UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

EFEITOS DOS ISÔMEROS CONJUGADOS DO ÁCIDO LINOLEICO
SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS

Eliane Bonifácio Teixeira de Carvalho

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**EFEITOS DOS ISÔMEROS CONJUGADOS DO ÁCIDO LINOLEICO
SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS**

Eliane Bonifácio Teixeira de Carvalho

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Carvalho, Eliane Bonifácio Teixeira de
C331e Efeitos dos isômeros conjugados do ácido linolêico sobre a
peroxidação lipídica em ratos / Eliane Bonifácio Teixeira de
Carvalho. -- São Paulo, 2011.
128p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Bromatologia 2. Antioxidante : Ciência dos alimentos
3. Lipídio : Metabolismo I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641 CDD

Eliane Bonifácio Teixeira de Carvalho

**EFEITOS DOS ISÔMEROS CONJUGADOS DO ÁCIDO LINOLEICO
SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

Luis Antonio Gioielli

1º. examinador

Daniel Barrera Arelano

2º. examinador

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

3º. examinador

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

4º. examinador

São Paulo, 2 de Dezembro de 2011.

A Felipe, marido amado, pelo amor,
compreensão, respeito,
demonstração de carinho,
de apoio e sempre
companheirismo.

A Ana Beatriz, filha querida, pelo amor,
sorrisos a qualquer momento,
e olhar sempre doce.

"O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece."

Benjamin Disraeli

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jorge Mancini Filho, pela orientação deste trabalho com muito profissionalismo, sabedoria e competência, e também pela confiança e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos .

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio a pesquisa (Processo FAPESP Nº 2009/51891-7).

Aos meus colegas de laboratório e de curso, pela amizade, carinho, momentos de muito diálogo e pela ajuda na bancada, em especial a Ana Mara, Illana, Fernanda Jardini e Milessa, companheiras dos momentos do dia-a-dia.

À Lucillia pela amizade, carinho e excelente colaboração nas análises estatísticas.

À Claudimar, Paula, Fernanda Santana e Fernanda Shinagawa que também contribuíram para a realização deste trabalho e pela amizade que se iniciou. Obrigada a todos pela dedicação!

Ao Francisco Leonardo, Emídio, Lucas e Michelle, pela ajuda nos dias de sacrifício, em especial ao Leo pela valiosa colaboração.

Ao Danilo Akiau pela dedicação ao trabalho de iniciação científica e por ter participação importante também neste estudo.

À Liliane e Elma por todo carinho e pelas conversas agradáveis.

Aos técnicos Rosângela, Ivanir, Alexandre, Rosa, Lúcia e Renato pelo grande apoio e préstimos à realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Ciência dos Alimentos e a de outros programas pelo trabalho de ensino.

Ao Cytel (Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo) rede 208RT0343 “Ácidos grasos isoméricos trans y CLA: intervención interdisciplinaria tendientes a reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles” , pela oportunidade de fazer pesquisa junto à essa rede.

Ao Prof. Dr. Claudio A. Bernal coordenador da rede temática CYTED-208RT0343 pelo estagio na Cátedra de Bromatologia y Nutrición de La Universidad Nacional Del Litoral - Santa Fé, Argentina.

Ao pessoal do laboratório de Bromatologia y Nutrición de La Universidad Nacional Del Litoral, Marcela Gonzalez, Marcela Martinelli e Maria Victoria Scalerandi, pela acolhida e ensinamentos.

Ao pessoal do Biotério de Experimentação Animal, do Comitê de Ética, da biblioteca, tesouraria e da informática pelo suporte técnico durante meu trabalho.

À Profa. Silvia Berlanga, que gentilmente cedeu o laboratório, e ao Diogo Rivelli, pela colaboração no uso dos equipamentos e realização de análises.

À Profa. Iolanda Midea Cuccovia pelo empréstimo de seu laboratório.

A Marcos Ângelo Demasi pela gentileza e colaboração no uso da ultracentrífuga.

As queridas Rose e Suzi por estarem sempre prontas a ajudar.

Aos funcionários, pessoas muito queridas, Elaine, Jorge de Lima, Lurdes (Lurdinha), Joana, Edílson, Cléo, Mônica, Majô, Roseli, além da amizade, também pela boa vontade e eficiência no desempenho de seus trabalhos. Muito obrigada por tudo!

Aos meus Pais, João Bonifácio e Maria Auxiliadora da Silva, pelo incentivo e apoio à minha formação.

Às minhas irmãs Fátima e Edna e meu irmão Gustavo por me proporcionarem brilho, alegria e confiança tão espetaculares.

À minha filha Ana Beatriz, que surgiu no final desta etapa da minha vida, me motivando ainda mais e me oferecendo a felicidade de conhecer o amor no seu sentido mais pleno e sublime.

Ao Felipe, meu amor, pelos maravilhosos momentos de descontração, pelo incentivo constante, por toda confiança depositada em mim. Agradeço, ainda, a ajuda na elaboração deste trabalho.

À todos amigos sejam os que estejam próximos e/ou distantes, de forma otimista e carinhosa contribuíram torcendo para a realização deste trabalho. Guardo-os todos com muito afeto no meu coração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
 1.INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	 3
2.1 O ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	3
2.1.1 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE.....	4
2.1.2 SÍNTESE QUÍMICA.....	5
2.1.3 OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS.....	6
2.1.4 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS.....	8
2.1.5 INCORPORAÇÃO.....	10
2.1.6 METABOLISMO.....	12
2.1.7 EFEITOS NA SAÚDE E ATIVIDADE MOLECULAR.....	14
2.1.8 INFLAMAÇÃO E OBESIDADE.....	16
2.1.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
2.2 A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	21
2.3 OS MECANISMOS ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	22
2.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	23
2.3.2 CATALASE (CAT).....	23
2.3.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx).....	24
2.3.4 GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	24
2.3.5 ANTIOXIDANTES ALIMENTARES.....	24
2.4 MÉTODOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	26
2.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA DE VARREDURA DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH•).....	27
2.4.2 MÉTODO DE CO-OXIDAÇÃO DO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	28

2.4.3 MÉTODO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO-ORAC.....	29
2.4.4 AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM MODELO LIPÍDICO (RANCIMAT).....	31
2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE TETRACLORETO DE CARBONO NO FÍGADO.....	32
JUSTIFICATIVA.....	34
 3. OBJETIVOS.....	 35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
 4. MATERIAL E MÉTODOS.....	 36
4.1 MATERIAL.....	36
4.1.1 AMOSTRAS.....	36
4.1.2 ANIMAIS.....	36
4.2 MÉTODOS.....	37
4.2.1 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS DE FFA-CLA E ÓLEO DE SOJA.	37
4.2.2 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NAS AMOSTRAS DE FFA-CLA E ÓLEO DE SOJA.....	38
4.2.3 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS E ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NAS AMOSTRAS DE FFA-CLA E ÓLEO DE SOJA – ESTÁGIO NO EXTERIOR.....	39
ENSAIO IN VITRO.....	40
4.2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA DE VARREDURA DE RADICAIS LIVRES (DPPH•).....	40
4.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA MODELO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	41
4.2.6 MÉTODO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO – ORAC.....	42
4.2.7 AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM MODELO LIPÍDICO (RANCIMAT).....	43
 ENSAIO BIOLÓGICO.....	 44
4.2.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO.....	44
4.2.8.1 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA.....	44
4.2.8.2 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS....	45
4.2.8.3 CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS.....	45
4.2.9 ANÁLISE BIOLÓGICA (<i>IN VIVO</i>)	46

4.2.10 ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO.....	48
4.2.11 PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS DOS TECIDOS.....	48
4.2.12 MEDIDA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	49
4.2.13 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS TECIDOS.....	50
4.2.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	50
4.2.14.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	50
4.2.14.2 CATALASE.....	51
4.2.14.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx).....	51
4.2.15 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS TECIDOS.....	52
4.2.16 ISOLAMENTO DOS ADIPÓCITOS DE TECIDO ADIPOSEO E ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	53
4.2.17 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO MUSCULAR.....	53
4.2.18 ANÁLISES DOS DADOS.....	54
4.3 ANÁLISE BIOLÓGICA – EXPERIMENTO II.....	55
4.3.1 ANIMAIS.....	56
4.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	56
4.3.3 GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	57
4.3.4 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	57
4.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS.....	58
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	64
5.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA DE VARREDURA DE RADICAIS LIVRES (DPPH•).....	64
5.2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA MODELO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	67
5.2.3 MÉTODO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO – ORAC.....	69
5.2.4 AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM MODELO LIPÍDICO (RANCIMAT).....	69
5.3 ANÁLISE BIOLÓGICA (<i>IN VIVO</i>)	70
5.3.1 INFLUÊNCIA DAS SUPLEMENTAÇÕES COM ÓLEO DE SOJA E COM FFA-CLA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	80

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	80
ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	83
5.3.2 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO.....	88
5.3.3 MORFOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO.....	96
5.3.4 MORFOLOGIA DO MÚSCULO.....	99
5.4 ANÁLISE BIOLÓGICA (IN VIVO)- EXPERIMENTO II.....	102
6. CONCLUSÕES.....	109
7. REFERÊNCIAS.....	110
8. ANEXOS.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via metabólica proposta para biossíntese do C18:2 <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11.....	4
Figura 2. Estrutura dos CLAs <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 e <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 e do ácido linoleico.....	5
Figura 3. Formação dos isômeros de CLAs, a partir da produção comercial.....	6
Figura 4. Mecanismo da oxidação lipídica.....	22
Figura 5. Mecanismo proposto para exemplificar a capacidade dos CLAs em doar H no sistema de análise de redução do radical DPPH•.....	28
Figura 6. Metabolismo do tetracloreto de carbono (CCl ₄).....	33
Figura 7. Desenho Experimental.....	46
Figura 8. Cromatogramas do padrão de ácidos graxos: padrão sigma 18919, correspondentes as condições cromatográficas descritas por Kramer et al., (1997), (a), Cordain et al., (2001), (b) e Baublits et al., (2007), (c).....	58
Figura 9. Cromatogramas correspondentes ao método de esterificação NaOCH ₃ /metanol e condições cromatográficas descritas por Baublits et al., (2007), cromatogramas: óleo de soja (a) e FFA-CLA (b).....	62
Figura 10. Atividade antioxidante de diferentes concentrações das amostras testados BHT (a), Óleo de soja (b) e FFA-CLA (c) em sistema de redução do radical DPPH•. Valores expressos em % de captura do radical DPPH•. Os dados estão apresentados como média (n=3 para cada concentração).	64
Figura 11. Redução da atividade antioxidante das doses do antioxidante BHT nos diferentes meios de emulsão do sistema de co-oxidação do β-caroteno, no período de 2 h.....	66
Figura 12. Redução da atividade antioxidante das amostras BHT, FFA-CLA e Óleo de soja, no sistema de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, no período de 2 h. Os resultados estão expressos em média de absorbância (n=3).....	67
Figura 13. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, colesterol total (a), HDL-colesterol (b) e triglicérides (c).....	72

Figura 14. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, alanina aminotransferase (a), aspartato aminotransferase (b).....	75
Figura 15. Projeção das variáveis sobre o plano-fator [o fator 1 (41,01%) em comparação com o fator 2 (16,18%)]......	77
Figura 16. Projeção dos animais sobre o plano-fator: PC1 e PC2. As variáveis foram: colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides (TG), peso final, ganho de peso, consumos de água, ração e óleo.....	78
Figura 17. Efeito da suplementação com FFA-CLAs e OS na peroxidação lipídica no soro (a), tecido hepático (b), cerebral (c) e muscular (d) em ratos, durante 40 dias.....	80
Figura 18. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (a), superóxido dismutase (SOD) (b), glutathione peroxidase (GPx) (c) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupo controle), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em fígado de ratos, suplementados durante 40 dias.....	83
Figura 19. Comportamento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), glutathione peroxidase (GPx) (b) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupo controle), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em cérebro de ratos, suplementados durante 40 dias.....	85
Figura 20. Comportamento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), glutathione peroxidase (GPx) (b) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupo controle), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em músculo gastrocnemius de ratos, suplementados durante 40 dias.....	86
Figura 21. Valores referentes ao volume do tecido adiposo epididimal dos grupos experimentais. Grupo controle (Água), óleo de soja (OS) e ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), suplementados durante 40 dias.....	96
Figura 22. Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo epididimal.....	99
Figura 23. Valores referentes a área (a) e ao diâmetro (b) das fibras musculares. Grupos estudados: controle (água), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em músculo gastrocnemius de ratos, suplementados durante 40 dias.....	100
Figura 24. Fotomicrografias de cortes histológicos de músculo (<i>gastrocnemius</i>).....	101
Figura 25. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, colesterol total (a), HDL-colesterol (b) e triglicérides (c) em ratos com dano hepático induzido por CCl ₄	104

Figura 26. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, alanina aminotransferase (a), aspartato aminotransferase (b). Em ratos com dano hepático induzido por CCl₄..... 104

Figura 27. Efeito da suplementação de CLAs, na peroxidação lipídica no soro (a), e tecido hepático (b). Em ratos com dano hepático induzido por CCl₄..... 105

Figura 28. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (a), superóxido dismutase (SOD) (b), – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupos controles) e Ácido linoleico conjugado (CLA), em fígado de ratos, com dano hepático induzido por CCl₄..... 107

Figura 29. Comportamento da atividade da glutathiona reduzida (GSH), (a), e das enzimas glutathiona redutase (GR), (b) e glutathiona peroxidase (GPx), (c) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupos controles) e Ácido linoleico conjugado (CLA), em fígado de ratos, com dano hepático induzido por CCl₄..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos da amostra de FFA-CLA, resultados expressos em porcentagem.....	59
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da amostra de óleo de soja, resultados expressos em porcentagem.....	61
Tabela 3. Doses relativas à capacidade em reduzir em 50% a atividade do radical DPPH•, para o FFA-CLA e BHT.....	65
Tabela 4. Atividade antioxidante das doses de BHT nos diferentes meios de emulsão.....	66
Tabela 5. Atividade antioxidante do óleo de soja e do FFA-CLA, valores expressos em μmol de equivalente de Trolox®/g de amostra.....	68
Tabela 6. Perfil de ácidos graxos da ração oferecida aos animais, resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.....	69
Tabela 7. Consumo da amostra, água, ingestão alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar (CEA).....	69
Tabela 8. Eigenvalues da matriz de correlação e as estatísticas relacionadas.....	76
Tabela 9. Perfil de ácidos graxos no tecido hepático, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.....	88
Tabela 10. Perfil de ácidos graxos no tecido cerebral, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.....	89
Tabela 11. Perfil de ácidos graxos no tecido muscular, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.....	90
Tabela 12. Perfil de ácidos graxos no tecido adiposo, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.....	91
Tabela 13. Consumo da amostra, ingestão alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar (CEA).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido graxo araquidônico
AAPH	2,2'- azobis (amidinopropane) dihydrochloride
Abs	Absorbância
ACS	Acil-CoA sintetase
Ag-HPLC	Cromatografia líquida de íons de prata
AGCs	Ácidos graxos conjugados
AGPIs	Ácidos graxos poliinsaturados
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	American Oil Chemists' Society
aP2	Proteína ligante de ácidos graxos
AST	Aspartato aminotransferase
α-SMA	α -actina de músculo liso
ATP	Trifosfato de Adenosina
BF₃	Trifluoreto de boro
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BSA	Albumina Bovina Sérica
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada (CCD),
CCl₃[·]	Radical triclorometil
CCl₄	Tetracloroeto de carbono
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CFAs	Conjugated fatty acids
CG	Cromatografia gasosa
Cl₃COO⁻	Radical triclorometilperoxil

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAs	Conjugated Linoleic Acid - Ácido linoleico conjugado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimental Animal
DHA	Docosahexaenóico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPA	Eicosapentaenóico
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FFA-CLAs	Ácidos graxos livres - Ácido linoleico conjugado
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IC₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% a ação do radical
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
KCN	Cianeto de Potássio

KOH	Hidróxido de potássio
LAME	Metil linoleato
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MAPKs	Mitogen – Activated Protein Kinase
mRNA	Ácido Ribonucleico - mensageiro
MS	Espectrometria de massas
N₂	Nitrogênio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaOCH₃/metanol	Metóxido de sódio metanólico
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear κB
O₂	Oxigênio
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
OS	Óleo de Soja
PC	Componente principal
PCA	Análise dos componentes principais
PCOOH	Hidroperóxido fosfatidilcolina
PI	Período de indução
pL	Picolitros
PPARs	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
RMN	Espectrometria de ressonância magnética nuclear
ROO•	Radical peroxila
SCD	Stearoyl-CoA dessaturase
SDS	Diocetil Sulfo-Succinato
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase
SREBPs	Proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEP	Tetraetoxipropano
TG	Triglicerideo
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UCP	Proteínas desacopladoras
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

CARVALHO, E. B. T. **Efeitos dos isômeros conjugados do ácido linoleico sobre a peroxidação lipídica em ratos**. São Paulo, 2011. 128p. Defesa (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2011.

RESUMO

Ácidos graxos conjugados (AGCs) é o termo geral para descrever os isômeros posicionais e geométricos dos ácidos graxos poliinsaturados com duplas ligações conjugadas. Inúmeros efeitos benéficos para a saúde como: anti-cancerígeno, anti-aterogênicos, anti-adipogênicos e anti-inflamatórios, tem sido atribuídos ao consumo dos AGCs. Entretanto, estudos sobre os efeitos dos AGCs no organismo ainda são inconclusivos e por isso o interesse em pesquisas visando a sua participação em processos fisiológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar em ratos o efeito dos isômeros conjugados do ácido linoleico (9*cis*, 11*trans* e 10*trans*, 12*cis*) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos. Não foi possível detectar a atividade antioxidante *in vitro* dos CLAs. Os resultados obtidos demonstraram que o FFA-CLA foi capaz de reagir apenas com o radical DPPH. No experimento *in vivo* uma mistura comercial dos isômeros (9*cis*, 11*trans* e 10*trans*, 12 *cis*) foi utilizada como fonte de CLAs, e a influência da suplementação desses isômeros, foi avaliada e comparada com um grupo controle suplementado com água e com grupos experimentais suplementados com óleo de soja. O primeiro experimento foi realizado com animais Wistar saudáveis e teve duração de 40 dias, as amostras de ácidos graxos livres de CLAs, (FFA-CLAs) e óleo de soja foram fornecidas aos animais por meio de entubação orogástrica nas concentrações de 1%, 2% e 4% em relação ao consumo diário de dieta, o grupo controle recebeu 1% de água. A suplementação da dieta dos animais com os CLAs leva ao aumento nos níveis de triglicérides, mas não interfere nos parâmetros de estresse oxidativo, embora haja incorporação dose-dependente nos tecidos hepático, muscular e adiposo, não foram observadas alterações no volume das células adiposas, e na área e diâmetro do tecido muscular. No segundo experimento, com duração de 21 dias, ao avaliar o efeito da suplementação na dose de 2% de CLAs em ratos Wistar induzidos a peroxidação, pelo tratamento com tetracloreto de carbono. Pôde-se observar efeitos hepatoprotetor, dos CLAs atribuídos a sua prevenção na peroxidação lipídica e ao aumento da atividade das enzimas catalase (CAT), glutatina redutase (GR) e glutatona reduzida (GSH).

