or no effect of CLA on adiponectin levels have been observed [58,59]. Interestingly, CLA+P group reduced the epididymal adipose tissue without altering the hormonal profile, and the P group showed a reduction in serum adiponectin concentration without impairment of insulin sensitivity.

## **Conclusion**

In summary the dietary combination of CLA and phytosterols did not alter weight gain, body composition and lipid and hormone profile, but was able to attenuate adipose tissue weight, without impairment of insulin sensitivity and hepatic injury to *Sprague Dawley* rats. Beneficial or adverse effects were observed when these supplements were

administered alone. Further studies are needed to elucidate the mechanisms of action of this association in the parameters evaluated.

## References

- [1] Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 2001;40:283–98.
- [2] Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J Nutr* 2000;130:2285–2291.
- [3] Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 1992;5:185–197.
- [4] Kepler CR, Hirons KP, McNeill JJ, Tove SB. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1966;241:1350-1354.
- [5] Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987;8:1881–1887.
- [6] Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acid in health and disease. *J Nutr Biochem* 2006;17:789-810.
- [7] Park Y. Conjugated linoleic acid (CLA): good or bad trans fat? *J Food Comp Analysis* 2009;22:388-393.
- [8] Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 2000;49:1534–42.

- [9] Risérus U, Vessby B, Ärnlov J, Basu S. Effects of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. *Am J Clin Nutr* 2004;80:279-283.
- [10] Clement L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, et al. Dietary *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 2002;43:1400–9.
- [11] Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 2002;41:457-500.
- [12] Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J Agric Food Chem* 2005;53(24):9436–45.
- [13] Kritchevsky D, Chen SC. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. *Nutr Res* 2005;25:413-28.
- [14] Ling WH, Jones PJH. Minireview dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 1995;57:195-206.
- [15] Moghadasian MH, Frohlich JJ. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med* 1999;107:588-94.
- [16] Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem* 2003;14:362-9.
- [17] Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2000;151:357-79.
- [18] Tanaka M, Misawa E, Ito Y, Habara N, Nomaguchi K, Yamada M, et al. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as antidiabetic compounds. *Biol Pharm Bull* 2006;29:1418-22.

- [19] Wasan KM, Zamfir C, Pritchard PH, Pederson RA. Influence of phytosterol phosphoryl ascorbate (FM-VP4) on insulin resistance, hyperglycemia, plasma lipid levels, and gastrointestinal absorption of exogenous cholesterol in Zucker (fa/fa) fatty and lean rats. *J Pharm Sci* 2003;92:281-8.
- [20] Misawa E, Tanaka M, Nomaguchi K, Yamada M, Toida T, Takase M, et al. Administration of phytosterols isolated from *Aloe vera* gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Obes Res Clin Prac* 2008;2:239-245.
- [21] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. 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. *J Nutr* 1993;123:1939-1951.
- [22] Goena M, Marzo F, Fernández-González AL, Tosar A, Frühbeck G, Santidrián S. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Rev Esp Fisiol* 1989;45:55-60.
- [23] AOAC. Official methods of analysis of AOAC 16. ed. International CUNNIF, P. ed., Virgínia: AOAC International; 1995. v.1.
- [24] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
- [25] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419.
- [26] Bonora P, Moghetti C, Zancanaro M, Cigolini M, Querena V, Cacciatori A, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:374-8.

- [27] Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 1997;32:853-858.
- [28] SAS Institute Project for Windows: User's Guide: statistics. Version 8.0. Cary: USA inst., 2003.
- [29] DeLany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JA, West DB. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 1999;276:1172-1179.
- [30] Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW. Evidence that the *trans-10,cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 1999;34:235–241.
- [31] Andreoli MF, Scalerandi MV, Malan Borel I, Bernal CA. Effects of CLA at different fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion. *Nutrition* 2007;23:827–35.
- [32] Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* 2000;130:1548–1554.
- [33] Parra P, Serra F, Palou A. Moderate doses of conjugated linoleic acid isomers mix contribute to lowering body fat content maintaining insulin sensitivity and a noninflammatory pattern in adipose tissue in mice. *J Nutr Biochem* 2010;21:107-115.
- [34] Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, Pariza MW. Changes in body composition in mice during feeding and with drawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 1999;34:243–248.
- [35] Purushotham A, Shrode GE, Wendel AA, Liu L, Belury MA. Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult *Wistar* rats. *J Nutr Biochem* 2007;18:676-684,2007.

- [36] Cooper MH, Miller JR, Mitchell PL, Currie DL, McLeod RS. Conjugated linoleic acid isomers have no effect on atherosclerosis and adverse effects on lipoprotein and liver lipid metabolism in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a high-cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2008;200:294-302.
- [37] Simón E, Macarulla MT, Churruca I, Fernández-Quintela A, Portillo MP. *Trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid prevents adiposity but not insulin resistance induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Nutr Biochem* 2006;17:126-131.
- [38] Andreoli MF, Gonzalez MA, Martinelli MI, Mocchiutti NO, Bernal CA. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. *Nutrition* 2009;25:445-452.
- [39] Halade GV, Rahman D, Fernandes G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57B1/6J mice. *J Nutr Biochem* 2010;21:332-337.
- [40] Warren JM, Simon VA, Bartolini G, Erickson KL, Mackey BE, Kelley DS. *Trans-10, cis-12* CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. *Lipids* 2003;38:497–504.
- [41] Alasnier C, Berdeaux O, Chardigny JM, Sébédio JL. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols. *J Nutr Biochem* 2002;13:337-345.
- [42] Rahman SM, Wang Y, Yotsumoto H, Cha J, Han S, Inoue S, et al. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 2001;17:385–90.
- [43] Noto A, Zahradka P, Yurkova N, Xie X, Nitschmann E, Ogborn M, et al. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. *Lipids* 2006;41:179–88.

- [44] Chein YL, Wu LY, Lee TC, Hwang LS. Cholesterol-lowering effect of phytosterol-containing lactic-fermented milk powder in hamsters. *Food Chemistry* 2010;119(3):1121-1126.
- [45] Ntanios FY, Jones PJ. Effects of variable dietary sitostanol concentrations on plasma lipid profile and phytosterol metabolism in hamsters. *Biochim Biophys Acta* 1998;1390:237–244.
- [46] Nomaguchi K, Tanaka M, Misawa E, Yamada M, Toida T, Iwatsuki K, et al. *Aloe vera* phytosterols act as ligands for PPAR and improve the expression levels of PPAR target genes in the livers of mice with diet-induced obesity. *Obes Res Clin Pract* 2011;5:190-201.
- [47] Choi JS, Jung MH, Park HS, 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* 2004;20:1008-1017.
- [48] Plat J, van Onselen EN, van Heugten MM, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:671-7.
- [49] Mensink RP, Ebbing S, Lindhout M, Plat J, van Heugten MM. Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis* 2002;160:205-13.
- [50] Pollak OJ, Kritchevsky D. Sitosterol. Basel, S. Karger; 1981.
- [51] Ostlund-Jr RE, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:911–916.

- [52] Nagao K, Inoue N, Wang YM, Yanagita T. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:562–6.
- [53] Hamura M, Yamatoya H, Kudo S. Glycerides rich in conjugated linoleic acid (CLA) improve blood glucose control in diabetic C57BLKS-Leprdb/leprdb mice. *J Oleo Sci* 2001;50:889–94.
- [54] Zhou XR, Sun CH, Liu JR, Zhao D. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR gamma gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. *Growth Horm IGF Res* 2008;18:361-368.
- [55] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of Adiponectin in Preventing Vascular Stenosis. The Missing Link of Adipo-vascular Axis. *J Biol Chem* 2002;277:37487–37491.
- [56] Koutsari C, Karpe F, Humphreys SM, Frayn KN, Hardman AE. Plasma leptin is influenced by diet composition and exercise. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:901–906.
- [57] Ahn IS, Choi BH, Ha JH, Byun JM, Shin HG, Park KY, et al. Isomer-specific effect of conjugated linoleic acid on inflammatory adipokines associated with fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 2006;9:307-312.
- [58] Risérus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 2004;47:1016–1019.
- [59] Gaullier JM, Halse J, Hoivik HO, Høy K, Syvertsen C, Nurminiemi M, et al. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. *Br J Nutr* 2007;97:550–560.

## CAPÍTULO II

---

## ARTIGO II

### ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE COMBINATION OF CONJUGATED LINOLENIC ACID AND PHYTOSTEROLS IN *SPRAGUE DAWLEY* RATS

RAFAELA DA SILVA MARINELI<sup>1\*</sup>, MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JR.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, São Paulo State, Brazil.

\*Corresponding author. Email address: [rafanutr@fea.unicamp.br](mailto:rafanutr@fea.unicamp.br) Tel.: +55 19 3521-4068; fax: +55 19 3521-4060. Address: Monteiro Lobato st., 80, zip code 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

#### Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and phytosterols supplementation and their combination on oxidative profile and in lipid peroxidation in rats. Forty male *Sprague Dawley* rats received diets supplemented with 2% of lipid compounds of interest: soybean oil (group S) (standard), linoleic acid from safflower oil (group LA) (control), mixture of *c9,t11* and *t10,c12* CLA (group CLA), phytosterols (group P) and mixture of CLA and phytosterols (group CLA+P) for 9 weeks. Plasma isoprostane, glutathione and malondialdehyde levels, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities and lipid peroxidation products in liver were determined as indicators of lipid autoxidation and oxidative profile. The supplementation with the mixture of CLA and phytosterols did not alter food intake, weight gain, plasma malondialdehyde and glutathione values, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities. However, the phytosterols restored the isoprostane values

and the catalase activity to the basal level, which were increased on the group that received CLA supplementation. CLA+P supplementation also decreased lipid peroxidation primary (2.3 times) and secondary (-98%) products in liver. Supplementation of isolated phytosterols and CLA was also able to reduce lipid peroxidation in liver of animals and plasma levels of malondialdehyde. In summary the dietary combination of CLA+P caused improvement in antioxidant status, reduced the lipid peroxidation and protected against possible effects of CLA supplementation on oxidative stress. However, metabolic effects of this association are divergent and not completely elucidated, so further investigations are necessary.

**Key words:** Conjugated linoleic acid, phytosterols, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

## Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) represents a group of positional and geometric isomers with conjugated double bonds of the octadecadienoic acid (18:2n-6) and is naturally produced in ruminant animals by the process of bacterial biohydrogenation of LA in rumen (1). They are found in small amounts in a large variety of foods, like in meats and dairy products and the most abundant isomer is the *cis-9, trans-11*-CLA (*c9,t11*) (2,3). Commercial preparations of CLA are made from the LA of safflower or sunflower oils under alkaline conditions and are usually a 1:1 mixture of *c9,t11* and *trans-10, cis-12* (*t10,c12*) CLA with other isomers in minor concentrations (1).

The focus on the possible effects of CLA on health started when Ha, Grimm and Pariza (4) investigated the carcinogenic properties of grilled beef. Subsequently, numerous works demonstrated several other effects of purified CLA isomers or their mixtures using animal models and clinical studies, including body composition change, prevention of atherosclerosis, enhancement of bone mineralization, immune system modulation and

improvement of insulin resistance (5,6). It has been also reported that CLA protect against oxidative stress and lipid peroxidation in animals models (7-10). On the other hand, adverse effects of CLA supplementation have also been studied, particularly regarding increased susceptibility to lipid autoxidation (11-13). However, metabolic effects of CLA in animals are divergent, not completely elucidated, and further investigations are needed, particularly concerning biological lipid oxidation (14).

Phytosterols (plant sterols) are bioactive components of all vegetable foods. In plants, more than 200 different types of phytosterols have been reported and the principal plant sterols are  $\beta$ -sitosterol (24- $\alpha$ -ethylcholesterol), campesterol (24- $\alpha$ -methylcholesterol) and stigmasterol ( $\Delta^{22}$ , 24- $\alpha$ -ethylcholesterol) (15). They have been shown to be effective, and no adverse effects have been observed when added to an increasing variety of foodstuffs, furthermore, they are listed as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the Food and Drug Administration for the general population (16,17).

They have been used as blood cholesterol-lowering agents for the last half century and the effect of these compounds on plasma lipid levels has been tested in animals and humans (18-20). Although most studies have focused on the hypocholesterolemic activity of phytosterols, other biological properties such as antioxidant activity have also been attributed to these plant compounds in foods and animals models (21-23).

In view of a possible pro-oxidant action of CLA resulting from the fact that it is a conjugated diene, there is a hypothesis that its supplementation in association with the antioxidant protection could minimize the deleterious action of CLA on the process of biological lipid oxidation. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of dietary CLA and phytosterols supplementation, alone or in combination, on the process of lipid autoxidation and in oxidative profile in healthy *Sprague Dawley* rats.

## **Materials and Methods**

### **Supplements**

Safflower oil, conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®) and phytosterol Vegapure® 95FF were supplied by *Cognis Brasil Ltd.*

### **Determination of fatty acids profiles of soybean oil, safflower oil, conjugated linoleic acid and phytosterols**

The fatty acid (FA) compositions of the different lipid supplements (soybean oil, safflower oil, conjugated linoleic acid and phytosterols) were determined by gas chromatography (GC) (24) using a capillary gas chromatography *Agilent 6850 Series GC System*, capillary column DB-23 *Agilent* (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane, 60m x 0.25mm x 0.25µm); helium was used as carrier gas. Samples methylation and esterification were performed as described by Maia and Rodriguez-Amaya (25). Fatty acid methyl esters of the sample were identified by the comparison of their relative retention times with those of commercial standard esters under the same conditions. The fatty acids profile of lipid supplements is presented in Table 1.

### **Phytosterols analysis**

The identification and quantification of phytosterols in lipid supplements (soybean oil, safflower oil, conjugated linoleic acid and phytosterols) were performed by gas chromatography (26) using a gas chromatography *Agilent 6850 Series GC System* equipped with automatic injector, FID detector, *software Agilent Chemstation Plus, version A.08xx* and a fused silica capillary column LM 5 (5% fenil 95% metilpolisiloxane, 30m x 0.25mm x 0.3µm). The phytosterols profile of lipid supplements is presented in Table 2.