Palavras Chave: Ácido linoleico conjugado. Perfil Lipídico. Atividade antioxidante, tetracloreto de carbono.

CARVALHO, E. B. T. **Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid peroxidation in rats.** São Paulo, 2011. 128p. Defesa (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2011.

ABSTRACT

Conjugated fatty acids (CFAs) is the general term to describe positional and geometric isomers of polyunsaturated fatty acids with conjugated double bonds. Many beneficial health effects such as anti-cancer, anti-atherogenic, anti-adipogenic and anti-inflammatory, has been attributed to the consumption of the CFAs. However, studies on the effects of the CFAs in the body are still inconclusive and therefore the interest in research aimed at their participation in processes physiological. The objective of this study was to evaluate in rats the effect of conjugated linoleic acid isomers (9*cis*, 11*trans* and 10*trans*, 12*cis*) on lipid profile tissue and its effect on biochemical parameters in oxidative processes. It was not possible to detect the *in vitro* antioxidant activity of CLAs. The results showed that the free fatty acids of CLAs (FFA-CLAs) was able to react only with the DPPH radical. In *in vivo* experiment a commercial mixture of isomers (9*cis*, 11*trans* and 10*trans*, 12*cis*) was used as a source of CLAs and the influence of supplementation of these isomers was evaluated and compared with a control group supplemented with water and experimental groups supplemented with soybean oil. The first experiment was conducted with healthy Wistar and lasted 40 days, samples of FFA-CLA and soybean oil were delivered to animals via orogastric intubation at concentrations of 1%, 2 % and 4% in relation to daily diet, the control group received 1% water. Supplementing the diet with CLAs leads to increased levels of triglycerides, but does not interfere with oxidative stress parameters, although there is a dose-dependent incorporation into liver tissue, muscle and fat, no changes were observed in the volume of fat cells, and in the area and diameter of muscle tissue. In the second experiment, lasting 21 days, to evaluate the effect of supplementation at a dose of 2% of CLAs in Wistar, the peroxidation induced by treatment with carbon tetrachloride. Could be observed hepatoprotective effects, attributed to the CLAs prevention lipid peroxidation and increased activity of the enzymes catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione reduced (GSH).

Keywords: Conjugated linoleic acid. Lipid Profile. Antioxidant activity, Carbon tetrachloride.

1. INTRODUÇÃO

O ácido graxo linoleico ($\omega 6$) é essencial para funções celulares normais, e atua como precursor para a síntese do ácido graxo araquidônico (AA), poliinsaturado de cadeia longa. Este ácido graxo faz parte de numerosas funções celulares como: integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana, interações lipídio-proteína e síntese de eicosanóides como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (NELSON e COX, 2004). Estudos recentes têm demonstrado a habilidade dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônico, eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), em atuarem na regulação do metabolismo celular e na modulação de diversos fatores de transcrição. Acredita-se que este impacto sobre a regulação gênica proporciona, em parte, a ligação metabólica entre ingestão dietética de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), e a progressão de doenças crônicas (MINIHANE e LOVEGROVE, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados linoleico ($\omega 6$) e α linolênico ($\omega 3$), apresentam nas suas estruturas duas e três duplas ligações respectivamente, estas estão distribuídas nas estruturas das moléculas sob a forma de não conjugadas, isto é, apresentam um carbono metilênico entre as ligações. Recentemente, muitos estudos estão focados nos ácidos graxos conjugados, que é o termo geral utilizado para descrever os isômeros posicionais e geométricos dos ácidos graxos poliinsaturados com duplas ligações conjugadas (ARAO et al. 2004).

Os ácidos graxos conjugados do ácido linoleico (também chamados de CLAs, abreviação que vem do inglês *conjugated linoleic acids*) referem-se a um grupo de isômeros geométricos e de posição do ácido octadecadienóico que contêm duplas ligações em posição conjugada podendo apresentar configurações *cis* ou *trans* (WAHLE et al. 2004; TSOFLIOU et al. 2009). Eles são encontrados naturalmente em alimentos derivados de animais ruminantes, carnes ou produtos lácteos (SANTOS-ZAGO et al. 2008). Desde a descoberta dos CLAs na década de 80, os

estudos sobre as suas funções fisiológicas foram centrados em suas propriedades anticarcinogênicas. No entanto, há uma número crescente de pesquisas em animais e humanos que estudam os efeitos antiobesidade, antiaterogênico, antidiabéticos e hipotensores de CLAs (NAGAO; YANAGITA, 2008; PARK, 2009; KENNEDY et al. 2010). Koba et al. (2007) acrescentam ainda como funções fisiológicas dos CLAs a inibição do metabolismo do ácido linoléico, e como consequência, a diminuição da produção de seus eicosanóides correspondentes, os quais são acessórios da função imune e atividade hipotensiva.

Existem muitos estudos que avaliam os efeitos benéficos dos CLAs para o organismo; entretanto, alguns resultados são controversos e outros demonstram inclusive efeitos adversos. Os mecanismos bioquímicos pelos quais os CLAs proporcionam os efeitos benéficos ou prejudiciais permanecem obscuros (PARK; PARIZA, 2007; ANDREOLI et al. 2009). Uma vez que os estudos sobre os efeitos dos CLAs no organismo ainda são inconclusivos, aumenta-se o interesse em pesquisas visando a sua participação em processos fisiológicos e a necessidade de conhecer melhor os efeitos desses compostos nos organismos animais. De acordo com Santos-Zago et al. (2007), investigações adicionais sobre os efeitos fisiológicos dos CLAs são necessárias, particularmente quanto à oxidação dos lipídeos biológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

Nos anos 70 Michael Pariza e seus colaboradores sugeriram que a carne bovina grelhada possuía um agente carcinogênico e seus estudos procuravam identificar este componente. Já na década de 80 estes mesmos autores observaram que extratos da carne bovina possuíam tanto componentes mutagênicos como também um componente com atividade antimutagênica e que este agente estava presente independente do cozimento, ao contrário do que se acreditava anteriormente (GAYDA e PARIZA 1983). Pariza e Hargraves (1985), demonstraram que o extrato de carne poderia inibir a carcinogênese em células epiteliais de camundongos.

Ha et al. (1987) isolaram e caracterizaram este componente da fração lipídica da carne, através de técnicas de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), cromatografia gasosa (CG), espectrofotometria ultravioleta e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), e nesta fração foram identificados quatro isômeros de ácido octadecadienóicos com duas ligações duplas conjugadas. Desde então, estes ácidos graxos têm sido designados como ácido linoleico conjugado ou CLA.

O termo ácido linoleico conjugado e sua sigla CLA referem-se genericamente à classe de isômeros posicionais e geométricos conjugados de ácido linoleico dienóico com ligações duplas nas posições [9, 11], [10, 12], [8, 10], [7, 9] e [11, 13] (PARIZA et al. 2001). Embora inúmeros isômeros CLA sejam encontrados nos alimentos (KRAMER et al. 1998; YUAN et al. 2009), o foco principal é a investigação sobre os dois principais isômeros, *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12 (PARK e PARIZA, 2007).

2.1.1 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE

Os ácidos graxos com duplas ligações conjugadas ocorrem naturalmente em gorduras provenientes de animais ruminantes, e são predominantemente encontrados no leite, produtos lácteos, carne e produtos carneos (BENJAMIN e SPENER, 2009). A microbiota do trato gastrointestinal de animais ruminantes converte o ácido linoleico em diferentes isoformas de CLA através da biohidrogenação de ácidos graxos insaturados pela bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* (NAGAO e YANAGITA, 2008). Este processo muda a posição e configuração das duplas ligações, resultando em uma ligação simples entre duas ligações duplas (KENNEDY et al. 2010). Existem cerca de 56 isômeros diferentes de CLA, mas o mais abundante na natureza é o CLA *cis9, trans11* (McLEOD et al. 2005). Esse isômero pode ser originado pela biohidrogenação por bactérias do rúmen, ou ainda por dessaturação delta-9 de ácido vaccênico em tecido mamário (Figura 1), (PARK e PARIZA, 2007).

Figura 1: Via metabólica proposta para biossíntese do C18:2 *cis9, trans11*. Adaptado de Lock e Bauman, (2004).

O isômero *cis9, trans11*, também conhecido como ácido rumênico, é a forma predominante de CLA encontrado em alimentos naturais. O *cis9*,

*trans*11 CLA compreende aproximadamente 90% do CLA encontrado em carnes e produtos lácteos de ruminantes, e o isômero *trans*10, *cis*12 compreende os 10% restantes. Embora várias outras isoformas de CLAs também tenham sido identificadas (*trans*9, *trans*11; *cis*9, *cis*11; *trans*10, *trans*11 e *cis*10, *cis*12), os isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12 (Figura 2), parecem ser os mais biologicamente ativos (WALLACE et al. 2007; KENNEDY et al. 2010; RAMÍREZ-SANTANA et al. 2011).

Figura 2. Estrutura dos CLAs *trans*10, *cis*12 e *cis*9, *trans*11 e do ácido linoleico. Adaptado de Carvalho et al. (2010).

2.1.2 SÍNTESE QUÍMICA

O CLA pode ser sintetizado quimicamente, a partir do ácido linoleico, originando produtos com diferentes composições dos seus isômeros. Esse processo pode variar em decorrência da fonte de ácido linoleico utilizada, assim como das condições de isomerização (SANTOS-ZAGO et al. 2008). O ácido linoleico pode ser convertido em CLAs quando uma reação microbiana ou química altera as duplas ligações (RAINER e HEISS, 2004).

Os CLAs são produzidos comercialmente por isomerização alcalina de óleos ricos em ácido linoleico, geralmente óleo de girasol ou de cartámo e tendem a conter uma mistura equimolar dos isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12 (NAGAO e YANAGITA, 2008).

Figura 3: Formação dos isômeros de CLAs, a partir da produção comercial. Adaptado de NAGAO e YANAGITA, (2008).

Este tipo de tratamento produz uma mistura de CLAs contendo aproximadamente 40% do isômero *cis*9, *trans*11 e 44% do isômero *trans*10, *cis*12. As preparações comerciais também contêm cerca de 4-10% *trans*9, *trans*11 CLA e *trans*10, *trans*12 CLA, bem como pequenas quantidades de outros isômeros (KENNEDY et al. 2010). Não há diferença entre a estrutura de CLAs formada naturalmente e de isômeros sintéticos de CLAs (KRAMER et al. 1998; HUR et al. 2007).

2.1.3 OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS

Diversos fatores influenciam a quantidade de CLAs em produtos alimentícios, como por exemplo a alimentação, idade, raça do animal e ainda os fatores sazonais (RAINER e HEISS, 2004). O estudo realizado por Hur et al. 2007 demonstrou que o conteúdo de CLAs no leite de vacas variou de 7,3 a 9,0 mg / g de gordura do leite, esta variação foi dependente da alimentação dos animais. E a concentração de CLAs encontrada na carne foi de valores entre a faixa de 0,37 a 1,08 g/100g de músculo

(McAFEE et al. 2010).

É difícil quantificar a ingestão de CLAs através da dieta, pois não há dados suficientes sobre o conteúdo dos isômeros nos alimentos, e a estimativa é realizada de acordo com os hábitos alimentares de uma amostragem da população avaliando a dieta dos voluntários (HARO et al. 2006). O consumo de CLA sofre influência do tipo e da quantidade de alimento consumido pela população (LOPES, 2010). No Brasil, o consumo de leite, carne e derivados varia consideravelmente entre as populações das diversas regiões, sendo o Sul, Sudeste e Centro Oeste os maiores consumidores (IBGE, 2004, LOPES, 2010). Ritzenthaler et al. (2001) demonstraram que aproximadamente 60% da ingestão total de CLAs procede do consumo de produtos lácteos e cerca de 37% de carnes e derivados cárneos.

O consumo médio diário de CLAs nos Estados Unidos é de cerca de 152-212 mg/dia para as mulheres e homens não vegetarianos, respectivamente, e os níveis de CLAs no soro humano é cerca de 10-70 mmol/L (KENNEDY et al. 2010). Na Inglaterra e Austrália os valores são bastante superiores, de 600-800 mg/día e 1.500 mg/día, respectivamente (WAHLE et al. 2004). Os valores encontrados para mulheres, em fase de lactação que consumiam produtos lácteos foi de 290 mg/dia de CLA, e no leite materno os valores são de 2,23-5,43 mg / g de gorduras (MCGUIRE et al. 1997, RAMÍREZ-SANTANA et al. 2011). Na Suécia, o consumo foi estimado em 160 mg/dia (JIANG et al. 1999). No Brasil a estimativa da disponibilidade de CLA, usando como alimentos-fontes o leite de vaca e seus derivados (queijo, iogurte, creme de leite, leite condensado e manteiga), além da carne de gado bovino, foi de 108 mg.g⁻¹ de gordura (LOPES, 2010).

Estima-se que para obter os efeitos benéficos atribuídos aos CLAs, seja preciso consumir cerca de 3,5g de CLA diariamente (HUR et al. 2007). Com esse intuito poderíamos criar estratégias para aumentar o conteúdo de CLAs nos alimentos (HARO et al. 2006), ou os CLAs poderiam também ser consumidos sob a forma de suplementos (WANDERS et al. 2010).

Sendo formado direta ou indiretamente pela biohidrogenação de

ácidos graxos poliinsaturados no rúmen (especialmente C18:3 e C18:2), o CLA responde de forma significativa tanto ao aumento no suprimento dietético de ácidos graxos precursores, quanto às outras estratégias de manipulação da fermentação que afetam a habilidade das bactérias de produzir, durante a fermentação, precursores destas moléculas (BOMFIM et al. 2008). A modificação intencional do conteúdo de CLAs em produtos como carnes, leites e seus derivados se dá pela suplementação dos animais com óleos ricos em ácido linoleico e α -linolênico (óleo de soja, algodão, girassol, linhaça, cártamo, colza) produzindo um aumento do conteúdo de CLAs na carne e principalmente no leite (HARO et al. 2006, BOMFIM et al., 2008).

Por outro lado, no mercado europeu encontra-se uma ampla gama de produtos (principalmente derivados lácteos) ricos em CLAs, porém neste caso os CLAs foram acrescentados industrialmente (HARO et al. 2006).

2.1.4 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS

Devido aos estudos focados nos efeitos benéficos dos ácidos graxos conjugados, suplementos dietéticos que contêm ácido linoleico conjugado (CLA) estão sendo desenvolvidos e comercializados. É essencial que se saiba quais isômeros do CLA estão contidos nesses suplementos dietéticos porque o conhecimento dos modos de atuação do CLA no organismo é incompleto. A determinação da composição desses produtos pode ser uma tarefa analítica desafiadora, os métodos de identificação de CLA em amostras biológicas consiste da extração de lipídios por cromatografia em camada delgada (CCD), ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como um primeiro passo para a análise por cromatografia líquida de íons de prata (Ag-HPLC), cromatografia a gás (CG), espectrometria de massas (MS), e ressonância nuclear magnética (RNM) (ROACH et al. 2002).

A Cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida com íons de prata (Ag-HPLC) são as técnicas mais comuns na análise de isômeros conjugados (CHEN et al. 2007; CHRISTIE, et al. 2007; SASSANO et al.

2009). A análise em colunas capilares é a mais utilizada, as colunas de 100 m CP-Sil 88, Varian, Palo Alto, CA, SP 2560, Supelco, Inc., Bellefonte, PA; BPX70, SGE, Melbourne, Austrália são as melhores colunas disponíveis para análise de CLAs. Os gases hélio ou hidrogênio são os mais comumente usados como gás de transporte (KRAMER et al. 2004; La FUENTE et al. 2006; CHRISTIE et al. 2007; YANG et al. 2009).

A extração dos lipídeos dos alimentos é considerada uma etapa fundamental na avaliação dos ácidos graxos. O método de extração dos lipídeos totais mais comumente usado baseia-se nas diferenças de solubilidade dos lipídeos nos solventes: água e metanol (fase aquosa) e clorofórmio (fase orgânica). Os lipídeos, por apresentarem maior coeficiente de partição em solventes orgânicos, são mais solúveis em clorofórmio (MARTINS et al. 2002, PINHEIRO, 2010).

Para análise da composição de ácidos graxos, os lipídeos devem ser convertidos em derivados menos polares e voláteis através de métodos de derivatização. A formação de ésteres alquílicos (os ésteres de metil, de etil, propil ou butil) é o tipo de padrão mais usado na análise de ácidos graxos, em particular na preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos. A preparação dos derivados de ésteres metílicos de ácidos graxos é realizada em uma reação simples, porém torna-se mais complicada quando a derivatização é de ácidos graxos conjugados (ALDAI et al. 2005, PINHEIRO, 2010).

Ao analisar ácidos graxos conjugados é importante que o método seja capaz de separar e quantificar estes isômeros geométricos e posicionais, evitando isomerização adicionais durante todas as etapas de derivatização (CHRISTIE et al. 2007). A preparação de derivados voláteis é a primeira etapa para analisar o perfil dos ácidos graxos por cromatografia (La FUENTE et al. 2006). Este procedimento consiste em transformar os ácidos graxos a partir de glicerídeos em ésteres metílicos. Os métodos de metilação usando NaOCH_3 ou KOH em metanol à temperatura ambiente são considerados os mais confiáveis para determinar a distribuição de isômeros de ácidos graxos conjugados porque não causam isomerização. Os métodos de catalização ácida que utilizam BF_3 , HCl ou H_2SO_4 ,

favorecem a isomerização de dienos e trienos (La FUENTE et al. 2006; CHEN et al. 2007; SASSANO et al. 2009).

Pinheiro (2010), avaliou metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários e concluiu que o método de esterificação alcalina (NaOCH_3 /metanol), seguido de separação por CG mostrou-se o mais adequado para uma quantificação segura do perfil de ácidos graxos de alimentos que contenham os isômeros conjugados do ácido linoleico.

A esterificação utilizando NaOCH_3 em metanol não provoca isomerização, mas este método não é eficiente em metilar ácidos graxos livres, portanto uma combinação com catalizadores ácidos é recomendada para esterificar todos os ácidos graxos e reduzir a formação de isomerização (KRAMER et al. 1997).

2.1.5 INCORPORAÇÃO

Desde a descoberta dos CLAs foram relatados diversos estudos mostrando a incorporação, o metabolismo e as propriedades benéficas à saúde, através de modelos animais e das culturas de células derivadas dos seres humanos e dos animais. Os benefícios foram atribuídos principalmente a dois de seus isômeros o *cis9*, *trans11* e *trans10*, *cis12* (BHATTACHARYA et al. 2006; WHIGHAM et al. 2007; SANTOS-ZAGO et al. 2008; CARVALHO et al. 2010).

Os efeitos da suplementação com CLAs são comumente estudados em tecido adiposo, glândula mamária, diabetes, mas não são tão estudadas em outros tecidos de animais como a incorporação dos isômeros de CLAs no fígado, tecido adiposo retroperitoneal, baço e coração (KELLEY et al. 2006). Esses autores suplementaram com a dieta com CLAs, 18 fêmeas C57BL/6N com 8 semanas de idade, saudáveis por 56 dias. Esses animais foram alimentados com uma dieta contendo 0,5% dos isômeros de CLA *cis9*, *trans11* ou CLA *trans-10*, *cis-12* (85–88% pureza). A dieta com CLA *cis9*, *trans11* não alterou o peso dos órgãos, e a

dieta com CLA *trans*10, *cis*12 não alterou os pesos do baço e do coração, mas este isômero influenciou aumentando o peso do fígado e aumentou também a concentração de lipídeos em duas vezes, porém o tecido adiposo retroperitoneal foi reduzido em 50%. Ambos os isômeros alteraram a composição dos ácidos graxos de todos os tecidos. O efeito principal do CLA *trans*-10, *cis*-12 era um aumento na concentração do ácido docosahexaenóico, e uma diminuição do ácido araquidônico no baço, apesar deste efeito não ser detectado quando analisaram a quantidade total de lipídeos.

YUAN et al. (2009), suplementaram ratos ICR machos com seis semanas de idade, por 42 dias com uma mistura de isômeros de CLAs na proporção de 1% incorporados na dieta. Os isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12 foram incorporados em todos os tecidos dos ratos (fígado, rim, coração, tecido adiposo perirenal e baço) examinados, em níveis variando de 0,5 a 2,0% de ácidos graxos do tecido. A proporção de ácido araquidônico (20:4 n-6) e de ácido graxo docosahexaenóico - ω 3 (22:6 n-3) foi significativamente reduzida no fígado e nos rins. No coração, o teor de ω 3 também foi reduzido pela alimentação com CLAs, embora não tenha sido significativo.

Existem poucos dados referentes às concentrações normais de CLAs no plasma humano (ZLATANOS et al. 2008), na glândula mamária e no leite materno (MOUTSIOULIS et al. 2008), e sobre a incorporação dos CLAs no tecido adiposo e músculo esquelético (GOEDECKE et al. 2009).

Zlatanos et al. (2008) investigaram os efeitos do consumo de CLAs no plasma por voluntários homens e mulheres, no estudo foram comparados o conteúdo de CLAs no plasma de indivíduos que relataram não consumir produtos lácteos (n=12), indivíduos que consumiram quantidades normais de produtos lácteos (n=77) e indivíduos que consumiram cápsulas com uma mistura de CLAs (n=12), por um período de seis meses e o único isômero de CLA que apresentou percentual de incorporação detectável foi o *cis*9, *trans*11. Um dado interessante é que, em comparação aos outros dois grupos, no grupo que foi suplementado com CLAs os indivíduos apresentaram a maior média de teor de *cis*9, *trans*11, no plasma ou seja,

0,20% do total de ácidos graxos. Relacionado a estes resultados, pode-se sugerir que o limite inferior do teor de CLAs no plasma é de aproximadamente 0,1% do total de ácidos graxos, valor encontrado no grupo que não consumia produtos lácteos.

Com o objetivo de investigar os efeitos atribuídos a suplementação de CLAs em seres humanos Goedecke et al. (2009), estudaram os efeitos da suplementação de CLAs em 25 voluntários homens e mulheres com idades entre 21 a 45 anos. Esses autores demonstraram que a suplementação com 3,9g por dia de CLAs (50:50, *trans*10, *cis*12: *cis*9, *trans*11) durante 12 semanas, aumenta a incorporação do isômero *trans*10, *cis*12 nos triacilgliceróis do tecido adiposo ou seja 0,08% para o grupo suplementado com CLA comparado a incorporação de 0,02% do isômero *trans*10, *cis*12 no grupo controle que recebeu placebo e o isômero *cis*9, *trans*11 tende a ser incorporado preferencialmente nos fosfolipídios musculares.

2.1.6 METABOLISMO

Os efeitos benéficos da suplementação com CLAs incluem a inibição da carcinogênese induzida em diversos modelos de roedores, redução da aterosclerose nos coelhos e hamsters, contribuição para o crescimento de ratos e porcos, redução do ganho de gordura corporal nos ratos, hamsters, porcos, cães e dos seres humanos (PARK e PARIZA et al. 2007).

A indução das mudanças na composição corporal é o efeito da suplementação com CLAs mais estudado, em um experimento onde ratos “Wistar”, machos e fêmeas com seis semanas de idade, foram alimentados com uma dieta contendo 0.5% de isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 de CLA (aproximadamente em uma relação de 50:50). Mostrou-se que a gordura corporal foi reduzida, entretanto o valor da redução da gordura corporal dos animais suplementados comparando aos controles era consideravelmente maior do que o valor da proteína corporal total (PARIZA et al. 2001).

Yun et al. (2008), avaliaram o efeito de três formas comerciais de CLA (CLA *cis*9, *trans*11 (96%), CLA *trans*10, *cis*12 (98%) e uma mistura contendo 41% CLA *cis*9, *trans*11 e 44% CLA *trans*10, *cis*12) em células hepáticas de ratos (HSC – T6). Entre as três formas de CLAs estudadas, o CLA *cis*9, *trans*11 apresentou o efeito citotóxico mais intenso sobre as células-HSC, a taxa de sobrevivência foi reduzida a 60%, enquanto que a sobrevivência celular foi levemente afetada pela forma mista de CLAs. As MAPKs (Mitogen – Activated Protein Kinase) 1 e 2 não foram ativadas no tratamento com CLA *trans*10, *cis*12. Isto sugere que a sinalização para a apoptose nas células-HSC é MAPKs–dependente, e é induzido por CLA *cis*9, *trans*11, ou pela forma mista de CLAs.

A taxa de metabolismo dos CLAs em ratos é variável e depende dos diferentes tecidos estudados e também é sensível às condições experimentais, principalmente quanto à forma de fornecimento dos CLAs. Nos tecidos adiposo e mamário o conteúdo de CLAs incorporados está entre 5 a 15% do total de CLAs suplementados, e em plasma e fígado cerca de 10 a 30% (BANNI, 2002). Os CLAs, como outros ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), podem ser incorporados por lipídios de membrana, a extensão da incorporação oscila entre <1% a mais de 50% do total de fosfolipídeos em diferentes células (SUBBAIAH et al. 2010).

Em um estudo realizado por Czauderna et al. (2007), ratos Wistar com oito semanas de idade foram alimentados por 29 dias com dietas contendo 1% dos isômeros de CLAs isolados, 1 ou 2% de uma mistura de isômeros de CLAs com ou sem 1,2 mg de Se/Kg (Se - Selênio). Os animais alimentados com dietas contendo mistura de 2% de CLAs tiveram o consumo de ração e o ganho de peso reduzido, enquanto a suplementação do isômero *trans*10, *cis*12 e Selênio resultou em maior ganho peso corporal. A suplementação com CLAs geralmente aumenta significativamente a concentração dos isômeros de CLA no coração e no músculo, entretanto neste estudo apenas a suplementação com o *cis*9, *trans*11 mostrou incorporação nesses tecidos. A suplementação com os isômeros isolados de CLA, reduziu a concentração de AGPI e conteúdo total de ácidos graxos no coração e músculo comparados com ratos do

grupo controle. Além disso, a adição de isômeros de CLA interferiu na conversão de ácidos linoleico e linolênico devido à concorrência dos isômeros de CLA para as mesmas enzimas ($\Delta 6$, $\Delta 5$, $\Delta 4$ - dessaturases e elongases).

2.1.7 EFEITOS NA SAÚDE E ATIVIDADE MOLECULAR

Os CLAs tornaram-se objeto de intensa investigação nas últimas décadas apenas após a descoberta de que possui atividade antimutagênica (PARK e PARIZA, 2007). Desde então, foi demonstrado também ter propriedades antiateroscleróticas (MITCHELL e McLEOD, 2008), antiobesidade (KENNEDY et al. 2010), e capacidade de melhorar a resistência a insulina em ratos (ZHOU et al. 2008). Estudos tem apontado que os CLAs atuam como um potente agente preventivo de câncer em modelos animais de carcinogênese de pele, cólon, fígado e tecido mamário (PARK, 2009). Os CLAs são conhecidos por exercerem vários efeitos biológicos, mas seus mecanismos de ação não estão bem definidos (PARK e PARIZA, 2007). Mais recentemente foi demonstrado que os CLAs podem sofrer processos de alongamento e dessaturação semelhantes aos que ocorre com o ácido linoleico, isto sugere que o (s) mecanismo (s) de ação dos CLAs podem estar diretamente relacionado (s) às suas propriedades e ao metabolismo como ácidos graxos insaturados (CZAUDERNA et al. 2007; SUBBAIAH et al. 2010).

Os estudos em modelos animais sugerem que a suplementação de CLAs diminui o desenvolvimento de aterosclerose. Em coelhos alimentados com uma dieta com 0.5 g/d de uma mistura de CLAs (40% de CLA *cis*9, *trans*11, e 40% de CLA *trans*10, e *cis*12, e 20% outros) a placa de aterosclerose reduziu significativamente após 22 semanas de suplementação (MITCHELL e McLEOD, 2008). Giudetti et al. (2005), suplementaram 24 ratos Wistar por um período de 14 dias com uma dieta composta por uma mistura comercial de CLAs (isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12 de CLA em uma relação de 50:50), e concluíram que

alimentar os animais com uma mistura de isômeros de CLAs por este período não afeta significativamente o peso corporal, a quantidade de lipídeos no fígado ou no peso do fígado. O principal efeito encontrado foi a diminuição das concentrações de colesterol no plasma total, ambos LDL e HDL diminuíram. A redução na concentração de LDL foi de 21% e era ligeiramente maior do que a do HDL 12%, apesar de uma redução no plasma da concentração de HDL a relação de HDL ao colesterol total não mudou. Pesquisas demonstram que diminuindo as concentrações de colesterol, especialmente o LDL, pode-se prevenir, impedir, ou mesmo reverter a aterosclerose.

Contrastando com os efeitos positivos da suplementação dos CLAs relatados acima, Diniz et al. (2008), estudaram em ratos Wistar os efeitos da suplementação por gavagem durante 42 dias da dose de 0,5% (0,5g/100g de ração) de CLAs (em proporção equimolar de isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans* 10, *cis*12), demonstrando que a suplementação com CLAs aumentou a circunferência abdominal dos animais, induziu o estresse oxidativo cardíaco e o acúmulo de triglicérides e aumentou a atividade da lactato desidrogenase (LDH). Concluindo que a suplementação de CLAs a longo prazo pode ser desvantajosa porque este estudo resultou em efeitos pró-oxidantes indesejáveis e induziu a alterações metabólicas no tecido cardíaco.

A suplementação com uma mistura de isômeros CLA ou com o isômero *trans*10, *cis*12 pode reduzir a adiposidade de forma consistente em modelos animais, especialmente em roedores, mas este efeito de redução da adiposidade foi verificado em apenas alguns estudos em humanos. Os mecanismos potenciais responsáveis pela propriedade antiobesidade do isômero *trans*10, *cis*12, incluem a diminuição do consumo de energia pela supressão do apetite; o aumento do gasto de energia nos tecidos: adiposo branco, no músculo e no fígado; ou no aumento da massa corporal magra; diminuição da lipogênese ou adipogênese, aumento da lipólise ou delipidação; e apoptose via estresse dos adipócitos, inflamação e/ou resistência a insulina. Possivelmente os CLAs afetam esses parâmetros através do envolvimento de: PPAR (receptores ativados por proliferador de

peroxissoma) fundamental para a lipogênese, SREBPs (proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol) que é a chave para a síntese de ácidos graxos, e / ou stearoyl-CoA desaturase (SCD), a chave para formação de TG e colesterol (KENNEDY et al. 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado uma série de mecanismos moleculares através dos quais os CLAs poderiam atuar, incluindo a alteração da síntese de eicosanóides, a redução das proteínas sinalizadoras de NF- κ B (Fator de Transcrição Nuclear κ B), e ativações de PPAR γ (REYNOLDS e ROCHE 2010). Sugere-se que os CLAs podem estar envolvidos na redução da produção de eicosanóides, interferindo nas vias de sinalização celular, inibindo a síntese de DNA, aumentando a apoptose, ou inibindo a angiogênese (PARK, 2009).

2.1.8 INFLAMAÇÃO E OBESIDADE

Atualmente sabe-se que a inflamação observada com a obesidade está associada com o desenvolvimento de inúmeras complicações. Assim há o interesse na elucidação dos mecanismos que regulam a produção de moléculas inflamatórias para melhorar a prevenção e o tratamento da obesidade e suas morbidades. O tecido adiposo não é mais considerado um reservatório passivo para o armazenamento de lipídios, mas sim um órgão importante que influencia o metabolismo energético, a sensibilidade à insulina e a inflamação através da secreção de proteínas, como as adipocinas. O desbalanço das adipocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e adiponectina, contribui para a inflamação que é uma característica da obesidade. Evidências sugerem que os ácidos graxos representam uma classe de moléculas que podem modular a produção de adipocinas, influenciando o estado inflamatório. Embora os mecanismos moleculares pelos quais os lipídeos regulam a produção de adipocinas permaneçam obscuros, descobertas recentes indicam que a interação dieta-gene pode ter um papel importante na regulação da transcrição e secreção de adipocinas. Polimorfismos, nos

genes que codificam TNF- α , IL-6 e adiponectina, podem modificar os níveis circulantes destas adipocinas. Esta variação genética também pode alterar a influência de ácidos graxos na dieta sobre a produção de adipocinas (STRYJECKI e MUTCH, 2011).

Ippagunta et al. (2011), avaliaram o efeito antiobesidade dos CLAs em camundongos alimentados com uma dieta a base de óleo de coco e compararam com uma dieta a base de óleo de soja e ainda com uma terceira dieta livre de ácidos graxos. O objetivo foi determinar se o CLA altera lipólise em animais alimentados com bases diferentes de óleos. Os animais receberam a dieta por seis semanas, em seguida foram suplementados por 10, 12 dias de CLA ou nenhuma suplementação de CLA. Os camundongos alimentados com CLA tiveram menos gordura corporal quando comparados com os animais que não receberam CLA. Houve também uma interação CLA/óleo sobre a lipólise, os grupos que receberam óleo de coco e CLA, e também o grupo que recebeu a dieta livre de gorduras e foi suplementado com CLA, tiveram as taxas de lipólise aumentadas, mas os animais alimentados com óleo de soja e CLA não apresentaram alteração na lipólise. Em conclusão, o óleo de coco aumenta o efeito antiobesidade de CLA e este efeito, pelo menos em parte, parece ser devido à lipólise. O efeito do CLA sobre a expressão e ativação de lipases e outras proteínas relacionadas a lipólise pode ser dependente do tempo.

Zhou et al. (2008) estudaram os efeitos da suplementação de uma mistura de CLAs (38,2% de *cis*9, *trans*11, 42,3% de *trans*10, *cis*12 e 19,6% de outros isômeros de CLAs) em ratos Wistar obesos durante o período de 84 dias, e demonstraram que a suplementação diminuiu significativamente o ganho de peso corporal e os níveis no plasma de ácidos graxos livres, triglicerídios e colesterol total diminuíram e a concentração de leptina, insulina e glicose no sangue dos ratos obesos também diminuíram. A suplementação com CLAs aumentou a expressão no mRNA de PPAR γ , e os níveis de aP2 (proteína ligante de ácidos graxos), FATP (proteína transportadora de ácidos graxos), acil-CoA sintetase (ACS) e adiponectina no tecido adiposo de ratos obesos aumentaram. Sugerindo que a

suplementação com CLAs pode melhorar a resistência à insulina por ativação do PPAR γ e aumento da expressão de PPAR γ genes alvo, como aP2, FATP, FAT e adiponectina no tecido adiposo branco.

2.1.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O efeito dos CLAs no processo de auto-oxidação lipídica foi extensivamente estudado nos últimos anos, com alguns resultados ambíguos, que não permitem tirar conclusões claras sobre a ação antioxidante. A presença de duplas ligações *trans* na configuração dos isômeros de CLA, contribuem para a estabilidade do mesmo à auto-oxidação, mas considerando que a conjugação de duplas ligações seria o início da autooxidação dos lipídios, os CLAs poderiam atuar como pró-oxidantes (SANTOS-ZAGO et al. 2008). Entretanto, alguns autores mostraram que os CLAs apresentavam atividade antioxidante *in vitro* (LEUNG et al. 2000; YU 2001; YU et al. 2002a) e isso foi proposto como uma possível explicação para a efeitos anticarcinogênicos e aterogênicas.

Os estudos *in vitro* que avaliam a estabilidade oxidativa dos CLAs são conclusivos com o fato de que os CLAs são mais estáveis do que outros AGPIs que não têm ligações duplas *trans* (SANTOS-ZAGO et al. 2008). No entanto Yang et al. (2009) estudaram a estabilidade oxidativa dos isômeros do CLA comparando a estabilidade oxidativa com seu correspondente não conjugado, ácido linoleico, e concluiu que, os CLAs tiveram maior instabilidade oxidativa que o ácido linoleico. Entretanto Fagali e Català, (2008), demonstraram que os CLAs também tem propriedades antioxidantes. Diferentes níveis de ácidos graxos foram investigados de acordo com a metodologia de atividade antioxidante em sistema de varredura de radicais livres (DPPH $\bullet$); ambos os isômeros CLA (*cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12) reagiram e sequestraram o DPPH em todos os níveis testados (5-25 mM), enquanto que o ácido linoleico e o metil linoleato (LAME) não apresentaram atividade de redução do radical mesmo

na maior concentração testada. Estes dados indicam que os CLAs podem fornecer proteção contra radicais livres (FAGALI e CATALÀ 2008).

Ali et al. (2011) demonstrou que os isômeros de CLA *trans*10, *cis*12 e *cis*9, *trans*11, assim como a mistura de isômeros em duas proporções, 1:6 e 1:13 (*trans*-10, *cis*-12/*cis*-9 *trans*-11) tiveram a capacidade de reagir e extinguir diretamente o DPPH em diferentes concentrações. O isômero *trans*10, *cis*12 teve maior eficácia como varredor de radicais livres, enquanto que o isômero *cis*9, *trans*11, foi mais potente diretamente em reagir e eliminar os radicais livres do que outros CLAs testados em baixas concentrações no sistema. Todos os CLAs testados foram menos eficazes em varrer os radicais, em comparação com vitamina E e BHT na concentração de 50 mM. Estes resultados sugerem que a atividade antioxidante dos isômeros de CLA poderá contribuir para suas diversas atividades biológicas.