Table 1. Fatty acids profiles of lipid supplements used to prepare the experimental diets

| Fatty acids         | Soybean oil | Safflower oil | CLA Tonalin® | Phytosterol<br>Vegapure® 95FF |
|---------------------|-------------|---------------|--------------|-------------------------------|
| C6:0                | -           | 0.03          | 0.04         | -                             |
| C8:0                | -           | 0.03          | 0.04         | -                             |
| C10:0               | -           | -             | 0.04         | -                             |
| C12:0               | -           | 0.03          | 0.04         | -                             |
| C14:0               | 0.08        | 0.10          | 0.04         | -                             |
| C15:0               | 0.03        | 0.03          | -            | -                             |
| C16:0               | 10.66       | 6.26          | 1.86         | 6.62                          |
| C16:1               | 0.09        | 0.08          | -            | -                             |
| C17:0               | 0.09        | 0.05          | 0.05         | -                             |
| C17:1               | 0.06        | 0.03          | 0.04         | -                             |
| C18:0               | 3.19        | 2.29          | 2.84         | 3.00                          |
| C18:1               | 28.53       | 13.17         | 13.86        | 23.26                         |
| C18:2 <i>trans</i>  | -           | 0.13          | 0.44         | -                             |
| C18:2               | 50.56       | 76.62         | 0.32         | 66.13                         |
| C18:2 <i>t10c12</i> | -           | -             | 40.25        | -                             |
| C18:2 <i>c9t11</i>  | -           | -             | 40.14        | -                             |
| C18:3 <i>trans</i>  | 0.43        | -             | -            | -                             |
| C18:3               | 5.02        | 0.10          | -            | -                             |
| C20:0               | 0.35        | 0.33          | -            | -                             |
| C20:1               | 0.25        | 0.18          | -            | -                             |
| C22:0               | 0.49        | 0.23          | -            | -                             |
| C22:1               | -           | 0.04          | -            | -                             |
| C24:0               | 0.17        | 0.12          | -            | -                             |
| C24:1               | -           | 0.18          | -            | -                             |
| Total               | 100         | 100           | 100          | 100                           |

CLA: conjugated linoleic acid

Table 2. Phytosterols profiles of lipid supplements used to prepare the experimental diets

| <b>Components (%)</b>          | <b>Soybean oil</b> | <b>Safflower oil</b> | <b>CLA Tonalin®</b> | <b>Phytosterol<br/>Vegapure® 95FF</b> |
|--------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Colesterol                     | 0.38               | 0.00                 | 14.15               | 0.52                                  |
| Colestanol (PI)                | -                  | -                    | -                   | -                                     |
| Brasicasterol                  | 0.00               | 0.00                 | 0.00                | 0.00                                  |
| 24-metilencolesterol           | 0.00               | 0.00                 | 0.00                | 0.00                                  |
| Campesterol                    | 16.92              | 10.51                | 22.05               | 29.59                                 |
| Campestanol                    | 1.10               | 0.65                 | 13.15               | 0.79                                  |
| Estigmasterol                  | 18.58              | 4.62                 | 12.83               | 19.42                                 |
| $\Delta$ 7-campesterol         | 0.00               | 0.00                 | 0.00                | 0.00                                  |
| $\Delta$ 5,23-estigmastadienol | 1.28               | 4.54                 | 0.00                | 0.87                                  |
| Clerosterol                    | 0.83               | 0.58                 | 0.00                | 0.59                                  |
| $\beta$ -sitosterol            | 50.80              | 44.33                | 37.82               | 44.88                                 |
| Sitostanol                     | 2.71               | 3.41                 | 0.00                | 2.38                                  |
| $\Delta$ 5-avenasterol         | 0.30               | 2.48                 | 0.00                | 0.00                                  |
| $\Delta$ 5,24-estigmastadienol | 0.35               | 1.44                 | 0.00                | 0.57                                  |
| $\Delta$ 7-estigmastenol       | 4.7                | 23.27                | 0.00                | 0.39                                  |
| $\Delta$ 7-avenasterol         | 2.05               | 4.17                 | 0.00                | 0.00                                  |
| Total                          | 100                | 100                  | 0.00                | 100                                   |
| <b>Phytosterols (g/100g)</b>   | <b>0.29</b>        | <b>0.30</b>          | <b>0.006</b>        | <b>50.53</b>                          |

CLA: conjugated linoleic acid

## Animals and diets

This work was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA - IB/UNICAMP, Protocol no. 2296-1) and followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies. Forty healthy male *Sprague Dawley* rats aged from 21 to 23 days were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation, University of Campinas. AIN93G diet was prepared monthly according to the American Society for Nutrition (27), with a protein concentration of 12% (28). After prepared, the diet was packed in dark polyethylene bags and stored at -20 °C to minimize the oxidation of fatty acids. Animals remained in individual cages for 9 weeks, including an adaptation period of 7 days, with free access to water and feed and maintained in a temperature controlled room ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 60-70% humidity), using 12 hours light/dark cycle. Animals were randomly divided in five experimental groups (n=8/group) that received diet supplemented with 2% of the compound of interest of each lipid supplement: group S (standard) received diet supplemented with soybean oil; group LA (control) received diet supplemented with safflower oil; group CLA received diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®); group P received diet supplemented with phytosterol Vegapure® 95FF; and group CLA+P received diet supplemented with a mixture of CLA and phytosterols. The weight gain was monitored weekly and the food intake every 2 days during the experimental period. The diets' compositions are presented in Table 3.

Table 3. Composition of the experimental diets (g/kg)

| <b>Ingredient</b>          | <b>S</b> | <b>LA</b> | <b>CLA</b> | <b>P</b> | <b>CLA+P</b> |
|----------------------------|----------|-----------|------------|----------|--------------|
| Casein (78% protein)*      | 153.24   | 153.24    | 153.24     | 153.24   | 153.24       |
| Corn starch                | 427      | 427       | 427        | 427      | 427          |
| Maltodextrin               | 141.8    | 141.8     | 141.8      | 141.8    | 141.8        |
| Sucrose                    | 107.43   | 107.43    | 107.43     | 107.43   | 107.43       |
| Soybean oil                | 90       | 70        | 70         | 70       | 70           |
| Cellulose                  | 50       | 50        | 50         | 50       | 50           |
| Mineral mix**              | 35       | 35        | 35         | 35       | 35           |
| Vitamin mix**              | 10       | 10        | 10         | 10       | 10           |
| L-cystine                  | 3        | 3         | 3          | 3        | 3            |
| Choline bitartrate         | 2.5      | 2.5       | 2.5        | 2.5      | 2.5          |
| Tert-Butyl Hydroquinone    | 0.014    | 0.014     | 0.014      | 0.014    | 0.014        |
| Phytosterol Vegapure® 95FF | -        | -         | -          | 40       | 40           |
| Safflower oil              | -        | 26.1      | -          | -        | -            |
| CLA Tonalin®               | -        | -         | 25.3       | -        | 25.3         |

\*To provide 12 g of protein/100 g of diet. \*\*Vitamin and mineral mixtures were prepared according to Reeves et al. [30]. S: diet supplemented with soybean oil, LA: diet supplemented with safflower oil, CLA: diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA), P: diet supplemented with phytosterols and CLA+P: diet supplemented with conjugated linoleic acid with phytosterols.