A avaliação da atividade antioxidante dos CLAs em animais é feito por determinação quantitativa das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e das glutations (GSH), (SANTOS ZAGO, 2008). Yamasaki et al. (2000), analisaram os efeitos da suplementação dos CLAs em ratos Sprague-Dawley machos no fígado e os resultados indicaram que os níveis de TBARS e PCOOH (hidroperóxido fosfatidilcolina) hepáticos eram significativamente mais elevados nos grupos alimentados com CLAs do que no grupo controle. O PCOOH é um produto preliminar estável do processo de peroxidação e o TBARS é um produto secundário da peroxidação lipídica, concluindo-se que o tratamento adicional de CLAs pode provocar a peroxidação lipídica e em doses elevadas podem causar problemas como danos no fígado.

Em outro estudo camundongos CF¹ foram divididos em três grupos, um grupo controle, outro grupo foi alimentado com uma dieta rica em gorduras e o terceiro grupo recebeu a dieta rica em gorduras acrescido de 3% CLAs (*cis*9, *trans*11, e *trans*10, *cis*12) durante 30 dias, os resultados mostraram que a peroxidação lipídica usando método TBARS, tendem a uma normalização nos animais que receberam a dieta com CLAs

incorporados em comparação com os animais que receberam a dieta rica em gordura e este resultado foi associado a um significativo (85%), aumento no conteúdo de GSH. No entanto a atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e CAT não aumentaram com a suplementação de CLAs (ANDREOLI et al. 2009).

Uma pesquisa realizada por RAHMAN et al. (2009), com fêmeas C57BL/6 alimentadas com 0,5% os isômeros *cis*9, *trans*11 de CLA, *trans*10, *cis*12 de CLA, ou mistura de ambos isômeros do CLAs por 6 meses, mostrou aumento da massa muscular significativamente maior nos grupos que receberam o *trans*10, *cis*12 CLA e grupo CLA-mix. Esses dois grupos também apresentaram uma aumento na produção de ATP mitocondrial e das enzimas antioxidantes musculares (CAT e GPx), acompanhado por um pequeno aumento na produção H_2O_2 , quando comparado com a dieta controle (10% óleo de milho) e o grupo *cis*9, *trans*11. O estresse oxidativo, avaliado pelo TBARS e a inflamação, foram significativamente menores nos grupos que receberam os isômeros de CLAs. Indicando que os CLAs poderiam atuar na manutenção do equilíbrio redox durante o envelhecimento (RAHMAN et al. 2009). As pesquisas com CLAs chamaram muita atenção nos últimos anos, mas não se sabe como estas estruturas de ácidos graxos relativamente simples, podem ter tal variedade de funções, portanto, são necessárias mais pesquisas para esclarecer os mecanismos de atividades dos CLAs, conforme pode ser identificado na literatura atual (FAGALI; CATALA, 2008; SANTOS-ZAGO, 2008; ANDREOLI et al. 2009; PARK, 2009; RAHMAN et al. 2009; CARVALHO et al. 2010).

Tendo em vista a falta de maiores informações direcionadas aos efeitos benéficos dos CLAs à saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou no dia 29 de março de 2007 a resolução RE nº 833 , que determina a apreensão de todos os lotes do produto Ácido Linoleico Conjugado (CLA). Nenhuma empresa no Brasil tem autorização da Anvisa para fabricar, importar ou comercializar esse produto. O Ácido Linoleico Conjugado tem sido vendido para praticantes de atividade física com alegações de que o produto auxilia na queima de gordura e no

aumento de massa muscular. No entanto, ainda não existem dados que confirmem essas indicações. Por esse motivo, após avaliar estudos científicos sobre o CLA, que não comprovaram a segurança de uso e a eficácia das alegações, a Gerência-Geral de Alimentos da Agência decidiu indeferir todas as solicitações de registro (sete processos ao longo de três anos) e determinar a apreensão dos produtos que estão no mercado.

2.2 A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídios são constituídos por uma mistura de triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus (RAMALHO e JORGE, 2006).

A oxidação lipídica é um termo utilizado para descrever a complexa sequência de alterações químicas que resulta em interações dos lipídeos com oxigênio, este fenômeno é induzido por oxigênio na presença de iniciadores, tais como o calor, os radicais livres, pigmentos fotossensibilizantes e íons metálicos (LAGUERRE, LECOMTE E VILLENEUVE, 2007). Estas alterações estão associadas a estruturas moleculares conhecidas como radicais livres, que são moléculas ou átomos que têm elétrons desemparelhados e são produtos do metabolismo celular normal (MCCLEMENTS e DECKER, 2008).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) são mais suscetíveis à oxidação lipídica, em relação aos ácidos graxos saturados e ácidos graxos conjugados, porque os AGPIs tem grupos metilenos localizados entre as duplas ligações. Os radicais livres facilmente sequestram o hidrogênio do carbono metilênico levando à formação de radicais na molécula de AGPIs. Esses radicais reagem rapidamente com o oxigênio molecular, produzindo radicais peroxil. Esta reação representa a etapa de iniciação da peroxidação lipídica (BOCHKOV et al. 2010).

As etapas da oxidação dos ácidos graxos podem ser descritas em três passos gerais: Iniciação, ocorre a formação dos radicais livres do ácido

graxo devido à retirada de um átomo de hidrogênio do carbono alílico na molécula; Propagação, uma reação em cadeia que tem início com o radical alquila reagindo com o oxigênio e dando origem ao radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$), os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico; e Terminação, caracterizada pelo rearranjo dos radicais entre si formando produtos não reativos e polímeros (Figura 4), (MCCLEMENTS e DECKER, 2008).

Figura 4. Mecanismo da oxidação lipídica, adaptado de Ramalho e Jorge, 2006.

O estresse oxidativo é tradicionalmente definido como um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e sistemas antioxidantes biológicos contra EROs e ERNs. A consequência do estresse oxidativo é a modificação de macromoléculas, como DNA, lipídios, e proteínas (DAY, 2009). Para amenizar e lidar com a lesão do dano oxidativo e manter a homeostase, os organismos aeróbicos apresentam sistemas de defesa através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MIAO e CLAIR, 2009).

2.3 Os MECANISMOS ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

A exposição aos radicais livres por uma variedade de vias de formação propiciou ao organismo desenvolver mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido por espécies reativas, os quais podem ser preventivos e reparadores. A atividade de defesa através de antioxidantes enzimáticas intrínsecos ao organismo, incluem quatro enzimas principais responsáveis pela remoção do excesso, principalmente de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células, e são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reductase (GR). Os antioxidantes não enzimáticos, extrínsecos ao organismo, são representados pelos flavonóides, ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), carotenóides e outros antioxidantes (VALKO et al. 2007).

2.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima que tem a capacidade de dismutar o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Existem três isoformas distintas de SOD identificadas e caracterizadas: uma citoplasmática (Cu / ZnSOD), uma mitocondrial (MnSOD) e uma extracelular (ECSOD). Estas isoformas de SOD tem funções similares, mas as características estruturais das proteínas, localização cromossômica, distribuição genética e compartimentalização celular são diferentes entre as três isoformas (MIAO e CLAIR, 2009).

2.3.2 CATALASE (CAT)

A catalase é uma metaloproteína que catalisa o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), protegendo as células do estresse oxidativo. A catalase também pode agir como peroxidase, usando co-substratos redutores, por exemplo oxidando álcoois de cadeia curta aos aldeídos correspondentes (DAY, 2009).

2.3.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

As peroxidases que contém selenio são um grande grupo de enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato. Uma das enzimas mais estudadas é a glutathione peroxidase (GPx). As GPxs são proteínas tetraméricas onde cada monômero contém um átomo de selênio no sítio catalítico. Durante o ciclo catalítico a glutathione peroxidase reage com o peróxido de hidrogênio livre reduzindo em água e glutathione oxidada (GSSG) ou reage com os peróxidos lipídicos, reduzindo em seus alcoóis correspondentes (DAY, 2009).

2.3.4 GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A GR catalisa a redução da GSSG para a forma tiol da glutathione (GSH). E as células utilizam a GSH na redução do H_2O_2 e de outros substratos oxidantes num ciclo catalítico acoplado a NADPH (LIMA, 2008).

2.3.5 ANTIOXIDANTES ALIMENTARES

A principal forma de obtenção pelo organismo de antioxidantes consiste na ingestão de compostos com esta atividade através da dieta. A medida que se aumenta o consumo de alimentos ricos em antioxidantes, estes proporcionam tanto substâncias antioxidantes, nutrientes ou não nutrientes, com capacidade para combater os radicais livres, como substratos oxidáveis (AGPI) e traços de metais com ação catalítica (Fe^{2+} , Cu^{+}), (GIADA e MANCINI-FILHO, 2006, LIMA, 2008).

Entre os agentes antioxidantes encontrados nos alimentos destacam-se vitaminas (vitamina C e E), compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e carotenoides (β -caroteno e licopeno), (PEREIRA et al. 2009).

A vitamina C (ácido ascórbico) é considerada um dos mais potentes e o menos tóxicos dos antioxidantes naturais. É solúvel em água, sendo

encontrado em elevadas concentrações em muitos tecidos. Este agente antioxidante atua capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-o, conseqüentemente, indisponível para atuar como propagador da autoxidação (RAMALHO e JORGE, 2006). É um sequestrador muito eficaz de radicais, tais como: o ânion superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. Em soluções aquosas, também combate eficientemente espécies reativas de nitrogênio, impedindo a nitrosação de moléculas (LIMA, 2008)

A vitamina E (tocoferol), por ser um dos melhores antioxidantes naturais, é amplamente aplicada como meio para inibir a oxidação dos ácidos graxos insaturados. Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais e em alguns tipos de pescado. Existem quatro tipos segundo a localização dos grupos metila no anel: α , β , γ , δ (RAMALHO e JORGE, 2006). A forma ativa α – tocoferol é também encontrada em lipoproteínas e membranas. A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia. O α -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante dependendo do sistema testado, da concentração, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação (RAMALHO e JORGE, 2006).

O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídios da membrana e na proteção do DNA (PEREIRA et al. 2009).

Os carotenoides são pigmentos naturais que possuem um papel muito importante na fisiologia dos vegetais; conferindo-lhes cor e participando da fotossíntese, conjuntamente com a clorofila (LIMA, 2008). Reagem principalmente com os radicais peróxidos e com o oxigênio molecular. Carotenoides, como o β -caroteno e o licopeno, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoproteicas (PEREIRA et al. 2009).

Podem capturar eficientemente radicais de oxigênio singlete e

radicais peroxila. O licopeno é tido como o carotenoide que possui a maior capacidade de sequestrar o oxigênio singlete, atuando de duas formas diferentes: uma via física, que ocorre pela transferência de energia das moléculas de oxigênio singlete aos carotenóides; e uma via química, que constitui não mais que 0,5% do total da inativação do oxigênio singlete. E o β -caroteno atua sequestrando radicais peroxila por interação química. Semelhante à vitamina E, é um carotenóide que possui caráter lipofílico, atuando como antioxidante sobre as lipoproteínas LDL e HDL. São consumidos quando as LDLs se expõem a processos de oxidação (MORAES et al. 2006, LIMA, 2008, PEREIRA et al. 2009).

Compostos fenólicos são fitoquímicos que estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas e, frequentemente, apresentam propriedades antioxidantes. Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e, são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais (ANDRADE-WARTHA, 2007).

Os compostos fenólicos agem neutralizando ou sequestrando radicais livres e quelando metais de transição. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos (PEREIRA et al. 2009).

Os antioxidantes fenólicos são considerados como primários, agindo como terminais para os radicais livres, promovendo remoção ou inativação destes, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (RAMALHO e JORGE, 2006).

2.4 MÉTODOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado

consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES et al. 2010).

Um antioxidante biológico poderia ser definido como: "Substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, protege (por si e através de seus produtos de oxidação) o substrato da oxidação e, protege o organismo contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo " (LAGUERRE et al. 2010). Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (ALVES et al. 2010).

Esses métodos mostram-se necessários devido à dificuldade de medir cada composto separadamente, e às interações potenciais entre os diferentes antioxidantes no sistema. Foram descritos numerosos métodos de mensuração da atividade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final (LIMA, 2008).

2.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA DE VARREDURA DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH•)

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido

(ALVES et al. 2010).

Esta avaliação se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração violeta. Desta forma, o método avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo, não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al. 2006). Ao fixar um H•, removido do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50 % o radical DPPH• (BRAND-WILLIAMS et al. 1995).

O sistema de análise de redução do radical DPPH• pode ser considerado uma forma precisa para avaliar a atividade anti-radicalar de antioxidantes (FAGALI e CATALA, 2008). Zhang et al. (1997) demonstraram que os ácidos linoleicos conjugados (CLAs), com duas ligações duplas conjugadas, podem ser mais vulneráveis à auto-oxidação do que por exemplo o ácido linolênico com três ligações duplas intercaladas com ligações simples. Isso ocorre porque os CLAs podem facilmente doar um elétron ou hidrogênio para formar um radical livre (Figura 5). A adição de um antioxidante, no caso os isômeros de CLAs, que são capazes de doar hidrogênio, produz uma diminuição da absorbância proporcional à concentração avaliada (FAGALI e CATALA, 2008).

Figura 5. Mecanismo proposto para exemplificar a capacidade dos CLAs em doar H no sistema de análise de redução do radical DPPH•. Adaptado de Fagali e Català (2008).

2.4.2 MÉTODO DE CO-OXIDAÇÃO DO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

Esse método foi descrito inicialmente por Marco (1968) e modificado por Miller (1971) é baseado na técnica de co-oxidação dos substratos ácido linoleico e β -caroteno, em um meio emulsinado. O ácido linoleico ao ser exposto a condições que favorecem a sua oxidação (a presença de oxigênio e alta temperatura), gera estrutura radicalares que reagem com as duplas ligações do β -caroteno que perde seu cromóforo, descolorindo a solução. Este é um método sensível, mas não específico porque substâncias oxidantes ou redutoras interferem no ensaio, o método é amplamente usado e permite a determinação do poder antioxidante de compostos termo sensíveis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

Normalmente se utiliza o antioxidante sintético butil-hidroxi-tolueno (BHT) como padrão positivo para comparação dos resultados. Esse método tem sido utilizado para analisar várias matrizes alimentares, principalmente frutos e sementes ricas em lipídeos (LIMA, 2008).

Schubert, Lansky e Neeman (1999) avaliaram a atividade antioxidante de extratos do suco da romã e óleo da semente de romã pelo método β -caroteno/ácido linoleico, e verificaram que tanto os extratos do suco da romã, quanto o óleo da semente da romã, este contendo elevada quantidade de ácido graxo punico, apresentaram atividade antioxidante comparáveis ao antioxidante BHA, e próximas a atividade antioxidante do chá verde e vinho tinto.

2.4.3 MÉTODO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO – ORAC

O método foi desenvolvido por Cao e Prior (1999). Utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β -ficoeritrinas ou R- ficoeritrina, altamente fluorescentes. O fundamento do método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo (PRIOR e CAO 2000).

Ou et al. (2001) aprimoraram a metodologia ORAC original, utilizando a fluoresceína (3,6-dihidroxi-2,2,7,7-tetrametil-5,6,7,8-tetraidro-2H-xanteno[9,9-b]furan-3-ona) como marcador fluorescente estável, substituindo a ficoeritrina. Como radical livre usa-se a peroxila, espécie reativa de oxigênio biologicamente mais importante, por sua abundância e por ser responsável pelo dano oxidativo (ANTOLOVICH et al. 2002). E como fonte desses radicais utiliza-se o AAPH (2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride), (LIMA, 2008).

Os radicais peroxila diminuem a fluorescência da ficoeritrina e da fluoresceína. O antioxidante adicionado reage rapidamente com os radicais, doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Essa inibição é proporcional à atividade antioxidante (LIMA, 2008).

O ensaio ORAC tem sido empregado para medir a capacidade antioxidante de compostos puros, como a melatonina e os flavonóides, em fluídos biológicos; como o plasma, soro e a urina (CAO E PRIOR, 1999), em produtos naturais; como frutas e vegetais (PRIOR E CAO, 2000), em produtos industrializados como vinhos e chás (LÓPEZ-ALARCÓN e LISSI, 2006).

A atividade antioxidante de uma dada substância é determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco (Net AUC), medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo (ALVES et al. 2010). O antioxidante padrão utilizado é o Trolox®, que é um análogo hidrossolúvel sintético da vitamina E, com potente atividade antioxidante, apresenta capacidade antioxidante de 4000 µmol (OU et al. 2001). Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão é gerada e a atividade ORAC da amostra é calculada. Este ensaio expressa o resultado em unidades de ORAC ou equivalentes de Trolox, o qual corresponde à quantidade de Trolox em micromols que tem a mesma atividade antioxidante de um litro da solução testada (ALVES et al. 2010).

O ensaio ORAC tem sido amplamente aplicado em estudos com alimentos e suplementos alimentares pela indústria para quantificar a capacidade antioxidante. Muitos são os antioxidantes lipofílicos, e também

é conhecido que a capacidade antioxidante de um composto depende do meio de reação em que é testado. Portanto, o ensaio ORAC a base de solvente orgânico, seria particularmente útil para amostras lipofílicas. No entanto, a fluoresceína não é suficientemente solúvel em lipídios, e sua intensidade de fluorescência em solventes orgânicos apolares é muito baixa (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

2.4.4 AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM MODELO LIPÍDICO (RANCIMAT)

A perda da estabilidade oxidativa de um óleo se deve às reações de oxidação dos lipídios. A oxidação é um processo degradativo que ocorre quando o oxigênio atmosférico ou aquele que está dissolvido no óleo, reage com ácidos graxos insaturados. As reações químicas envolvidas no processo de oxidação dos óleos são muito complexas gerando, em seus estágios mais avançados, produtos sensorialmente inaceitáveis (CORSINI e JORGE, 2006).

Os testes existentes para avaliar a estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras comestíveis recorrem normalmente a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensa, tratamento térmico e /ou catálise metálica) e permitem quantificar de forma rápida, a estabilidade oxidativa de um óleo ou a eficácia teórica de um antioxidante isolado ou em associação (ANTOLOVICH et al. 2002). Os métodos existentes procuram avaliar, em condições padronizadas e selecionando um determinado parâmetro indicador, o “período de indução” da reação, ou seja, o tempo necessário para se atingir um ponto crítico de oxidação. A determinação não deve ser pontual, e restrita a um determinado momento, mas deve efetuar-se ao longo do tempo, de forma a ser representativa da duração de vida dos óleos e gorduras comestíveis (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1998).

O método Rancimat realiza a avaliação do teor de ácidos voláteis por condutimetria. A análise baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular. Estes compostos são obtidos normalmente após

iniciação forçada da oxidação a uma temperatura de 110-130°C e com corrente de ar ou de oxigênio (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1998).

Marquez-Ruiz et al. (2007) estudaram a estabilidade oxidativa no método Rancimat de um óleo rico em CLAs e compararam com a estabilidade oxidativa do óleo de cártamo e obtiveram períodos de indução (PI) de 5,7h e 5,8h respectivamente para as duas amostras.

Apesar do crescente interesse nos efeitos de consumos de óleos ricos em CLAs são poucas as informações sobre a estabilidade oxidativa desse composto, e o controle da oxidação de lípidios funcionais como os CLAs é importante, devido a sua possível influência nos suplementos e alimentos a que se é adicionado, esses produtos podem ter compostos oxidados com efeitos prejudiciais à saúde (MARQUEZ-RUIZ et al. 2007).

Em diferentes estudos tem sido demonstrado que o ácido linoleico conjugado (CLA) pode exercer atividade antioxidante e que o isômero *cis*9, *trans*11, é seletivamente incorporado aos fosfolípidos celulares, o que pode, pelo menos em parte, explicar a atividade anticarcinogênica do CLA e pode representar um mecanismo de defesa contra o ataque à membrana por radicais de oxigênio (PARK E PARIZA, 2007). Alguns pesquisadores demonstraram que os CLAs poderiam desempenhar o papel antioxidante por ação direta com os radicais livres ou quelando metais de transição suprimindo o início da formação do radical (YU, 2001 e YU et al. 2002a). Estudos também mostraram que através da ativação de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), os CLAs diminuíram iNOS (óxido nítrico sintase induzível), (YU et al. 2002b). Assim, estes isômeros conjugados de ácidos graxos poderiam atuar como antioxidante no sistema *in vivo*.

2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE TETRACLORETO DE CARBONO NO FÍGADO

Inúmeros reagentes químicos, incluindo o tetracloreto de carbono (CCl₄), são categoricamente usados em modelos com roedores a fim de investigar mecanismos de hepatotoxicidade relevante à exposição humana.

O CCl_4 é bioativado pelas enzimas citocromo P450 de fase I para o radical triclorometil ($\text{CCl}_3^\bullet$). A toxicidade resultante deste metabólito reativo é multifatorial e inclui a formação de estresse oxidativo e estado redox celular alterado (ALEKSUNES, 2005, ANDRADE-WARTHA, 2007).

O primeiro passo para o metabolismo CCl_4 (Figura 6), é a redução de um elétron e clivagem homolítica pelo citocromo P450 para produzir o radical triclorometil ($\text{CCl}_3^\bullet$), (FANG e LIN, 2008, PENG, et al. 2010). O radical $\text{CCl}_3^\bullet$ rapidamente reage com o oxigênio molecular para formar o radical triclorometilperoxil ($\text{Cl}_3\text{COO}^\bullet$), (RUCH et al. 1986, ANDRADE-WARTHA, 2007). O radical $\text{Cl}_3\text{COO}^\bullet$ é mais eletrofílico do que o radical $\text{CCl}_3^\bullet$ e pode ser o responsável por levar a peroxidação lipídica (RUCH et al. 1986).

Figura 6. Metabolismo do tetracloreto de carbono (CCl_4), Adaptado de Ruch et al. (1986).

Estes radicais induzem a peroxidação lipídica e a toxicidade, causando lesão hepática. Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) constituintes das membranas celulares, são suscetíveis à oxidação lipídica, originando radicais peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos e outras substâncias, todos atuantes como agentes oxidantes ativos. Por conseguinte, a estrutura e organelas intracelulares da membrana celular é completamente deteriorada, expandindo o dano estrutural hepático (PENG et al. 2010).

Yun et al. (2008), avaliaram os efeitos biológicos de uma mistura comercial de isômeros de CLA (41% CLA *cis*9, *trans*11 e 44% CLA *trans*10, *cis*12) em uma dieta sob um modelo de fibrose, induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4). Os animais (Wistar) foram divididos em dois grupos tratados com CCl_4 , e receberam ração comercial (grupo controle) e ração

modificada com 1% de CLAs. A dieta com CLAs inibiu significativamente o aumento das fibras de colágeno no fígados dos animais, já no grupo controle foi observado aumento no número de fibras de colágeno e fibrose ao redor da veia central. Ainda no grupo controle foi observado um aumento no número de células α -SMA (α -actina de músculo liso) ao redor da veia porta. No entanto, no grupo alimentado com CLAs o número células α -SMA era semelhante ao observado ao redor da veia porta de um fígado normal. Esses resultados indicam efeitos hepatoprotetores dos CLAs em fígados com fibrose provocada por CCl₄.

JUSTIFICATIVA

Existem evidências de que não somente a quantidade de gordura consumida, mas também o tipo de gordura, e particularmente ácidos graxos específicos, são fatores importantes tanto na prevenção como no desenvolvimento de certas doenças e na carcinogênese humana (MINIHANE e LOVEGROVE, 2006). Muitas funções das membranas são dependentes da composição lipídica e os lipídios ingeridos através da dieta podem modificar a composição e a atividade bioquímica das mesmas (MANCINI-FILHO, 2010). Portanto, é importante a realização de mais pesquisas nesta área para elucidar os mecanismos de ação dos diferentes tipos de ácidos graxos sobre as células. Neste sentido, devido as recentes descobertas de suas propriedades químicas e fisiológicas, é crescente o interesse nos ácidos graxos conjugados bem como nas propriedades de seus isômeros. Estudos sobre os efeitos fisiológicos dos ácidos graxos conjugados ainda são limitados e, portanto, a obtenção de mais informações sobre a sua função no organismo animal se tornam necessárias.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em ratos o efeito dos isômeros conjugados do ácido linoleico (*9cis*, *11trans* e *10trans*, *12 cis*) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar metodologias de esterificação para ácido linoleico conjugado e as programações por cromatografia gasosa para a separação e identificação dos CLAs;
- ✓ Analisar *in vitro* a atividade antioxidante dos isômeros conjugados do ácido linoleico (*9cis*, *11trans* e *10trans*, *12 cis*);
- ✓ Investigar o efeito dos isômeros conjugados do ácido linoleico (*9cis*, *11trans* e *10trans*, *12 cis*) em ratos Wistar saudáveis;
- ✓ Avaliar o efeito dos isômeros conjugados do ácido linoleico (*9cis*, *11trans* e *10trans*, *12 cis*) em ratos Wistar induzidos a peroxidação, pelo tratamento com tetracloreto de carbono.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 AMOSTRAS

Para os ensaios as amostras de FFA-CLA (Free Fat Acid – Conjugated Linoleic Acid) foram fornecidas pela empresa Cognis do Brasil, para o experimento I uma amostra de 500g e posteriormente outra amostra de 500g para o experimento II, o produto foi o Tonalin FFA 80, com prazo de validade de 12 meses, constituído de ácidos graxos livres dos quais aproximadamente 80% são ácidos linoleicos conjugados. Estas amostras de CLA são derivadas do óleo de cártamo e o produto é constituído por um pool (50/50) de dois isômeros ativos: CLA 18:2 *cis*-9, *trans*-11 e CLA 18:2 *trans*-10, *cis*-12.

As amostras de Óleo de Soja (OS) desodorizado foram fornecidas pela empresa Cargill, com prazo de validade de 10 meses, Foram fornecidas duas amostras de 500g cada, estas amostras foram utilizadas como suplemento lipídico (placebo), nas mesmas concentrações que as amostras de FFA-CLA.

As amostras de FFA-CLA e Óleo de soja foram divididas em frascos âmbar previamente higienizados, em volumes de 20mL e 50mL, seladas, identificadas e armazenadas em freezer -20°C. Diariamente os frascos com as quantidades de amostras a serem usadas eram retirados com antecedência para o descongelamento a temperatura ambiente.

4.1.2 ANIMAIS

Para avaliar os efeitos do FFA-CLA *in vivo* foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. albinus) machos da linhagem “Wistar”, recém-desmamados, pesando entre 50 e 70g, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação

da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química/USP. Foi utilizada uma dieta comercial balanceada (Nuvilab CR-1, descontaminada e irradiada a 12K Gy (Anexo 1)), oferecida *ad libitum*. As suplementações de FFA-CLA e óleo de soja foram realizadas por meio de entubação orogástrica utilizando seringas descartáveis e agulhas de gavage.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS DE FFA-CLA E ÓLEO DE SOJA.

Para a identificação do perfil lipídico por cromatografia gasosa, foram realizados dois métodos de esterificação descritos para isolar, analisar e identificar ácidos linoleicos conjugados, os dois métodos foram descritos por Chistie, Sébédio e Juanéda (2001).

O primeiro método consiste na esterificação com metóxido de sódio metanólico ($\text{NaOCH}_3/\text{metanol}$). A fração lipídica (50 mg de lipídeos) contendo os ácidos graxos foi transferida para tubos de esterificação, foi adicionado de 2 mL de metóxido de sódio metanólico anidro 0,5M e aquecido a 50°C por 10 minutos, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionou-se 100 μL de ácido acético glacial, 5 mL água destilada e 5 mL de hexano, a mistura foi agitada por 20 segundos em vortex e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi recuperada e filtrada com sulfato de sódio anidro. A fase inferior foi lavada com 5 mL de hexano, agitada em vortex por 20 segundos, e deixada em repouso para a separação de fases novamente e então fase superior foi recuperada e filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado com o auxílio de aquecimento (banho-maria a 40°C), os ésteres metílicos foram ressuspensos com 2 mL de hexano e a solução foi colocada em vial para análises. A esterificação foi realizada em triplicata (CHRISTIE, SÉBÉDIO E JUANÉDA, 2001).

O segundo método descrito por Chistie, Sébédio e Juanéda (2001) é a esterificação mista. A fração lipídica (50 mg de lipídeos) contendo os ácidos

graxos foi transferida para tubos de esterificação, as amostras foram diluídas em 1 mL de tolueno. Para o processo de esterificação foi adicionado 2 mL de metóxido de sódio metanólico anidro a 0,5M e a solução foi aquecida a 50°C por 10 minutos, em seguida foram acrescentados 3 mL de trifluoreto de boro (BF₃ – 14%) e novamente levado ao aquecimento em banho-maria (50°C por 10 minutos), os tubos foram resfriados em água corrente. Após este resfriamento adicionou-se 100 µL de ácido acético glacial, 5 mL água destilada e 5 mL de hexano, a mistura foi agitada por 20 segundos em vortex e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi recuperada e filtrada com sulfato de sódio anidro. A fase inferior foi lavada com 5 mL de hexano, a solução foi agitada em vortex por 20 segundos, e deixada em repouso para a separação de fases novamente e então fase superior foi recuperada e filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em N₂ com o auxílio de aquecimento (banho-maria a 40°C), os ésteres metílicos foram ressuspensos com 2 mL de hexano e a solução foi colocada em vial para análises. A esterificação foi realizada em triplicata.

4.2.2 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NAS AMOSTRAS DE FFA-CLA E ÓLEO DE SOJA.

A identificação e quantificação dos ácidos graxos presente na amostra de FFA-CLA e de óleo de soja, foram realizadas por cromatografia a gás, utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu GC, modelo 2010, com detector de ionização de chama. A coluna de sílica fundida de 100m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno (SP-2560), foi utilizada nas análises.

Foram testadas três condições cromatograficas:

A primeira condição cromatografica testada foi descrita por Kramer et al. (1997), a temperatura da coluna: isotérmica a 70°C por 4 minutos, e então aquecimento de 13°C/min até 175°C, permanecendo nesta temperatura por 27 minutos. Posteriormente foi aquecida a 4°C/min até 215°C e esta temperatura foi mantida por 31 minutos.

- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura do detector: 275°C.
- Gás de arraste: Hélio (1 mL/min.).

- Razão de divisão da amostra no injetor (*split*) = 1/50

A segunda condição cromatografica testada foi descrita por Cordain et al. (2001), a temperatura da coluna: isotérmica a 100°C por 4 minutos, e então aquecimento de 10°C/min até 175°C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. Posteriormente foi aquecida a 5°C/min até 220°C e esta temperatura foi mantida por 15,9 minutos.

- Temperatura do injetor: 215°C.
- Temperatura do detector: 250°C.
- Gás de arraste: Hélio (1 mL/min.).
- Razão de divisão da amostra no injetor (*split*) = 1/50

A terceira condição cromatografica testada foi descrita por Baublits et al., (2007) a temperatura da coluna: isotérmica a 162°C por 32 minutos, e então aquecimento de 1,4°C/min até 195°C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. Posteriormente foi aquecida a 2°C/min até 235°C e esta temperatura foi mantida por 5 minutos.

- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura do detector: 250°C.
- Gás de arraste: Hélio (1 mL/min.).
- Razão de divisão da amostra no injetor (*split*) = 1/50

A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base na área cromatográfica do padrão interno metil éster de ácido heneicosanóico (C21:0) e comparada aos tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C 4:0 a C 24:0 (padrão sigma-18919), e do padrão de CLAs (padrão sigma-05632).

4.2.3 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS E ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NAS AMOSTRAS DE FFA-CLA E ÓLEO DE SOJA – ESTÁGIO NO EXTERIOR.

Durante o período de 23 de novembro a 4 de dezembro de 2009, foi realizado um estagio na Cátedra de Bromatologia y Nutrición de La Universidad Nacional Del Litoral – Argentina, a convite do Prof. Dr. Claudio A. Bernal coordenador da rede temática CYTED-208RT0343. As atividades consistiram em

desenvolver e ajustar técnicas de análises de ácidos graxos isoméricos por cromatografia gasosa. Esse estágio corresponde as atividades previstas na rede temática CYTED-208RT0343 “Ácidos grasos isoméricos trans y CLA: intervención interdisciplinaria tendientes a reducir el riesgo de enfermedades crônicas no transmisibles” financiada por el Programa Iberoamericano CYTED.

Para a identificação do perfil lipídico por cromatografia gasosa, foi realizada a esterificação a frio. A fração lipídica (50 mg de lipídeos) contendo os ácidos graxos foi transferida para tubos de esterificação, e adicionado 1,5 mL de hexano e 500 µL de KOH (2N) em metanol. A mistura foi agitada em vortex por 1 minuto, e foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos à temperatura de 4°C. Após a centrifugação a fase superior foi transferida para um vial para análise. A esterificação foi realizada em triplicata.

A identificação e a quantificação dos ácidos graxos presentes na amostra de FFA-CLA e de óleo de soja, foram realizadas por cromatografia a gás, utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu GC, modelo 2010, com detector de ionização de chama. A coluna utilizada nestas análises foi coluna de sílica fundida, de 100m e 0,25mm de diâmetro interno (SP-2560).

A condição cromatografica testada foi:

Temperatura da coluna isotérmica a 70°C por 3 minutos, e então aquecimento de 4,9°C/min até 160°C, permanecendo nesta temperatura por 39 minutos. Posteriormente foi aquecida a 6,6°C/min até 220°C e esta temperatura foi mantida por 39 minutos.

- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura do detector: 250°C.
- Gás de arraste: Hidrogênio (1 mL/min.).
- Razão de divisão da amostra no injetor (*split*) = 1/50

A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos e comparada aos tempos de retenção da mistura de padrões de metil-ésteres C 4:0 a C 24:0 (padrão sigma-18919).

ENSAIO IN VITRO

4.2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA DE VARREDURA DE RADICAIS LIVRES (DPPH•)

A atividade antioxidante dos óleos FFA-CLA e óleo de Soja foi avaliada pelo ensaio DPPH• segundo Blois (1958) e Brand-Willians (1995), que tem por base a redução do radical [2,2 difenil-1-1-pricril-hidrazil (DPPH•)]. Ao fixar um H•, removido do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância, o que permite calcular, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50 % o radical DPPH•. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra, contendo diferentes concentrações de óleos diluído em etanol, foi adicionada a 1,5 mL de solução etanolica de DPPH• 6×10^{-5} mol/L. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle sem as amostras de óleo e com uma substancia antioxidante conhecida o BHT (Hidroxitolueno Butilado). A redução do radical DPPH• foi medida a 515 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC[®] 20 GENESYS[™], Rochester, USA) logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de densidade ótica das amostras foi correlacionado com os do controle e estabelecida a percentagem de descoloração do radical DPPH•, isto é, o sequestro de radicais livres, expresso pela Equação 1:

$$\% \text{ de proteção} = (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}} \quad (1)$$

4.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA MODELO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

A atividade antioxidante dos óleos FFA-CLA e do Óleo de Soja, foi também realizada por dois métodos de análises, o primeiro de acordo com o método descrito por Miller (1971), com algumas modificações e o segundo de acordo com o método descrito por Schubert, Lansky e Neeman (1999).

O método original descrito por Miller (1971) se baseia na oxidação (descoloração) do β -caroteno em uma determinada emulsão, observada em espectrofotômetro. Após o preparo do meio emulsionado diferentes quantidades das amostras estudadas são transferidas para o meio emulsionado e a descoloração é observada. Porém as amostras deste estudo tornaram o

substrato β -caroteno/ácido linoleico turvo, desta forma, impossibilitando a realização das leituras pelo espectrofotômetro. No entanto foi proposto a substituição do ácido linoleico pelo CLA diretamente no meio.

Para o preparo do meio emulsionado, adicionou-se 0,02 mL de solução β -caroteno (20 mg/mL de clorofórmio), 0,04 mL de ácido linoleico ou CLA e 530 mg de emulsificador *Tween* 40 e 1 mL de clorofórmio (para completa homogeneização). Posteriormente, o clorofórmio foi totalmente evaporado com nitrogênio gasoso. Por fim, foram acrescidos 100 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio num período de 30 minutos, agitando-se vigorosamente. O meio apresentou-se límpido com absorbância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Alíquotas de 5 mL desta emulsão foram transferidas para tubos espectrofotométricos. O BHT foi utilizado como padrão-referência, na concentração de 10 mg/100 mL MeOH. Todas as determinações foram feitas em triplicata. Os valores da densidade ótica foram obtidos através de espectrofotômetro (modelo SPECTRONIC® 20, GENESYS™, Rochester, USA), no período de 120 minutos a intervalos de 15 minutos, enquanto as amostras eram mantidas em banho-maria a 50°C. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, dados pelo seguinte cálculo: o decaimento da densidade ótica do controle ($Abs_{inicial} - Abs_{final}$) foi considerado como 100 % de oxidação. A partir desta relação, o decréscimo na leitura da absorbância das amostras foi correlacionado com o controle; estabelecendo-se deste modo o percentual de inibição da oxidação das amostras antioxidantes (Equação 2):

Onde:

$$\% \text{ de Oxidação} = (Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}$$

$$\% \text{ de Inibição da oxidação} = 100 - \% \text{ de Oxidação} \quad (2)$$

Abs amostra: Diferença das absorbâncias de cada amostra ($Abs. am_{inicial} - Abs. am_{final}$)

Abs controle: Diferença das absorbâncias de cada controle ($Abs. c_{inicial} - Abs. c_{final}$)

O método original descrito por Schubert, Lansky e Neeman (1999) também se baseia na oxidação (descoloração) do β -caroteno em uma determinada emulsão, observada em espectrofotômetro. Para o preparo do meio emulsionado, adicionou-se 0,2 mL de solução β -caroteno (10 mg/10mL de clorofórmio), 20 μ L de ácido linoleico e 0,5mL de emulsificante *Tween* 40. Misturou-se bem para completa homogeneização e o clorofórmio foi removido com N₂. Posteriormente,

foram acrescentadas 50 mL de água destilada agitando-se vigorosamente. O meio apresentou-se límpido com absorbância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Alíquotas de 5 mL desta emulsão foram transferidas para tubos espectrofotométricos e 2 mL das amostras diluídas em etanol (3,5mg/10mL de etanol) foram acrescentadas ao meio. O BHT foi utilizado como padrão-referência, na mesma concentração das amostras. Todas as determinações foram feitas em triplicata. Os valores da densidade ótica foram obtidos através de espectrofotômetro (modelo SPECTRONIC® 20, GENESYS™, Rochester, USA), no período de 120 minutos a intervalos de 15 minutos, enquanto as amostras eram mantidas em banho-maria a 50 °C.