### Blood and tissue collection for biochemical analysis

The animals were sacrificed by decapitation preceded by 12 hour fasting after 9 weeks of the experimental period. Blood samples were collected in polyethylene tubes with anticoagulant EDTA to obtain plasma. Tubes were centrifuged at 4°C (3000 rpm for 15 minutes). After that, supernatant plasma was separated, and stored in polypropylene

microtubes at -80°C until analysis. Liver was removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and after was stored at -80°C for subsequent analysis.

### **Measurement of plasma oxidative profile**

Commercial kits from Cayman Chemical (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) were used to determine plasma levels of malondialdehyde (MDA) (TBARS, 10009055), glutathione (GSH, 703002), catalase (CAT, 707002), superoxide dismutase (SOD, 706002), glutathione peroxidase (GPx, 703102) and glutathione reductase (GRd, 703202). 8-isoprostane (516351) was determined by an enzyme immunoassay kit from Cayman Chemical (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

### **Hepatic lipid autoxidation products and total lipids analysis**

After euthanasia, liver was lyophilized, milled, and stored at -80°C for subsequent analyses. For the determination of the hepatic peroxide index (primary lipid autoxidation product), lipids were previously extracted from lyophilized liver samples of each animal by the method of Bligh and Dyer extraction (29) with some modifications due to sample peculiarities. After lipid extraction, peroxide index determination was performed according to the Association of Official Analytical Chemists method (30). For the computation of the peroxide index, the amount of lipids present in the chloroform solution resulting from the lipid extraction procedure of Bligh and Dyer extraction (29) was used. For the determination of hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS - secondary lipid autoxidation product), the method proposed by Sinnhuber and Yu (31) was used. The method is based in the formation of a pink-red pigment composed of 2 molecules of thiobarbituric acid and 1 of MDA.

## Statistical analysis

Data are expressed as means values  $\pm$  S.E.M. Differences among the groups (S, LA, CLA, P and CLA+P) were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test using *Statistical Analysis System* 9.1.3 software (32).  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

From the analysis of fatty acid composition it was found that safflower oil is composed by 76.62% of linoleic acid, and CLA is composed by a mixture of isomers, approximately 80% of *c9,t11* and *t10,c12* in a 1:1 ratio and 20% of other isomers. The concentration of phytosterols in the Vegapure 95FF supplement is approximately 50% of total phytosterols, and majority esterols are  $\beta$ -sitosterol (44.88%), campesterol (29.59%) and estigmasterol (19.42%). These values were used to calculate the addition of supplements to the diets (Tables 1 and 2).

Animals looked healthy during the study and tolerated well the supplemented diets. Cumulative feed intake was statistically ( $p < 0.05$ ) lower in CLA group compared to P group, but cumulative body weight was similar in all groups ( $p > 0.05$ ) (Table 4).

Table 4. Cumulative body weight gain and cumulative food intake in rats fed S, LA, CLA, P and CLA+P diets.\*

| <b>Variables</b>       | <b>S</b>                     | <b>LA</b>                    | <b>CLA</b>                  | <b>P</b>                    | <b>CLA+P</b>                 |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Cumulative weight gain | 89.82 ± 3.26                 | 91.51 ± 3.96                 | 87.70 ± 2.30                | 92.03 ± 5.72                | 101.77 ± 4.90                |
| Cumulative food intake | 469.98 ± 26.91 <sup>ab</sup> | 480.31 ± 22.52 <sup>ab</sup> | 446.66 ± 19.24 <sup>b</sup> | 515.13 ± 26.11 <sup>a</sup> | 492.35 ± 23.57 <sup>ab</sup> |

S: group receiving diet supplemented with soybean oil, LA: group receiving diet supplemented with safflower oil, CLA: group receiving diet supplemented with conjugated linoleic acid (CLA), P: group receiving diet supplemented with phytosterols, and CLA+P: group receiving diet supplemented with conjugated linoleic acid plus phytosterols.\*Values expressed as means ± S.E.M, n=8/group. Means followed by at different letters in the same line indicate statistical differences by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

The supplementation of the diet with CLA significantly increased 3.7 times plasma catalase activity (Fig.1A) and 60% plasma isoprostane values (Fig.1B) compared to S group ( $p<0.05$ ). In addition, the association between CLA and phytosterols was able to restore the catalase and isoprostane levels to basal values, since these indicators in the CLA+P group were statistically similar to S group.

There was no significant difference between the experimental groups for plasma GSH level, GRd and GPx activities ( $p>0.05$ ) (Fig.1C,D,E). Furthermore, we noted that the GSH level was moderately increased (not significant) in CLA group.

CLA and P groups showed the lowest ( $15.16 \pm 1.23$  U/mL) and highest ( $23.38 \pm 2.33$  U/mL) values in plasma SOD activity, respectively ( $p<0.05$ ). While the CLA+P group remained SOD levels similar to the S group (Fig.1F).

LA, CLA and P groups showed a significant reduction in plasma MDA values (approximately -94%) ( $p<0.05$ ) compared to the S group, but this was not observed to CLA+P group (Fig.1G).

Compared to S and LA groups, the supplementation of CLA, phytosterols and their mixtures presented a significant ( $p<0.05$ ) reduction of hepatic MDA levels (approximately -98%), which is a lipid peroxidation secondary product (Fig. 2A). Furthermore, groups that received diet supplemented with CLA, phytosterols and CLA+P showed a significant ( $p<0.05$ ) reduction in the hepatic peroxide index (lipid peroxidation primary product) compared to the S group, but the combination of the supplements was more efficient and reduced peroxide index levels about 2.3 times compared to S group (Fig. 2B).

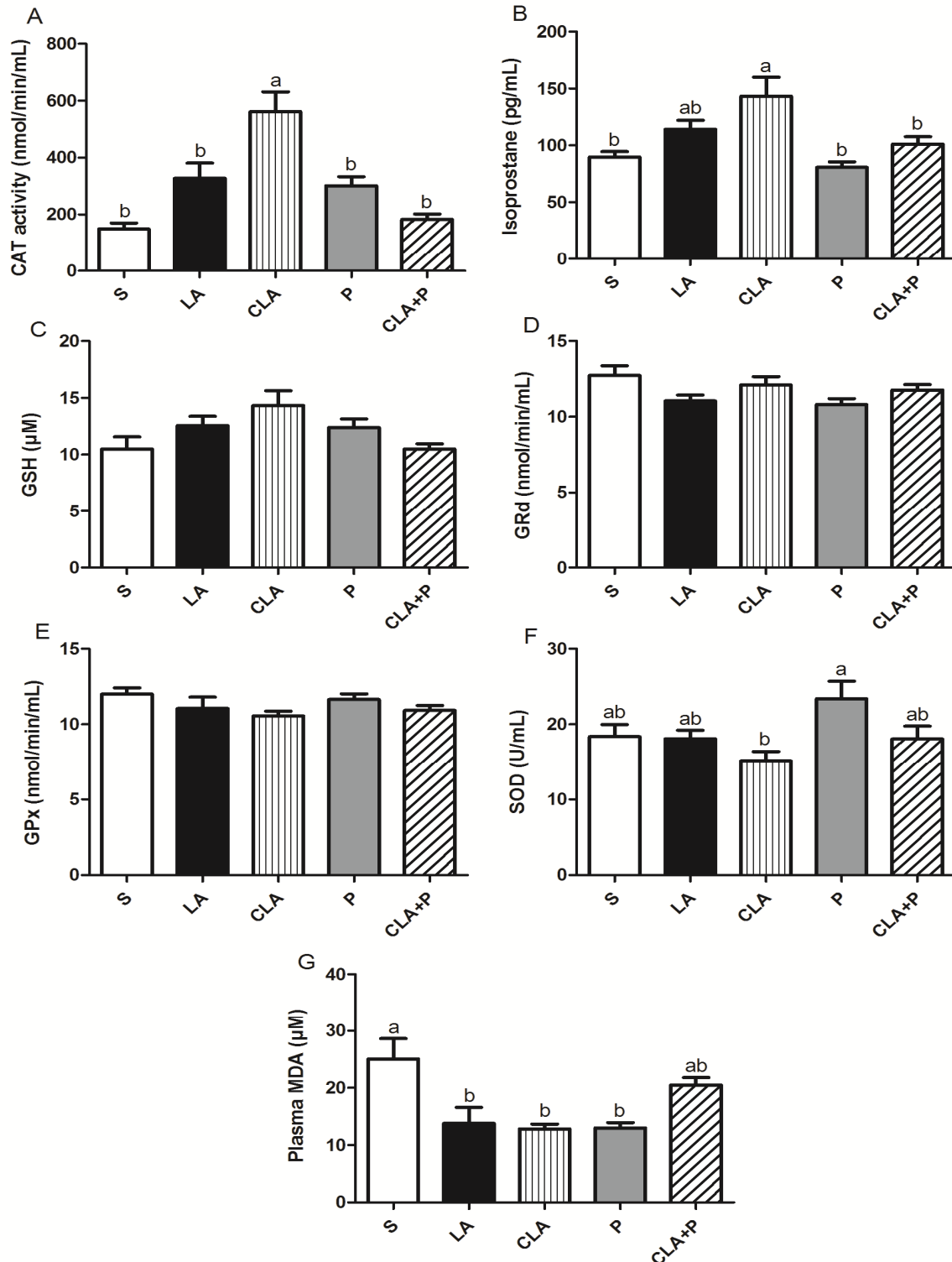


Fig. 1. Plasma levels of CAT (A), isoprostane (B), GSH (C), GRd (D), GPx (E), SOD (F) and MDA (G) in *Sprague Dawley* rats fed supplemented diets containing soybean oil (S), safflower oil (LA), conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols (P) and conjugated linoleic acid with phytosterols (CLA+P) for 9 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M;  $n=8$ /group. Values with different letters indicate significant difference by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

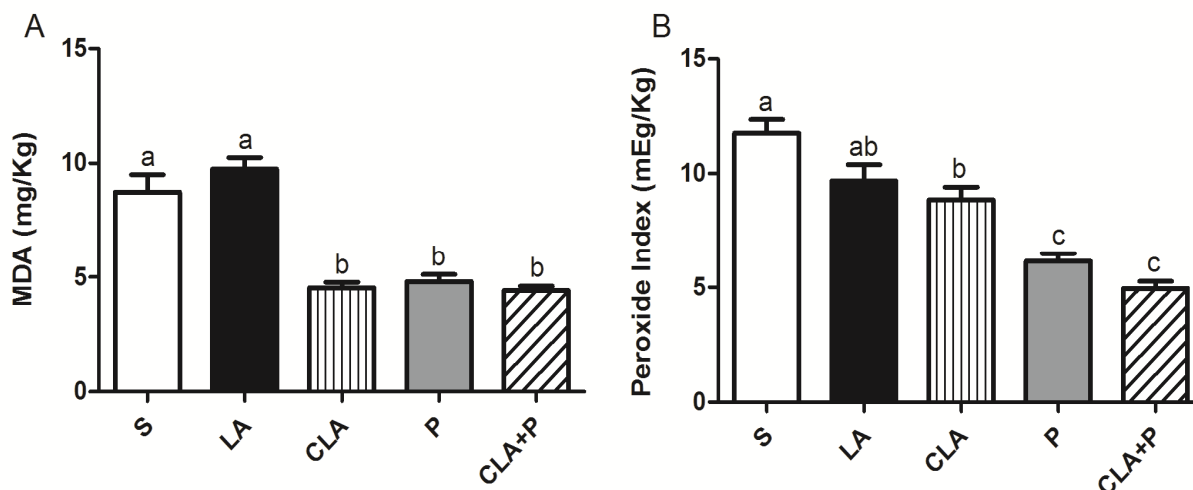


Fig. 2. Hepatic MDA (A) and peroxide index (B) in *Sprague Dawley* rats fed supplemented diets containing soybean oil (S), safflower oil (LA), conjugated linoleic acid (CLA), phytosterols (P) and conjugated linoleic acid with phytosterols (CLA+P) for 9 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n=8/group. Values with different letters indicate significant difference by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

## Discussion

An imbalance in oxygen levels causes the generation of reactive oxygen species (ROS), which promote oxidative stress by damaging macromolecules, contributing to the pathologies of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis (33). A depletion of antioxidant defenses can also tip the ROS antioxidant balance and cause oxidative stress (34). Antioxidant based products (drug formulations or plant extracts) are used for the prevention and treatment of complex diseases like diabetes, cardiovascular and neurodegenerative diseases and cancer (35).

The animals supplemented with CLA isomers mixture (*c9,t11* and *t10,c12*) showed an increase in plasma 8-isoprostane levels (which is a product of non-enzymatic lipid oxidation and the most specific biological indicator for the assessment of oxidative stress *in vivo*). However, the supplementation with CLA+P showed 8-isoprostane levels similar to

S group. This data show that phytosterols could counteract this pro-oxidative effect caused by CLA consumption.

Many studies aimed to assess the oxidative stress by determination of 8-isoprostane in different experimental models, including humans. Basu, Smedman and Vessby (11) studied the supplementation of health humans with CLA for 12 weeks. They found urinary and plasma 8-isoprostane values significantly higher than the control group, and categorically stated that CLA induces lipid peroxidation in humans. Risérus *et al.* (13) supplemented obese men for a period of 12 weeks with 3 g/day of CLA mixture containing predominantly the *c9,t11* isomer. Urine concentration of 8-isoprostane was 50% higher after supplementation with the CLA isomer than the placebo, indicating that lipid oxidation is increased not only by *t10,c12* but by *c9,t11* isomer as well.

Mannarino *et al.* (23) found that 6-weeks phytosterol consumption was associated with a significant plasma 8-isoprostane reduction in humans, suggesting possible antioxidative properties of phytosterols. These results are consistent with our findings, since supplementation of phytosterols prevents the increase of plasma isoprostane levels found in rats fed with CLA, and confirm the beneficial effect of phytosterols in reducing this non-enzymatic product of lipid oxidation in animals. However, the potential effect of daily phytosterols consumption on this biomarker is still recent and not enough studied.