4.2.6 MÉTODO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO – ORAC

O método ORAC (oxygen radical absorbance capacity assay), foi desenvolvido por Cao e Prior (1999) e consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo. A metodologia utilizada neste trabalho foi a adaptada por OU et al., (2001), e consiste na reação da solução de AAPH (2,2'- azobis (amidinopropane) dihydrochloride) que é um gerador de radical livre com fluoresceína, que é adicionada a amostra, quanto menor a intensidade da fluoresceína, maior é a capacidade antioxidante do composto. Em uma placa de 96 poços (Fischer Scientific, Hanover Park, IL) foram adicionados 25µL do padrão Trolox® (100µM) ou a mesma quantidade dos óleos FFA-CLA e óleo de Soja Adicionou-se 150µL de fluoresceína (40µM) e a placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Após este período foram adicionado 25µL de AAPH (135mM), agitou-se por 10 segundos e a seguir a placa foi colocada para a medida da fluorescência em um leitor de placas Multi-Detection microplate reader Synergy (BIOTEK®), com excitação de 493nm (filtro 485/20) e emissão em 515nm (filtro 528/20) com leituras realizadas a cada minuto, durante 1 hora.

O resultado foi calculado através da equação de regressão entre a concentração do padrão Trolox® e a área sob a curva de decaimento da

fluorescência (AUC), e expresso em micromoles equivalentes de Trolox®/g de amostra (Equação 3).

$$\frac{(AUC_{amostra} - AUC_{branco})}{(AUC_{Trolox®} - AUC_{branco})} \times \frac{\text{molaridade Trolox®}}{\text{concentração da amostra}} \quad (3)$$

4.2.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE (RANCIMAT)

A avaliação da estabilidade das amostras de FFA-CLA e óleo de soja foi realizada através do método preconizado pela AOCS Cd 12b 92 (2003). O princípio da determinação da condutividade no teste Rancimat se baseia na resistência da medição da solução dos compostos polares produzidos (MÉNDEZ et al., 1996). A avaliação da oxidação dos óleos FFA-CLA e óleo de Soja, deste estudo, foi determinada pela medição do tempo de indução para autooxidação usando um analisador Rancimat® (modelo 743, Metrohm Ltd., Herisau, Suíça) com o software PC 743 Rancimat 1.0. Amostras de 3g dos óleos foram submetidos à oxidação a 110 °C (fluxo de oxigênio 20 L/h). Os períodos de indução - PI (h) foram registrados automaticamente.

ENSAIO BIOLÓGICO

Os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimental Animal (COBEA). Experimento I – ofício CEUA/FCF/41/2007 (Anexo 2), experimento II - ofício CEUA/FCF/56/2010 (Anexo 3).

4.2.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO

4.2.8.1 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA

A dieta comercial balanceada Nuvilab CR-1 e as amostras dos tecidos: cérebro, fígado, musculo (gastrocnemius) e tecido adiposo foram submetidos a extração dos lipídeos. Estes foram extraídos conforme método preconizado por Folch, Lees e Stanley (1957). Para tanto, foram pesados cerca de 2 g de amostra a qual foram adicionados 10 mL de metanol e homogeneizados por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio e homogeneizados por mais 2 minutos. A mistura obtida foi filtrada a vácuo e coletada em *kitassato*. O resíduo contido no filtro foi então homogeneizado com 30 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1) por 3 minutos e novamente filtrado. O tubo de extração foi lavado com 20 mL de clorofórmio e o resíduo contido no filtro foi lavado com 10 mL de metanol. O filtrado contido no *kitassato* foi transferido para uma proveta e o volume foi medido para acréscimo de 1/4 de cloreto de potássio (KCl 0,88%). A mistura foi agitada manualmente e a fase superior foi aspirada. O volume residual foi aferido para adicionar 1/4 da solução metanol: água (1:1). Após agitação, a fase superior foi aspirada e a solução restante foi filtrada em sulfato de sódio. O solvente foi evaporado em rotaevaporador Micronal (modelo B525, Piracicaba, BRA) sob vácuo a 35°C.

A fração lipídica foi ressuspensa em 2 mL de clorofórmio, e transferido para tubos de vidro com tampa rosqueada e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso.

4.2.8.2 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

A fração lipídica extraída da dieta comercial balanceada Nuvilab CR-1 foi submetida a metodologia utilizada para preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos preconizada pela AOCS Ce 2-66 (2004). Em cada tubo contendo a fração lipídica extraída foram adicionados 2 mL de NaOH metanólico (0,5 N). Em seguida, os tubos foram agitados manualmente e colocados em banho fervente por 10 minutos. Após resfriamento, foram acrescentados 2,5 mL de trifluoreto de boro (BF₃) 14% e os tubos foram novamente colocados no banho fervente por 2 minutos. A mistura foi então resfriada para posterior adição de 2 mL de heptano e

nova submissão dos tubos ao banho por 1 minuto.

Os tubos foram retirados do banho, nos quais se acrescentaram 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A mistura foi agitada vigorosamente e 1 mL da fase superior foi transferida para vial contendo sulfato de sódio.

4.2.8.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As amostras resultantes da metodologia descrita acima foram analisadas em cromatografo a gás Shimadzu (modelo GC 17A, Kyoto, JPN) acoplado com *software* Class GC, utilizando-se coluna de sílica fundida SP-2560 (bis-cianopropilpolisiloxana) de 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 μ m de espessura da fase estacionária. A temperatura inicial de 140°C foi mantida em isotérmico por 5 minutos, seguida de aquecimento a 4°C por minuto até atingir 240°C onde permaneceu isotérmico por 20 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 250 e 260°C, respectivamente, o gás de arraste foi o Hélio (fluxo 1 mL/min) e a razão de divisão da amostra no injetor 1:200.

Os picos foram identificados comparando os tempos de retenção dos padrões de metil ésteres (Sigma 18919, Bellefonte, USA).

4.2.9 ANÁLISE BIOLÓGICA – EXPERIMENTO I

Para o ensaio foram utilizados 56 ratos desmamados para análises com o FFA-CLA e óleo de soja, que foram colocados em gaiolas em uma sala com temperatura controlada e fotoperíodo (ciclo claro/escuro) de 12 horas durante todo o período experimental. O experimento teve duração de 40 dias, adotando-se um período de adaptação de sete dias onde os animais tiveram alimentação e água *ad libitum*. Após o período de adaptação, para o experimento, os animais foram distribuídos em sete grupos (Figura 7), os grupos receberam a ração fornecida pelo biotério (composição da ração em Anexo 1) e água *ad libitum*.

Figura 7. Desenho Experimental: os animais foram divididos em sete grupos, n=8. O grupo controle recebeu o equivalente a 1% de água por gavagem, em relação ao consumo médio diário de dieta. Três grupos experimentais receberam óleo de soja nas concentrações de 1%, 2% e 4%, e três grupos experimentais receberam o FFA-CLA nas concentrações de 1%, 2% e 4% em relação ao consumo médio diário de dieta por gavagem.

Para o cálculo do consumo médio diário de dieta, foi fornecido 300g de ração por gaiola. Diariamente as sobras de ração foram pesadas para calcular a ingestão diária e a partir deste cálculo foi estipulado a suplementação de acordo com a descrição na figura 7. Após a pesagem a quantidade de ração era completada para 300g. Semanalmente os animais foram pesados para calcular o ganho de peso e ajustar a quantidade de amostra a ser suplementada de acordo com o crescimento dos animais. O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi obtido de acordo com a seguinte relação:

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso do animal (g)}}{\text{Consumo de ração (g)}} \quad (4)$$

Após os 40 dias de experimento, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), dose recomendada pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química/USP, e sacrificados. Foi coletada amostra de sangue pela artéria abdominal, para análise dos parâmetros bioquímicos (triglicérides, colesterol total, LDL e HDL). O fígado foi perfundido através da injeção de solução de NaCl 0,9% pela veia porta e após a perfusão o tecido hepático foi coletado, bem como cérebro músculo gastrocnêmio e tecido adiposo, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises.

4.2.10 ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO

O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C o soro obtido foi armazenado a -80°C até o momento das análises. O lipidograma, constituído por análises de triglicérides, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e a atividade das enzimas, marcadoras de dano hepático, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) foram avaliadas por meio de Kit (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil).

4.2.11 PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS DOS TECIDOS

O cérebro e o músculo gastrocnêmio foram retirados, pesados e homogeneizados, em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 igual a quatro vezes o valor absoluto da massa da amostra. Os homogeneizados foram centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos à temperatura de 4°C , a maior parte dos sobrenadantes foram empregados na avaliação da lipoperoxidação. Um volume de 1 mL dos sobrenadantes foram novamente centrifugados a $11.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C , os novos sobrenadantes gerados foram empregados na determinação da

atividade enzimática antioxidante (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase).

Fragmentos do fígado perfundidos foram então homogeneizados, em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. O homogeneizado foi centrifugado também a 3500 rpm por 20 minutos à temperatura de 4 °C a maior parte do sobrenadante foi empregado na avaliação da lipoperoxidação. Em seguida, foi tomado 1 mL do sobrenadante e, novamente, centrifugado a 10.600 rpm por 20 minutos a 4 °C. O novo sobrenadante obtido foi agora centrifugado em ultracentrífuga a 30.000 rpm por 60 minutos a 4 °C, obtendo-se a fração citosólica para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

As amostras dos tecidos homogeneizados foram armazenadas em microtubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a – 80°C até o momento das análises.

4.2.12 MEDIDA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A determinação da peroxidação lipídica nos tecidos homogeneizados foi realizada através da medida de produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se o método descrito por Ohkawa et al. (1979). Os homogeneizados foram os obtidos de acordo com os métodos descritos no item 4.2.8.

Foi tomado 200µL do soro, 200µL do homogeneizado do tecido cerebral ou músculo (1:4 p/v) ou 200µL do homogeneizado do tecido hepático (1:3 p/v), e adicionados 350µL da solução de ácido acético (20 %) pH 3,5 (ajustado com NaOH) e 600µL de TBA (0,8% dissolvido em ácido acético -20 % e pH 3,5). A mistura reativa foi aquecida em banho-maria a 95 °C por 1 h. Após resfriamento em água corrente, foi acrescentado 50µL de SDS (8,1 %), e agitados vigorosamente em vortex. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 x g por 10 minutos, a camada orgânica (superior) foi removida e sua absorbância medida a 532 nm em espectrofotômetro. Para obtenção dos cálculos foi feita uma curva padrão com TEP (10×10^{-5} mol/L) e os resultados foram expressos em µMol de equivalentes de TBARS/mg de proteína.

4.2.13 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS TECIDOS

A determinação do conteúdo de proteínas presente nos tecidos foi realizada segundo o método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951). O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de *Folin-Ciocalteu*. Assim, a intensidade da coloração desse complexo é proporcional à concentração de proteína da amostra. Os homogeneizados usados foram os obtidos de acordo com os métodos descritos no item 4.2.8. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 660nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC[®] 20 GENESYS[™], Rochester, USA). A medição foi realizada em duplicata. A quantidade de proteína da amostra foi calculada a partir de curva-padrão de albumina de soro bovino (Sigma) e os resultados foram expressos em mg de proteína por mL.

4.2.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

4.2.14.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) citoplasmática foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord & Fridovich (1969), que verifica a produção dos ânions peróxidos produzidos pela xantina oxidase em presença da xantina. O ânion superóxido reduz o citocromo C e esta redução é medida pelo aumento da densidade ótica a 550 nm numa temperatura a 25°C. O volume de xantina oxidase a ser utilizado na reação é determinado em um branco, na ausência da SOD, desta maneira obtendo-se uma variação na absorbância, a 550nm, entre 0,0250 a 0,0300/minuto. O meio de reação foi composto por citocromo C 100 µM, xantina 500 µM, EDTA 1 mM e KCN 200 µM em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. A 1 mL do meio, em cubeta de quartzo, foram adicionados a xantina oxidase (volume encontrado no branco) e 15 µL da fração citosólica de cada tecido obtidos de acordo com o método descrito no item 4.2.8. A medição foi feita em duplicata. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Entende-se

por uma unidade (U) a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da xantina a 25°C em pH 7,8.

4.2.14.2 CATALASE

A catalase propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 . A metodologia que foi empregada foi descrita por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima mediante o decréscimo da densidade ótica a 230nm (coeficiente de extensão molar $0,0071\text{nM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 37°C. O meio de reação é composto por H_2O_2 10 mM (10 μL de peridrol 30 % em 10 mL de H_2O miliQ) e tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8,0. Para a reação, foram utilizadas duas diluições, ou seja, 15 μL do homogeneizado mais 985 μL do meio e 20 μL também do homogeneizado adicionado a 980 μL do meio. As amostras (frações citosólicas) obtidas de acordo com o método descrito no item 4.2.8 foram incubadas a 37°C e realizadas leituras das absorbâncias a cada um minuto durante seis minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da catalase corresponde a atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 37°C em pH 8,0.

4.2.14.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) na fração citosólica foi determinada pela metodologia padronizada por Sies (1979). Este método fundamenta-se na medição do decaimento da densidade ótica, a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH a 30 °C (coeficiente de extinção molar igual a $6,22\text{ nM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) catalisada pela glutathione redutase. O meio de reação contém GSH 1 mM, glutathione redutase 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Inicialmente, foi tomado 1 mL deste meio, acrescentando-se 10 μL de cada amostra (fração citosólica) obtidas de acordo com o método descrito no item 4.2.8, em duplicata, incubando esta solução a 30 °C durante um

minuto. Após este tempo, foram adicionados à solução 10 µL de peróxido de terc-butila 0,5 mM, e novamente, a solução foi incubada e as leituras realizadas a cada minuto num período de 6 minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da enzima foi definida como atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

4.2.15 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS TECIDOS

Para a determinação do perfil de ácidos graxos, foram coletadas amostras dos seguintes tecidos: cérebro, fígado, músculo (gastrocnemius) e tecido adiposo. A extração da fração lipídica foi realizada conforme o método preconizado por Folch, Lees e Stanley (1957), detalhado no item **4.2.8.1**. E, em seguida, foi realizada a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos pela esterificação alcalina (NaOCH₃ em metanol), de acordo com o método descrito por CHISTIE, SEBEDIO E JUANEDA, (2001), a metodologia foi detalhada no item **4.2.1**. A identificação e quantificação dos ácidos graxos presente nos tecidos foi realizada por cromatografia a gás (MANCINI-FILHO et al., 2010).

A condição cromatografica utilizada foi a descrita por Baublits et al., (2007) a temperatura da coluna: isotérmica a 162°C por 32 minutos, e então aquecimento de 1,4°C/min até 195°C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. Posteriormente foi aquecida a 2°C/min até 235°C e esta temperatura foi mantida por 5 minutos.

- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura do detector: 250°C.
- Gás de arraste: Hélio (1 mL/min.).
- Razão de divisão da amostra no injetor (*split*) = 1/50

A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base na área cromatográfica do padrão interno metil éster de ácido tridecanoico (C13:0) e comparada aos tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C 4:0 a C 24:0 (padrão sigma-18919), e do padrão de CLAs (padrão sigma-05632).

4.2.16 ISOLAMENTO DOS ADIPÓCITOS DE TECIDO ADIPOSEO E ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Os adipócitos foram isolados mediante a técnica de digestão do tecido pela collagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações (LIMA et al., 1998). Os coxins adiposos epididimal foram retirados, picados com tesoura em finos fragmentos e incubados em tampão digestivo (DMEM, HEPES 20mM, BSA 4%, collagenase II – Sigma® - 1,0 mg/mL, pH = 7,45) por cerca de 30 minutos a 37°C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25mL de tampão (tampão EHB – sais de EARLE, HEPES 20 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1mM, sem glicose, pH = 7,45) mantido a 37°C. Para a análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico (aumento de 100x) com ocular graduada para medição de diâmetro celular. Em cada preparação foram medidas 100 células. A partir do diâmetro celular médio, admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume foi calculado de acordo com a fórmula:

$$V = [(\pi/6) \times D^3]/1000$$

Onde: **D** é o diâmetro médio de 100 adipócitos (µm) e **V** é o volume médio (DI GIROLAMO; MENDLINGER; FERTIG, 1971). A divisão por 1.000 visa expressar o volume em picolitros (pL).

4.2.17 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO MUSCULAR

O tecido muscular foi coletado e imediatamente fixado em formalina (4 %). Seções de (5 µm) foram preparadas e então, coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observações fotomicroscópicas.

As alterações sofridas pelas fibras musculares após os tratamentos foram analisadas pela quantificação da área e do diâmetro de 100 fibras, obtidas aleatoriamente no tecido muscular de cada animal. A obtenção das imagens foi realizada pela câmera CoolSNAP-Procf (*Média Cybernetics Inc*) acoplada a microscópio Nikon Eclipse-E800. As medidas foram feitas em aumento de 400 vezes (objetiva de 40x), com auxílio de sistema computadorizado de imagens

Image-ProPlus, versão 4.5 (*Média Cybernetics Inc*). Foram calculados a área e o diâmetro médios por animal e a partir destes valores, as médias e os desvios padrão finais, considerados como representativos de cada grupo.

4.2.18 ANÁLISES DOS DADOS

Para o tratamento estatístico dos dados relativos a caracterização das amostras e ensaios antioxidantes *in vitro*, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey, usando-se o *software* Prism 4.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio padrão, adotando um nível de significância de $p < 0,05$.

Os resultados das análises de colesterol, HDL-c, triglicerídeos, peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo de água, ração e óleo, ALT, AST, TBARS e enzimas antioxidantes, foram inicialmente submetidos ao teste de Hartley para serem avaliados quanto à homogeneidade das variâncias. Num segundo passo, os resultados foram analisados pela ANOVA univariada, seguido do teste paramétrico de Tukey *Honest Significant Difference* (HSD) a 5% de significância para as amostras homogêneas, o qual foi aplicado para comparação das médias. Já as amostras não-homogêneas ($P_{\text{Hartley}} < 0,05$), seguiram para aplicação do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, aplicado para comparações entre as médias.