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) are the two most important radical scavenging enzymes and body's secondary defense against oxygen metabolites produced due to transitional heavy metals (36). In our data we found that a supplementation of CLA increased the plasma CAT activity while the supplementation with CLA+P decreased this enzyme values to basal levels when compared to S group, indicating that phytosterols could be responsible for this effect.

Previous studies have reported that a lower catalase activity would indicate smaller peroxide production, which in turn would indicate a lower degree of oxidative stress

(10,38). Unlike our data, Cantwell *et al.* (10) demonstrated that concentrations of 5 to 20 ppm of CLA promoted a significant reduction of SOD, CAT and GPx activities from rats' hepatocytes. Another study (38) found a reduction of serum CAT activity in animals that received CLA supplementation and suggest the possibility of an antioxidant effect of CLA, as this enzyme plays a major role in protecting the organism against damage of oxidative stress by means of the degradation of peroxides, which result from lipid oxidation.

In the present data we did not observed any difference in GSH levels, GRd and GPx activities among the experimental groups, although few studies have evaluated the effect of CLA in these parameters. Moon *et al.* (9) showed an increase in GSH levels in liver, but not in mitochondrial fraction in HF-CLA-fed mice, while GPx activity tended to be greater in the mitochondrial fraction, which may enhance antioxidant defenses, but the GPx activity in the liver homogenate was not different among the dietary groups.

Lipid peroxidation is a basic cellular deteriorating process induced by oxidative stress and occurs readily in the tissues rich in highly oxidizable polyunsaturated fatty acids, which may lead to cell death and disease in living organisms (37). During the process of lipid peroxidation, hydroperoxide is produced as the first stable product in both the radical and nonradical reactions, and TBARS are the secondary products, which are expressed as MDA, an indicator of cell oxidative stress (12).

With regard to effects of CLA and phytosterols on lipid peroxidation, we found a significant reduction in hepatic peroxide index and in plasma and liver MDA levels, leading to the conclusion that CLA and phytosterols could act as antioxidant agents, which are in agreement with several studies have been demonstrate about CLA supplementation in animals (7-9,38). However, these finds are different from those reported by some researches that studied antioxidant and pro-oxidant properties of CLA, which showed an increase of TBARS *in vitro* and *in vivo* (12,39).

Furthermore, the association between CLA and phytosterols supplementation significantly reduced lipid peroxidation products in liver more than base levels, indicating that this combination potentiated this effect *in vivo*, which is consistent with Rensburg *et al.* (40) that found that  $\beta$ -sitosterol and other sterols at lower concentrations decreased the TBARS levels *in vitro*, but this is the only study about the effect of phytosterols on this marker found in the literature.

It's clear that the effects of CLA on oxidative stress are controversial and not completely elucidated. There is no consensus about the real effect of this supplement on the oxidation process of biological lipids, since many of the results point to the investigation of antioxidant properties, and others to the investigation of a possible pro-oxidant effect of CLA. Flintoff-Dye and Omaye (39) showed that CLA acted as a pro-oxidant, antioxidant, and subsequently reverted to a pro-oxidant as enrichment levels increased. The apparent paradoxical effect of CLA isomers is perplexing in terms of defining a mode of action. However, the biphasic effects of CLA may be another example of hormesis in action.

In different studies it has been demonstrated that CLA is a potent antioxidant and that *c9,t11* isomer is selectively incorporated into cellular phospholipid, which may, at least, in part, explain the anticarcinogenic activity of CLA as antioxidant mechanism (41). Some researchers showed that CLA could play its antioxidative roles by directly acting with free radicals to terminate the radical chain reaction or chelating transition metals to suppress the initiation of radical formation (42). Another possible explanation may be that the biohydrogenation or free radical addition to one of the conjugated double bonds of CLA might have taken place, resulting in the formation of conjugated dienes that could have possibly acted as antioxidants (43).

It may be possible that *in vivo* conditions these compounds may have reduced the formation of hydroperoxides by lowering the formation of free radicals and peroxidation of

polyunsaturated fatty acid (44). With regard to effects of combination between CLA and phytosterols supplementation in this data we can suggest that phytosterols could also act as antioxidant *in vivo* system, protecting against possible oxidative effects of CLA supplementation.

## **Conclusion**

In summary the dietary combination of CLA and phytosterols caused improvement in antioxidant status and reduction in lipid peroxidation, protects against possible effects of CLA supplementation on oxidative stress in rats. However, metabolic effects of this association are divergent and not completely elucidated, so further investigations are necessary.

## **Acknowledgment**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Cognis *Brasil Ltd* for supplements supplying.

## **References**

- (1) Pariza, M. W., Park, Y., & Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, 40, 283-98.
- (2) Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L., & Pariza, M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal*, 5, 185-197.

- (3) Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J., & Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem*, 241, 1350-1354.
- (4) Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881-1887.
- (5) Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acid in health and disease. *J Nutr Biochem*, 17, 789-810.
- (6) Park, Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): good or bad trans fat? *J Food Comp Analysis*, 22, 388-393.
- (7) Kim, H. K., Kim, S. R., Ahn, J. Y., Cho, I. J., Yoon, C. S., & Ha, T. Y. (2005). Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 51, 8-15.
- (8) Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res*, 51, 6118-6124.
- (9) Moon, H. S., Lee, H. G., Seo, J. H., Chung, C. S., Kim, T. G., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2009). Antiobesity effect of PEGylated conjugated linoleic acid on high-fat diet-induced obese C57BL/6J (ob/ob) mice: attenuation of insulin resistance and enhancement of antioxidant defenses. *J Nutr Biochem*, 20, 187-94.
- (10) Cantwell, H., Devery, R., O'shea, M., & Stanton, C. (1999). The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids*, 34, 833-839.
- (11) Basu, S., Smedman, A., & Vessby, B. (2000). Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett*, 468, 33-36.

- (12) Yamasaki, M., Mansho, K., Mishima, H., Kimura, G., Sasaki, M., Kasai, M., Tachibana, H., & Yamada, K. (2000). Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *J Agr Food Chem*, 48, 6367-6371.
- (13) Risérus, U., Vessby, B., Ärnlov, J., & Basu, S. (2004). Effects of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. *Am J Clin Nutr*, 80, 279-283.
- (14) Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr*, 22, 505-531.
- (15) Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Prog Lipid Res*, 41, 457-500.
- (16) Kritchevsky, D., & Chen, S. C. (2005). Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. *Nutr Res*, 25, 413-28.
- (17) Hicks, K. B., & Moreau, R. A. (2001). Phytosterols and phytostanols: Functional food cholesterol busters. *Food Technol*, 55, 63–67.
- (18) Moghadasian, M. H., & Frohlich, J. J. (1999). Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med*, 107, 588-94.
- (19) Jong, A., Plat, J., & Mensink, R. P. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem*, 14, 362-9.
- (20) Yokoyama, W. H. (2004). Plasma LDL cholesterol lowering by plant phytosterols in a hamster model. *Trends Food Sci Technol*, 15, 528-31.
- (21) White, P. J., & Armstrong, L. S. (1986). Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. *J Am Oil Chem Soc*, 63, 525–9.
- (22) Wang, T., Hicks, K. B., & Moreau, R. (2002). Antioxidant Activity of Phytosterols, Oryzanol, and Other Phytosterol Conjugates. *J Am Oil Chem Soc*, 79, 1201-1206.

- (23) Mannarino, E., Pirro, M., Cortese, C., Lupattelli, G., Siepi, D., Mezzetti, A., Bertolini, S., Parillo, M., Fellin, R., Pujia, A., Averna, M., Nicolle, C., & Notarbartolo, A. (2009). Effects of a phytosterol enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: a multicenter Italian study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19, 84-90.
- (24) Kramer, J. K. G., Fellner, V., Dugan, M. E. R., Sauer, F. D. S, Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, 32, 1219-1228.
- (25) Maia, E. L., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1993). Evaluation of a simple and inexpensive method for the methylation of fatty acid with lipids of various fish species. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 53, 27-35.
- (26) Becker, D. F. S., Gonçalves, L. A. G., Grimaldi, R., & Fernandes, G. B. (2005). Phytosterol quantification in imported olive oils available on the campinas market, using gas chromatograph. *Braz J Food Technol*, 8, 190-199.
- (27) Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr, G. C. (1993). 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. *J Nutr*, 123, 1939-1951.
- (28) Goena, M., Marzo, F., Fernández-González, L. Tosar, A., Frühbeck, G., & Santidrián, S. (1989). Effect of the raw legume Vicia ervilha on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Rev Esp Fisiol*, 45, 55-60.
- (29) Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extration and purification. *Canad J Biochem Physiol*, 37, 911-917.
- (30) Association Of Official Analytical Chemists, AOAC (1995). AOAC (16th ed). International CUNNIF, P. ed., Virgínia: AOAC International, 1995. v.1.

- (31) Sinnhuber, R. O., & Yu, T. C. (1958). 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol*, 12, 9-12.
- (32) SAS. Institute Project for Windows: User's Guide: statistics. Version 8.0. Cary: USA inst., 2003.
- (33) Kulkarni, A. C., Kuppusamy, P., & Parinandi, N. (2007). Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. *Antioxid Redox Signal*, 9, 1717-1730.
- (34) Sies, H., (1991). Oxidative stress, oxidants and antioxidants. New York: Academic Press.
- (35) Noonan, D. M., Benelli, R., & Albini, A. (2007). Angiogenesis and cancer prevention: a vision. *Recent Results Cancer Res*, 174, 219-224.
- (36) Nordenson, I., & Beckman, L. (1981). Is genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum Hered*, 41, 71–73.
- (37) Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52, 253–265.
- (38) Santos-Zago, L. F., Botelho, A. P., & de Oliveira, A. C. (2007). Supplementation with commercial mixtures of conjugated linoleic acid in association with vitamin E and the process of lipid autoxidation in rats. *Lipids*, 42, 845–54.
- (39) Flintoff-Dye, N. L., & Omaye, S. T. (2005). Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. *Nutr Res*, 25, 1-12.
- (40) Van Rensburg, S. J., Daniels, W. M., Van Zyl, J. M., & Taljaard, J. J. (2000). A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydro-epiandrosterone sulphate and melatonin *in vitro* lipid peroxidation. *Metab Brain Dis*, 15, 257–265.

- (41) Pariza, M. W., & Ha, Y. L. (1990). Newly recognized anticarcinogenic fatty acids, *Basic Life Sci*, 52, 167-170.
- (42) Yu, L., Adams, D., & Gabel, M. (2002). Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties, *J Agric Food Chem*, 50, 4135-4140.
- (43) Ip, C., Scimeca, J. A., & Thompson, H. J. (1994). Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer*, 74, 1050-1054.
- (44) Dhar, P., Ghosh, S., & Bhattacharyya, D. K. (1999). Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) levels on blood lipids and nonenzymatic *in vitro* lipid peroxidation in rats. *Lipids*, 34, 109-114.

## CONCLUSÃO GERAL

Considerando os resultados obtidos na presente pesquisa, é possível concluir que a associação entre a suplementação de ácido linoléico conjugado e de fitosteróis não apresentou efeito sobre o consumo de dieta, ganho de peso, composição corporal, perfil hormonal e lipídico, mas foi capaz de reduzir o tecido adiposo, sem comprometer a sensibilidade à insulina e a saúde hepática dos animais, conforme, os parâmetros avaliados.

Além disso, a combinação dos suplementos (CLA e fitosteróis) melhorou o perfil oxidativo plasmático e reduziu a peroxidação lipídica no fígado dos animais, podendo ser considerada como antioxidante nas condições apresentadas e, conseqüentemente, atuar como coadjuvante na prevenção e controle de algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Efeitos benéficos e adversos também foram observados quando os suplementos foram administrados isoladamente. Porém, os mecanismos de ação relacionados aos parâmetros avaliados não foram elucidados neste trabalho, sendo assim, outras investigações são necessárias para explicar o real efeito desse sinergismo.

## ANEXOS

### ANEXO A: DADOS ADICIONAIS REFERENTES AO ENSAIO BIOLÓGICO

Mineral Mix AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

| Ingredient                                                  | g/kg    |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Essential mineral element</b>                            |         |
| Calcium carbonate, anhydrous – 40.04 % Ca                   | 357.00  |
| Potassium phosphate, monobasic – 22.76 % P; 28.73 % K       | 19.00   |
| Sodium chloride – 39.34 % Na; 60.66 % Cl                    | 74.00   |
| Potassium sulfate – 44.87 % K; 18.39 % S                    | 46.60   |
| Potassium citrate, tri-K, monohydrate – 36.16 % K           | 70.78   |
| Magnesium oxide – 60.32 % Mg                                | 24.00   |
| Ferric citrate – 16.5 % Fe                                  | 6.06    |
| Zinc carbonate – 52.14 % Zn                                 | 1.65    |
| Manganous carbonate – 47.79 % Mn                            | 0.63    |
| Cupric carbonate – 57.47 Cu                                 | 0.30    |
| Potassium iodate – 59.3 % I                                 | 0.01    |
| Sodium selenate, anhydrous – 41.79 % Se                     | 0.01025 |
| Ammonium paramolybdate, 4H <sub>2</sub> O – 54.34 % Mo      | 0.00795 |
| <b>Potentially beneficial mineral element</b>               |         |
| Sodium meta-silicate, 9H <sub>2</sub> O – 9.88 % Si         | 1.45    |
| Chromium potassium sulfate, 12H <sub>2</sub> O – 10.42 % Cr | 0.275   |
| Lithium chloride – 16.38 % Li                               | 0.0174  |
| Boric acid – 17.5 % B                                       | 0.0815  |
| Sodium fluoride – 45.24 % F                                 | 0.0635  |
| Nickel carbonate – 45 % Ni                                  | 0.0066  |
| Ammonium vanadate – 43.55 % V                               | 0.0318  |
| Powdered sucrose                                            | 221.026 |