Correlações lineares de Pearson (r) entre os parâmetros foram efetuadas no intuito de analisar a força de interligação entre dois conjuntos de dados. O critério seguinte foi utilizado para analisar a força das correlações segundo Granato et al. (2010): perfeito ($r = \pm 1,00$), forte ($\pm 0,80 \leq r < \pm 1,00$), moderada ($0,50 \pm \leq r < \pm 0,80$), fraca ($\pm 0,10 \leq r < \pm 0,50$) e correlação muito fraca ($0,01 \leq r < \pm 0,10$).

Análise multivariada utilizando a análise dos componentes principais (PCA), técnica utilizada para avaliar as correlações entre todos os resultados simultaneamente, foi aplicada ao conjunto de dados para separar os animais de acordo com seus valores de colesterol, HDL-c, triglicerídeos, peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo de água, ração e óleo totalizando 504 resultados.

Com esta finalidade, os resultados obtidos para cada parâmetro foram adotados como colunas e os animais como linhas (56 animais). A análise foi

baseada em uma correlação, e os desvios foram calculados como $SS/(n-1)$. Autovalores maiores que 1,0 foram adotados para explicar a projeção das amostras no plano-fator (1 x 2).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos pelo valor médio $\pm$ desvio-padrão (DP). Utilizou-se o programa Statistica 7.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, EUA) para todos os cálculos e análises estatísticas, enquanto os gráficos foram feitos usando o software *Prism* 4.0 (GraphPad).

Para o tratamento estatístico dos dados relativos a análise do perfil de ácidos graxos nos tecidos, isolamento dos adipócitos de tecido adiposo e análise morfométrica do tecido muscular, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey, usando-se o software Prism 4.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio padrão, adotando um nível de significância de $p < 0,05$.

4.3 ANÁLISE BIOLÓGICA – EXPERIMENTO II

Com o intuito de avaliar o efeito dos isômeros conjugados do ácido linoleico (9*cis*, 11*trans* e 10*trans*, 12 *cis*) em animais expostos a uma situação de estresse oxidativo e estado redox alterado, foi realizado um novo experimento biológico induzindo hepatopatia aguda nos animais pela administração de CCl_4 .

4.3.1 Animais

Para avaliar os efeitos do FFA-CLA foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*, var. albinus) machos da linhagem “Wistar”, recém-desmamados, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química/USP. Foi utilizada uma dieta comercial balanceada (Nuvelab CR-1, descontaminada e irradiada a 12kgray), oferecida *ad libitum*. A suplementação foi realizada por meio de entubação orogástrica (gavage) utilizando seringas descartáveis.

Os animais foram colocados em gaiolas em uma sala com temperatura controlada (25°C) e fotoperíodo de 12 horas durante todo o período experimental. O experimento teve duração de 21 dias, adotou-se um período de adaptação de sete dias. Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos em três grupos com seis animais cada: grupo controle I e grupo tetracloreto II (receberam água filtrada) e grupo III recebeu o FFA-CLA nas concentrações de 2% em relação ao consumo médio diário de dieta.

Após este intervalo de tempo, foram injetados 3mL de CCl₄ (diluição 1:1 em azeite de oliva), via subcutânea nos grupos II e III, conforme o protocolo realizado por Andrade-Wartha (2007).

Após 24 horas, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), dose recomendada pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química/USP, e sacrificados. Foram coletadas amostra de sangue pela artéria abdominal, para a determinação das enzimas de função hepática ALT e AST e para análise dos parâmetros bioquímicos triglicérides, colesterol total, LDL e HDL utilizando kit comercial Labtest®. O fígado foi perfundido através da injeção de solução de NaCl 0,9% pela veia porta e após a perfusão o tecido hepático foi coletado, armazenado a – 80°C até o momento das análises.

A ingestão da dieta e o peso dos animais foram monitorados durante todo o ensaio, com a finalidade de verificar o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de acordo como descrito no item **4.2.9**.

4.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O fígado coletado foi homogeneizado de acordo com o descrito no item **4.2.11**, o homogeneizado obtido foi usado para a quantificação da peroxidação lipídica por TBARS (item **4.2.12**), para a determinação de proteínas (item **4.2.13**), para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx (item **4.2.14**), e também para a avaliação da atividade da Glutathione redutase (GR) e quantificação da glutathione reduzida (GSH).

4.3.3 GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A GR catalisa a redução da GSSG pela oxidação do NADPH, a medição foi feita em espectrofotômetro a 340 nm em 37 °C (SIES, 1979).

O meio de reação foi preparado com tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, EDTA 5 Mm, GSSG 0,1M e NADPH 20 Mm. O ensaio foi realizado em duplicata e foram tomados 50 µL da amostra e adicionados a 970 µL de meio, incubados a 30 °C e realizadas leituras a cada minuto durante seis minutos.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto, em pH 7,0.

4.3.4 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

O ensaio foi feito segundo protocolo descrito por Tietze (1969). O mesmo se fundamenta na reação da glutatona reduzida (GSH) presente nos homogenatos com a substância 5,5'-ditiobis - 2,2 ácido nitrobenzóico (DTNB) para produzir um composto colorido que absorve espectrofotometricamente a 412 nm. Os homogenatos foram ressuspensos numa solução de EDTA (10^{-3} M) em TCA 5%. Posteriormente foi centrifugado a 17000 x g por 15min a 2°C e o sobrenadante foi coletado.

Foi colocado num tubo de ensaio 1375 µL de tampão fosfato pH 8,0 e 100 µL do sobrenadante contendo GSH. Em seguida, adicionou-se 25 µL de DTNB (10 mM) dissolvido em acetona. Os tubos foram agitados durante 15 segundos e a absorbância foi medida a 412 nm em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA). A concentração de GSH foi quantificada utilizando uma curva padrão de GSH (50 – 800 µM).

4.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey usando o software Prism 4,0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio-padrão. O valor de *p* menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS

Para o este estudo foi realizada a quantificação por cromatografia gasosa dos teores de isômeros conjugados do ácido linoleico (FFA-CLA) e o perfil lipídico da amostra de óleo de soja, através de diferentes metodologias. Para a identificação dos ácidos graxos, os tempos de retenção dos cromatogramas foram comparados aos tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C 4:0 a C 24:0 (padrão sigma-18919), e ainda para as amostras de FFA-CLA os tempos de retenção dos ácidos conjugados foram comparados ao do padrão de CLAs (padrão sigma-05632), que é composto de 42% de *cis*9, *trans*11, 44% de *cis*10, *cis*12, 10% de *cis*10, *cis*12 e 5% de *trans*9, *trans*11.

A separação cromatografica, conforme as programações de corrida testadas, estão apresentadas na figura 8. Na figura 8a observa-se que a condição cromatografica descrita por Kramer et al. (1997) resultou em boa separação de ácidos graxos, porém a proximidade entre os picos dificultou a identificação. A figura 8b mostra o cromatograma referente a condição descrita por Cordain et al. (2001), observa-se boa separação de ácidos graxos de cadeia curta, porém o tempo de corrida não foi suficiente para identificar todos os ácidos graxos. Como estas duas programações possuem tempo curto de corrida, não serão eficientes para identificar todos os ácidos graxos presentes nos tecidos que serão coletados no experimento biológico e destinados a análise de perfil lipídico.

Portanto foi testada uma terceira condição cromatografica descrita por Baublits et al., (2007), observa-se na figura 8c que esta programação resultou em uma boa separação de ácidos graxos, facilitando a identificação dos picos. Pinheiro (2010), utilizou essa programação para identificar o perfil de ácidos graxos de alimentos que continham os isômeros conjugados do ácido linoleico como carnes e leite de ruminantes, e considerou que esta programação proporciona uma boa separação dos picos de ácidos graxos. Segundo Pinheiro (2010) esta condição cromatografica, quando comparada com as outras programações (KRAMER et al., 1997 e CORDAIN et al., 2001), é a mais adequada porque resulta em uma boa separação na região dos isômeros do ácido oléico e linoleico.

Figura 8. Cromatogramas do padrão de ácidos graxos: padrão sigma 18919, correspondentes as condições cromatográficas descritas por Kramer et al., (1997), (a), Cordain et al., (2001), (b) e Baublits et al., (2007), (c).

O perfil lipídico das amostras de FFA-CLA e óleo de soja está apresentado nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Foram testadas diferentes metodologias de esterificação descritas na literatura. Foi realizado um estágio desenvolvido na Universidad del Litoral (Santa Fé – Argentina), que consistiu em testar a metodologia de metilação a frio utilizando KOH, os tempos de retenção foram comparados aos tempos de retenção relativos do padrão. Os teores de isômeros conjugados do ácido linoleico, na amostra de FFA-CLA, foram comparados ao laudo fornecido pela empresa Cognis do Brasil (Anexo 4).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos da amostra de FFA-CLA, resultados expressos em porcentagem.

Ácidos Graxos	Laudo da Cognis [#]	Metodologias Testadas (%)		
		NaOCH ₃ [*]	Mista [*]	KOH
C16:0	2,2	-	1,58 ± 0,00 ^a	1,86 ± 0,02 ^b
C18:0	2,8	-	2,52 ± 0,00 ^a	3,72 ± 0,14 ^a
C18:1	12	7,47 ± 0,18 ^a	12,61 ± 0,01 ^b	18,62 ± 0,17 ^c
C18:2 t	-	-	0,72 ± 0,00	-
C18:2 c9, c12	0,2	-	0,47 ± 0,01 ^a	1,98 ± 0,03 ^b
C18:2 c9, t11	39,5	46,91 ± 1,52 ^a	38,50 ± 0,02 ^b	36,85 ± 0,28 ^c
C18:2 t10,c12	39,3	45,62 ± 0,89 ^a	38,33 ± 0,03 ^b	36,97 ± 0,52 ^c
C18:2 t9, t11	-	-	1,50 ± 0,00	-
C18:2 c10, c12	-	-	3,75 ± 0,04	-
Total de conjugados	79	92,53	82,55	75,80

^{a,b,c} Média seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% (P<0,05), os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3).

[#] Laudo fornecido pela empresa Cognis do Brasil (Anexo4).

^{*} Programação utilizada: Baublits et al., (2007).

Observa-se na tabela 1 que a esterificação com NaOCH₃/metanol resultou em valores para os isômeros majoritários significativamente superiores (P < 0,05) aos encontrados pelas outras técnicas de esterificação analisadas e diferiram também do laudo fornecido pela Cognis (quantidades detalhadas na primeira coluna). De acordo com Pinheiro (2010), a esterificação com NaOCH₃/metanol é o método mais adequado para a análise do perfil de ácidos graxos de alimentos que contenham os isômeros conjugados do ácido linoleico

Com a esterificação mista, foi possível separar e quantificar os picos correspondentes aos isômeros descritos no laudo da Cognis do Brasil, e as quantidades identificadas de cada isômero estão próximas aos descritos pela empresa, porém esta técnica provoca a isomerização (já discutido anteriormente), foi observado a ocorrência de picos correspondentes a outros ácidos graxos conjugados que não estão descritos no laudo e também não foram identificados pelas outras técnicas de esterificação. Pinheiro (2010), também observou a formação de isômeros de CLAs, ao testar esta metodologia.

A metodologia de esterificação com KOH resultou na separação e quantificação de isômeros correspondentes aos descritos pelo laudo, porém as quantidades dos ácidos graxos conjugados foram significativamente menores ($p < 0,05$) que as encontradas nos outros métodos de esterificação, e foram inferiores também aos limites descritos no laudo da empresa Cognis do Brasil. La Fuente et al. (2006), observou que o KOH não é eficiente em reagir com ácidos graxos livres (FFA), o que torna esse método inadequado para matrizes, tais como líquidos ruminal, ou para os tecidos com altos teores desses compostos. Isso poderia explicar os resultados encontrados neste estudo.

A análise de isômeros de CLAs tem sido dificultada pela falta de materiais de referência como padrões comercialmente disponíveis. A maioria das misturas comerciais de CLAs contém geralmente apenas quatro grandes isômeros posicionais (*trans*8, *cis*10; *cis*9, *trans*11; *trans*10, *cis*12 e *cis*11, *trans*13) com quantidades menores de correspondentes dos isômeros *cis*, *cis* e *trans*, *trans* de cada isômero posicional (La FUENTE et al. 2006).

Os resultados obtidos para a caracterização do óleo de soja estão apresentados na tabela 2, a empresa Cargill que forneceu o óleo de soja não disponibilizou um laudo com as quantidades de ácidos graxos, então os resultados foram comparados apenas entre os métodos de esterificação estudados.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da amostra de óleo de soja, resultados expressos em porcentagem.

Ácidos Graxos	Metodologias Testadas (%)		
	NaOCH ₃	Mista	KOH
C 14:1	0,02 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a
C 16:0	10,25 ± 0,03 ^b	10,26 ± 0,65 ^{ab}	9,73 ± 0,05 ^a
C 18:1t	3,23 ± 0,01 ^a	3,27 ± 0,23 ^a	3,28 ± 0,12 ^a
C 18:1c	23,36 ± 0,09 ^a	23,08 ± 1,52 ^{ab}	24,72 ± 0,94 ^b
C 18:2t	1,61 ± 0,17 ^a	1,54 ± 0,08 ^a	0,48 ± 0,22 ^b
C 18:2c	54,46 ± 0,12 ^a	54,42 ± 3,45 ^a	54,41 ± 0,35 ^a
C 20:0	0,42 ± 0,00 ^a	0,41 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,01 ^b
C 20:1	0,56 ± 0,01 ^a	0,91 ± 0,03 ^b	0,92 ± 0,02 ^c
C 18:3	5,51 ± 0,01 ^a	5,47 ± 0,36 ^a	5,54 ± 0,21 ^a
C 20:3 n-6	0,43 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,01 ^a
C 20:5	0,15 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
Total	100	100	100

^{a,b,c} Média seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão ($n=3$).

* Programação utilizada: Baublits et al., (2007).

Observa-se na tabela 2 que os ácidos graxos predominantes foram o palmitico (C16:0), o oléico (C18:1), o ácido linoleico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3). As porcentagens de concentração dos ácidos graxos identificados por cromatografia gasosa para óleo de soja, estão de acordo com o esperado e condiz com os valores descritos por Ribeiro et al. (2009).

Em Pinheiro (2010), o método de esterificação utilizando NaOCH₃/metanol é o mais adequado para a análise do perfil de ácidos graxos de alimentos que contenham os isômeros conjugados do ácido linoleico e a condição cromatografica descrita por Baublits et al. (2007), foi a mais adequada, expondo uma boa separação na região dos isômeros do ácido oleico e linoleico, o que também foi observado por este estudo. Portanto só serão apresentados os cromatogramas referentes a condição cromatografica descrita por Baublits et al. (2007), observa-se na figura 9a, que este método de esterificação resultou em uma boa separação de ácidos graxos para a amostra de óleo de soja, e

possibilitou a separação dos dois principais isômeros de CLAs, para a amostra de FFA-CLA, (figura 9b). Assim a metodologia mais adequada para a avaliação dos isômeros conjugados do ácido linoléico e para as análises do perfil de ácidos graxos nos tecidos, resultados que serão apresentados no item 5.3.2, foi a metodologia de esterificação utilizando NaOCH_3 /metanol, e a programação escolhida para a separação dos ácidos graxos das amostras foi a condição cromatografica descrita por Baublits et al. (2007).

Figura 9. Cromatogramas correspondentes ao método de esterificação NaOCH_3 /metanol e condições cromatográficas descritas por Baublits et al. (2007), cromatogramas: óleo de soja (a) e FFA-CLA (b).

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Há um interesse crescente no uso de antioxidantes, na tentativa de prevenir o dano oxidativo causado por radicais livres no corpo humano. Este dano oxidativo pode ser um agente causador da ocorrência e desenvolvimento de várias doenças crônicas, como diabetes e aterosclerose. A maioria dos antioxidantes naturais são extraídos de plantas que contêm compostos antioxidantes diversos, tais como flavonóides, compostos fenólicos, carotenóides e vitaminas. Portanto, a maioria dos métodos antioxidantes para determinar a atividade antioxidante é destinada para estes compostos (ALI et al. 2011).

5.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA DE VARREDURA DE RADICAIS LIVRES (DPPH•)

A capacidade de sequestrar o radical DPPH• (expressa em percentual de inibição) exibida pelos FFA – CLA, óleo de soja e BHT estão apresentados na figura 10. O óleo de soja não foi capaz de sequestrar o radical DPPH• em nenhuma das dosagens testadas, já o FFA-CLA apresentou boa capacidade de sequestrar este radical. Esses resultados condizem com o encontrado por Fagali e Català, (2008), esses autores demonstraram que os CLAs também tem propriedades antioxidantes *in vitro*, diferentes níveis de ácidos graxos foram investigados de acordo com a metodologia de atividade antioxidante em sistema de varredura de radicais livres (DPPH•); ambos os isômeros CLA (*cis9*, *trans11* e *trans10*, *cis12*) reagiram e sequestraram o DPPH em todos os níveis testados (5-25 mM), enquanto que o ácido linoleico e o metil linoleato (LAME) não apresentaram atividade de redução do radical mesmo na maior concentração testada. Estes dados indicam que os CLAs podem fornecer proteção contra radicais livres.

Os CLAs são compostos encontrados predominantemente em produtos animais (por exemplo, leite, carne e derivados), ou produzidos comercialmente a partir de óleos ricos em ácido linoleico. Eles são oleosos, o que torna as aplicações dos ensaios antioxidantes muito limitada devido à sua natureza

lipossolúvel. Para este estudo foi realizado primeiramente o ensaio DPPH, relatado anteriormente por Yu (2001), Fagali e Catalá, (2008) e Ali et al. (2011) como um ensaio eficiente em avaliar a atividade antioxidante de CLAs.

Figura 10. Atividade antioxidante de diferentes concentrações das amostras testados BHT (a), Óleo de soja (b) e FFA-CLA (c) em sistema de redução do radical DPPH•. Valores expressos em % de captura do radical DPPH•. Os dados estão apresentados como média (n=3 para cada concentração).

Para este método também foi calculado o IC_{50} que corresponde a dose capaz de reduzir em 50% a atividade do radical DPPH•, esses resultados estão apresentados na tabela 3. Como o óleo de soja não foi capaz de sequestrar o radical não foi possível calcular o valor de IC_{50} . Já a amostra de FFA-CLA é eficiente na redução do radical pois requer uma concentração de 13,28 mg/mL para inibir em 50% a atividade do radical, no entanto esse valor de IC_{50} é muito superior ao encontrado para o BHT (24,59 µg/mL).