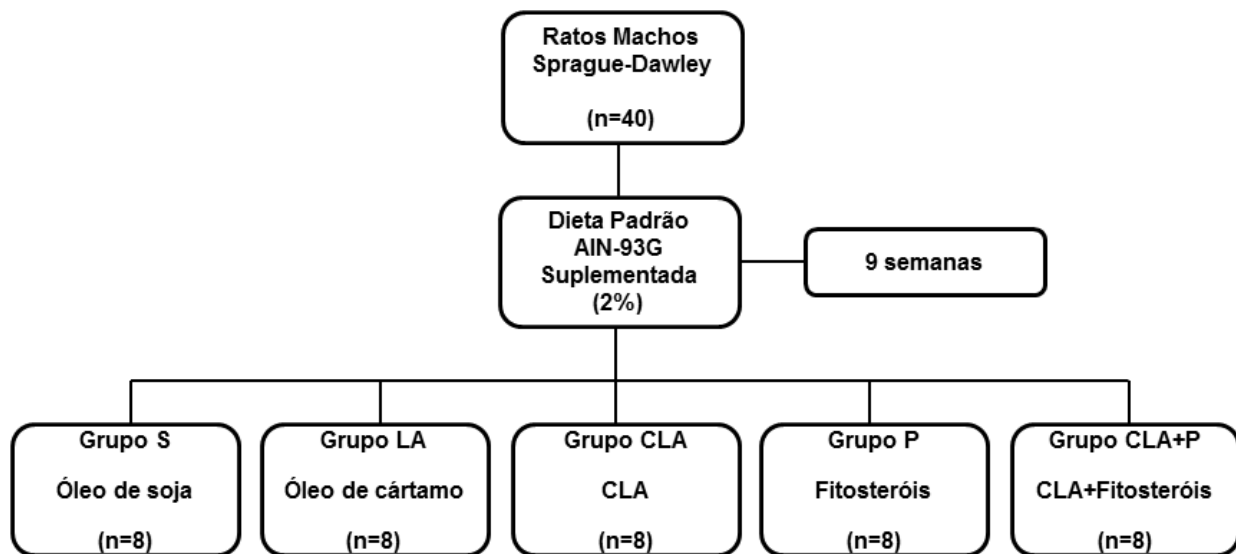
Vitamin Mix AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

| <b>Ingredient</b>                                      | <b>g/kg</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------|
| Nicotinic acid                                         | 3.000       |
| Ca Pantothenate                                        | 1.600       |
| Pyridoxine – HCl                                       | 0.700       |
| Thiamin – HCl                                          | 0.600       |
| Riboflavin                                             | 0.600       |
| Folic acid                                             | 0.200       |
| D-Biotin                                               | 0.020       |
| Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> ) (0.1 % in mannitol)  | 2.500       |
| All-rac- $\alpha$ -tocopheryl acetate (E) – 500 UI/g   | 15.00       |
| All- <i>trans</i> -retinyl palmitate (A) – 500.00 UI/g | 0.800       |
| Cholecalciferol (D3) – 400.000 UI/g                    | 0.250       |
| Phylloquinone (K)                                      | 0.075       |
| Powdered sucrose                                       | 974.655     |

## ANEXO B: DADOS ADICIONAIS REFERENTES AO DESENHO EXPERIMENTAL

SUPLEMENTOS E DIETAS: os suplementos utilizados no presente estudo foram óleo de cártamo, ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®) e fitosterol Vegapure® 95FF fornecidos pela *Cognis Brasil Ltda.* O grupo controle (óleo de cártamo) foi escolhido com base nos protocolos experimentais de pesquisas que estudam a suplementação com CLA em diferentes modelos experimentais, assim como a viabilidade de aquisição do composto no mercado local, além da opção por seguir a linha de pesquisa iniciada, anteriormente, no laboratório. Já o grupo padrão foi escolhido para que o desenho experimental tivesse uma base de comparação que não fosse somente o óleo de cártamo, uma vez que também tínhamos como suplemento o fitosterol, sendo assim, a escolha do óleo de soja foi baseada na dieta padrão para ratos em crescimento (AIN93G), a qual foi elaborada conforme o “American Society for Nutrition” (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) com correção da concentração de proteína bruta para 12 % (GOENA *et al.*, 1989), assim como para os demais grupos experimentais.

A concentração da suplementação utilizada, 2%, foi escolhida levando-se em consideração a amplitude dos valores utilizados na literatura, e principalmente, baseada nos resultados prévios do grupo de pesquisa (BOTELHO *et al.*, 2005). Optou-se por adicionar 2% de cada composto de interesse dos suplementos em questão e não 2% dos produtos em si. Portanto, como, a partir das análises de perfil de ácidos graxos e fitosteróis pôde-se obter os valores dos compostos de interesse, óleo de cártamo (76,62% de ácido linoléico), ácido linoléico conjugado (80% dos isômeros *c9,t11* e *t10,c12* na razão 1:1), e fitosteróis (50% de fitosterol livre total), foi possível calcular a concentração de cada suplemento para que se obtivesse 2% dos compostos que seriam adicionados às dietas. Dessa forma, as concentrações utilizadas foram 2,6; 2,5 e 4% para o óleo de cártamo, CLA e fitosteróis, respectivamente.



Esquema do delineamento experimental do ensaio biológico

## ANEXO C: DADOS ADICIONAIS REFERENTES À ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS SUPLEMENTOS

Values of peroxide index and malondialdehyde (MDA) of the lipid supplements and the experimental diets\*

| Supplement or diet       | PI<br>(mEq/kg)            | MDA                   |                           |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
|                          |                           | Absorbance<br>(532nm) | TBA<br>(mg/kg)            |
| Supplements              |                           |                       |                           |
| Soybean oil              | Tr                        | 0.0077 ± 0.0          | 2.52 <sup>b</sup> ± 0.07  |
| Safflower oil            | 27,70 <sup>a</sup> ± 0.76 | 0.005 ± 0.001         | 1.42 <sup>b</sup> ± 0.25  |
| CLA Tonalin®             | 15.62 <sup>b</sup> ± 0.11 | 0.0345 ± 0.007        | 9.98 <sup>a</sup> ± 1.88  |
| Phytosterol Vegapure®    | 28.35 <sup>a</sup> ± 0.46 | 0.0127 ± 0.002        | 5.02 <sup>ab</sup> ± 0.36 |
| 95FF                     |                           |                       |                           |
| Diets supplemented with: |                           |                       |                           |
| Soybean oil              | ND                        | 0.0442 ± 0.005        | 8.10 <sup>ab</sup> ± 0.87 |
| Safflower oil            | Tr                        | 0.0391 ± 0.009        | 7.16 <sup>b</sup> ± 1.02  |
| CLA                      | Tr                        | 0.0379 ± 0.0002       | 6.91 <sup>b</sup> ± 0.04  |
| Phytosterol              | Tr                        | 0.0613 ± 0.011        | 11.19 <sup>a</sup> ± 1.16 |
| CLA and Phytosterol      | Tr                        | 0.0450 ± 0.0003       | 8.14 <sup>ab</sup> ± 0.11 |

ND: no detected; Tr: trace (below the limit of quantification).

PI: peroxide index; MDA: malondialdehyde; CLA: conjugated linoleic acid; TBA: 2-thiobarbituric acid.\*Values expressed as means ± S.E.M. Means followed by at different letters in the same column indicate statistical differences by one-way analysis of variance followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).



CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2296-1**, entitled " \_\_\_\_\_ ", 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 **November 8, 2010**.

Campinas, 08 de novembro de 2010.

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>