Resultados que corroboram com o estudo realizado por Ali et al. (2011), esses autores demonstraram que os isômeros de CLA *trans*10, *cis*12 e *cis*9, *trans*11, assim como a mistura de isômeros em duas proporções, 1:6 e 1:13 (*trans*-10, *cis*-12/*cis*-9 *trans*-11) tiveram a capacidade de reagir e extinguir diretamente o DPPH em diferentes concentrações. Todos os CLAs testados foram menos eficazes em varrer os radicais, em comparação com o BHT na concentração de 50 mM.

Tabela 3. Doses relativas à capacidade em reduzir em 50% a atividade do radical DPPH•, para o FFA-CLA e BHT.

Amostra	IC_{50}
Óleo de Soja	—
Ácido linoleico Conjugado	13,28 mg/mL
BHT	24,59 µg/mL

Ali et al. (2011) também calcularam o valor de IC_{50} , para os isômeros de CLA *cis*9, *trans*11, o IC_{50} foi de 11,1 mg/mL, para os isômeros de CLA *trans*10, *cis*12 o IC_{50} foi de 12,6 mg/mL e para a mistura de isômeros em duas proporções, 1:6 e 1:13 (*trans*-10, *cis*-12/*cis*-9 *trans*-11), os valores de IC_{50} foi de 16,3 mg/mL e 27,9 mg/mL respectivamente. Neste estudo foi observado o valor IC_{50} de 13,28 mg/mL, resultado semelhante ao encontrado no estudo de Ali et al. (2011) estes resultados sugerem que os isômeros de CLA tenham atividade antioxidante o que poderá contribuir para suas diversas atividades biológicas.

5.2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA MODELO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

Devido a dificuldade em utilizar ensaios que determine a atividade antioxidante de compostos naturais para analisar uma matriz lipídica, foi proposta a substituição do ácido linoleico pelas amostras diretamente no meio emulsionado com o intuito de verificar se o FFA-CLA seria mais susceptível a oxidação já que Zhang et al., (1997) demonstraram que os CLAs, com as suas duas duplas ligações conjugadas, poderiam ser mais vulneráveis à auto-oxidação. O meio emulsionado com as amostras de óleo de soja ou FFA-CLA foi adotado como controle e a descoloração da solução foi considerado como 100 % de oxidação e o BHT foi utilizado como antioxidante padrão-referência. Os resultados estão apresentados na tabela 4, onde pode-se observar que a substituição do ácido linoleico pela amostra de FFA-CLA foi menos susceptível a oxidação para todas as doses de BHT testadas ($p < 0,05$), quando comparado ao meio com óleo de soja.

Tabela 4. Atividade antioxidante das doses de BHT nos diferentes meios de emulsão.

Amostras utilizadas no meio	BHT 20 ug/mL	BHT 10 ug/mL	BHT 5 ug/mL
Óleo de Soja	83,27 ^a $\pm$ 0,93	74,76 ^a $\pm$ 1,23	64,23 ^a $\pm$ 0,52
Ácido Linoleico Conjugado	88,09 ^b $\pm$ 0,34	81,45 ^b $\pm$ 0,30	72,66 ^b $\pm$ 0,25

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, indicam diferença de ($p < 0,05$), os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A curva de decaimento do padrão antioxidante BHT atuando nos dois meios emulsificantes testados pode ser observado na figura 11, o meio com óleo de soja (Figura 11a) apresenta maior velocidade de decaimento, quando comparado ao meio com FFA-CLA (Figura 11b).

Foi testado ainda um segundo método descrito por Schubert, Lansky e Neeman (1999), esses autores demonstraram que uma matriz lipídica (óleo da semente da romã), poderia exercer atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os resultados estão apresentados na forma de decaimento da atividade antioxidante (Figura 12), pode-se observar que o FFA-CLA neste sistema, não apresentou atividade antioxidante, a curva de decaimento

está próxima a do controle, sem antioxidante, e a curva de decaimento para a amostra de óleo de soja, foi melhor que a do controle e da amostra de FFA-CLA, porém não se aproximou da curva do antioxidante BHT, portanto o óleo de soja apresenta uma baixa atividade antioxidante detectável neste sistema. Os dois ensaios de atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico, testados não foram eficientes em avaliar a atividade antioxidante das amostras lipídicas aqui estudadas.

a

b

Figura 11. Redução da atividade antioxidante das doses do antioxidante BHT nos diferentes meios de emulsão do sistema de co-oxidação do β -caroteno, no período de 2 h.

Figura 12. Redução da atividade antioxidante das amostras BHT, FFA-CLA e Óleo de soja. Os resultados estão expressos em média de absorbância ($n=3$), e a concentração usada foi de 3,5mg/10ml de etanol para cada amostra testada.

5.2.3 MÉTODO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO – ORAC

As análises pelo método ORAC (Tabela 5) expressas em μmol de equivalente de trolox por mL apresentaram valores de $1796,15 \pm 137,36$ para os CLAs significativamente menor do que a do óleo de soja ($2240,62 \pm 187,53$), porém salientamos que ambos valores são inferiores ao antioxidante padrão Trolox®.

Tabela 5. Atividade antioxidante do óleo de soja e do FFA-CLA, valores expressos em μmol de equivalente de Trolox®/g de amostra.

Ácido Graxo	$\mu\text{mol Trolox®/mL de Amostra}$
Óleo de Soja	$2240,616 \pm 187,5274$
FFA-CLA	$1796,152 \pm 137,3563$

5.3 AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM MODELO LIPÍDICO (RANCIMAT)

A estabilidade oxidativa das amostras foi avaliada em experimento que reproduz as condições de oxidação no aparelho Rancimat. Os períodos de indução para as amostras deste estudo foram $\text{PI}=7,48\text{h}$ para o óleo de soja e $\text{PI}=0,60\text{h}$ (36 minutos) para o FFA-CLA, a estabilidade oxidativa está intimamente relacionada com o grau de insaturação do óleo, e como a autooxidação é um processo que ocorre entre o oxigênio molecular e os ácidos graxos insaturados esperava-se que a estabilidade oxidativa do FFA-CLA fosse próxima ao óleo de soja. De acordo com Santos Zago et al. (2008), o comportamento dos CLAs no processo de autooxidação lipídica foi estudado nos últimos anos, porém os resultados são ambíguos, já que por possuírem duplas ligações trans na configuração dos isômeros, os CLAs seriam mais estáveis a oxidação que outros AGPIs. No entanto Zhang et al. (1997) demonstraram que os CLAs, com as suas duas duplas ligações conjugadas, poderiam estar mais susceptíveis à autooxidação.

Marquez-Ruiz et al., (2007) estudaram a estabilidade oxidativa no método Rancimat, de um óleo rico em CLAs e compararam à estabilidade oxidativa do

óleo de cártamo e obtiveram PI de 5,7h e 5,8h respectivamente para as duas amostras. As amostras utilizadas por esses autores, eram de triglicerídeos, diferentemente da amostra de CLA utilizada neste estudo, na forma de ácidos graxos livres, o que poderia justificar o período de indução de 36 minutos para o FFA-CLA, já que nesta forma os isômeros de CLAs poderiam ser mais vulneráveis a oxidação.

Apesar do crescente interesse nos efeitos de consumos de óleos ricos em CLAs são poucas as informações sobre a estabilidade oxidativa desse composto, e o controle da oxidação de lipídios funcionais como os CLAs são importantes, devido a sua possível influência nos suplementos e alimentos a que se é adicionado, esses produtos podem ter compostos oxidados com efeitos prejudiciais à saúde (MARQUEZ-RUIZ et al., 2007).

5.4 ANÁLISE BIOLÓGICA (*IN VIVO*)

Os resultados para a determinação do perfil de ácidos graxos da ração que foi oferecida aos animais, identificação de ácidos graxos e quantificação realizada por cromatografia a gás, estão apresentados na tabela 6. O cromatograma referente a análise do perfil de ácidos graxos da ração está em anexo (Anexo 4).

Os resultados de consumo, ingestão alimentar, ganho de peso e CEA estão apresentados na Tabela 7. A suplementação com óleo de soja e FFA-CLA, afetou ingestão de ração e o ganho de peso apenas no grupo que recebeu 4% de FFA-CLA, com redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Com relação ao ganho de peso, o grupo FFA-CLA 4% diferiu estatisticamente de todos os outros grupos estudados. Nenhuma diferença foi observada ($p < 0,05$) no CEA.

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos da ração oferecida aos animais, resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos

Ácidos Graxos	Ração
C16:0	14,21 ± 0,23
C18:0	2,85 ± 0,21
C18:1c	24,22 ± 0,01
C18:2c	52,75 ± 0,58
C20:0	0,36 ± 0,00
C20:1	0,40 ± 0,00
C18:3	4,51 ± 0,04
C22:0	0,34 ± 0,02
C24:0	0,24 ± 0,03
Saturados	17,93 ± 0,36 ^a
Monoinsaturados	24,70 ± 0,11 ^a
Poliinsaturados	57,36 ± 0,48 ^a

^a Média seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$). Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 7. Consumo da amostra, água, ingestão alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar (CEA).

Grupos	Consumo de amostra (g/d)	Consumo de Água (mL/ d)	Ingestão alimentar (g/ d)	Ganho de peso (g)	CEA
Controle	0,3 ± 0,04	41 ± 7,08	26,64 ± 3,85 ^a	207,25 ± 9,35 ^a	0,19
OS 1%	0,3 ± 0,03	39 ± 6,88	25,94 ± 3,02 ^a	206,70 ± 17,53 ^a	0,19
OS 2%	0,5 ± 0,05	37 ± 7,31	25,11 ± 2,71 ^{ab}	203,02 ± 21,20 ^a	0,19
OS 4%	1,0 ± 0,12	36 ± 6,41	23,63 ± 3,03 ^{ab}	202,04 ± 25,70 ^a	0,21
FFA-CLA 1%	0,3 ± 0,04	36 ± 8,63	24,30 ± 4,89 ^{ab}	185,02 ± 17,70 ^a	0,18
FFA-CLA 2%	0,5 ± 0,07	37 ± 7,40	23,52 ± 3,87 ^{ab}	185,25 ± 16,31 ^a	0,19
FFA-CLA 4%	0,9 ± 0,13	33 ± 5,90	19,64 ± 2,49 ^b	152,44 ± 17,49 ^b	0,19

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Neste estudo, foi observada a redução de peso nos animais alimentados durante 40 dias com a dose de 4% de CLAs, mas não para aqueles alimentados com 1 e 2% de CLAs. Ou seja, nas doses de 1 e 2%, os resultados estão de acordo com o encontrado por Giudetti et al (2005) e Botelho et al (2008), enquanto que na maior dose houve efeito redutor no ganho de peso dos animais.

Giudetti et al (2005) suplementaram 24 ratos Wistar por um período de 14 dias com uma dieta composta por uma mistura comercial de CLAs e concluíram que a mistura de isômeros de CLAs por este período, não afeta significativamente o peso corporal. Botelho et al (2008) investigaram os efeitos da suplementação com 2% de dois mix de CLAs (mix com 79% e 73% de isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) por 42 dias em ratos Wistar e não observaram diferenças no ganho de peso para nenhum grupo estudado, mas o grupo que recebeu o mix contendo 79% dos dois isômeros teve maior ingestão alimentar.

Os resultados deste estudo apontam que a dose de CLAs oferecida e o tempo de tratamento influenciam em seu efeito na redução do peso corporal. É importante destacar que o grupo que apresentou perda de peso significativa (4% CLA) também foi o que apresentou menor ingestão alimentar, sendo este um dos fatores a que se atribui o menor peso neste grupo. De acordo com Kennedy et al (2010), os mecanismos potenciais pelos quais os CLAs reduzem a gordura corporal incluem a redução do consumo de energia ou o aumento do gasto de energia e, devido os CLAs terem o potencial de reduzir a massa corpórea quando oferecidos em doses bastante elevadas, sendo tomados como um suplemento para esta proposta, é importante entender melhor seu mecanismo de ação.

Evidências sugerem que a suplementação com CLAs em estudos animais promovem a perda de peso. Park et al. (1997), foram os primeiros a demonstrar que os CLAs modulam a composição corporal. Em seu estudo, ratos Wistar receberam 0,5% de CLAs e verificou-se redução de 60% da gordura corporal, quando comparados ao grupo controle. Zhou et al (2008) estudaram os efeitos da suplementação de uma mistura de CLAs (38,2% de *cis*9, *trans*11; 42,3% de *trans*10, *cis*12 e 19,6% de outros isômeros de CLAs) em ratos Wistar, alimentados com uma dieta rica em lipídeos durante o período de 84 dias, e demonstraram que a suplementação diminuiu significativamente o ganho de peso corporal em relação ao controle que recebeu a mesma dieta.

Kim et al. (2008) apresentam diversos mecanismos que podem estar associados ao efeito dos CLAs na redução do peso, destacando-se: aumento do gasto de energia pelo aumento da termogênese e aumento da expressão de proteínas desacopladoras (*uncoupling proteins* – UCP); modulação do metabolismo lipídico pela redução da lipogênese e aumento da lipólise; redução do número de células e tamanho dos adipócitos através do aumento da apoptose

e inibição da lipase lipoprotéica dos adipócitos; e, aumento da β -oxidação dos ácidos graxos no músculo esquelético. Outro mecanismo para a redução na ingestão de alimentos foi sugerido por So et al (2009), os quais relataram que o consumo alimentar foi reduzido em 23,6% em ratos alimentados com uma dieta baixa em gordura e suplementados com CLA 10*trans*, 12*cis*. Neste estudo, os camundongos que receberam esse isômero tiveram uma relação de expressão reduzida do gene neuropeptídeo Y no hipotálamo. Estes resultados sugerem que o CLA 10*trans*, 12*cis* exerce um efeito sobre os genes que regulam o apetite no hipotálamo.

Um outro efeito da suplementação de CLAs é a influencia no metabolismo energético promovendo alterações significativas no metabolismo dos lipídios e da glicose. De acordo com Santos-Zago et al., (2008), a administração de CLAs parece ser responsável pela melhora do perfil lipídico sanguíneo, pela redução da aterosclerose, melhora na resistência a insulina e redução da gordura corporal. O estudo realizado por Giudetti et al., (2005), onde 24 ratos Wistar foram suplementados por um período de 14 dias com uma dieta composta por uma mistura comercial de CLAs (isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12), demonstrou que o principal efeito da suplementação foi a diminuição das concentrações de colesterol no plasma total, ambos LDL e HDL diminuíram. A redução na concentração de LDL foi de 21% e era ligeiramente maior do que a do HDL 12%, apesar de uma redução no plasma da concentração de HDL a relação de HDL ao colesterol total não mudou.

Neste estudo, os ratos Wistar foram alimentados com FFA-CLA por gavage durante 40 dias de experimento, as avaliações dos teores de colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos dos sete grupos de animais estão ilustrados na Figura 13, os dados estão apresentados como média e desvio-padrão, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Pôde-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos quanto aos níveis de colesterol total, Figura 13a. Mas houve uma redução no HDL-colesterol para o grupo FFA-CLA2%, Figura 13b e um aumento de triglicérides nos grupos OS2%, FFA-CLA1% e FFA-CLA2%, Figura 13c.

Figura 13. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, colesterol total (**a**), HDL-colesterol (**b**) e triglicérides (**c**). Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Estes resultados contradizem algumas pesquisas que demonstram que os CLAs atuam melhorando o metabolismo das lipoproteínas em diferentes modelos animais. De acordo com alguns autores, a suplementação com CLAs foi capaz de reduzir o colesterol total, triglicerídeos, LDL-colesterol e aumentar o HDL-colesterol (GIUDETTI et al. 2005; ZHOU et al. 2008; PARK, 2009).

Os resultados deste estudo mostram que a suplementação com CLAs em diferentes doses não altera os níveis de colesterol total em todos os grupos suplementados com CLAs, nem os níveis de HDL-colesterol nos grupos suplementados com as doses 1% e 4% de CLAs. Outros autores também concluíram que a suplementação com CLAs não alteram os níveis de colesterol total em diferentes modelos animais, nem a partícula de HDL-colesterol (WARREN et al. 2003; JAVADI et al. 2004; ZABALA et al. 2006; ANDREOLI et al. 2009). No entanto, neste estudo a suplementação na dose de 2% CLA houve uma redução no nível de HDL-colesterol quando comparado ao grupo controle e ao grupo suplementado com 1% CLA, mas não quando comparado ao seu grupo

correspondente 2% OS nem ao grupo 4% CLA. A redução no HDL-colesterol neste grupo está de acordo com o observado por Giudetti et al (2005), porém a expectativa neste estudo era de obter um resultado dose-resposta. Vale salientar que, outros autores também não observaram resultados dose-resposta dos CLAs quando avaliaram diferentes efeitos deste composto no organismo. Kim et al (2008) concluíram em seu trabalho que o efeito do CLA no peso corpóreo não foi dose dependente e que estudos prévios ilustram que a redução no ganho de peso e os efeitos no perfil lipídico depende da composição dos isômeros e da quantidade de CLAs administradas, da duração do tratamento, do peso inicial e da ingestão dietética dos animais.

Alguns estudos mostram que não há alteração nos níveis triglicéridos do soro após suplementação com CLAs. Botelho et al (2008) utilizaram ratos Wistar suplementados com 2% de CLA (75% dos isômeros *cis9*, *trans11* e *trans10*, *cis12* de CLA) durante 42 dias e os níveis de triglicéridos não se alterou após esse período. Diniz et al (2008) estudaram em ratos Wistar os efeitos da suplementação também por 42 dias na dose de 0,5% (0,5g/100g de ração) de CLAs (em proporção equimolar de isômeros *cis9*, *trans11* e *trans10*, *cis12*) por gavagem e demonstraram que não houve alteração nos triglicéridos do soro nos animais suplementados com CLAs em relação ao controle, porém, no grupo que recebeu 30% de sacarose e suplementação com CLAs, houve acúmulo de triglicéridos no soro. De uma forma geral, esses autores concluíram que a suplementação com CLAs aumentou a circunferência abdominal dos animais, induziu o estresse oxidativo cardíaco e o acúmulo de triglicéridos.

Zhou et al (2008) avaliaram em ratos Wistar o efeito da suplementação com três doses de CLAs em animais que receberam dieta hiperlipídica. Os animais que receberam uma dieta hiperlipídica apresentaram níveis mais elevados de TG no plasma quando comparados ao controle que recebeu dieta normolipídica. Aqueles que receberam dieta hiperlipídica, suplementadas com diferentes doses de CLAs, normalizaram os níveis de TG no plasma quando comparados ao grupo controle que recebeu dieta normolipídica. Entretanto, a proporção dos valores de TG e as doses são similares aos encontrados no nosso trabalho, uma vez que na menor dose (0,75%) obtiveram os maiores valores de TG (1,61mmol/L), na dose intermediária (1,5%) apresentou níveis de TG de 1,40mmol/L e na maior dose (3,0%) apresentou níveis menores que o grupo controle (1,08mmol/L).

Portanto, apesar das concentrações de CLAs serem diferentes do nosso trabalho, pode-se observar certa proporcionalidade entre eles e também resultados heterogêneos. Além disso, os resultados deste estudo estão de acordo com os resultados de Deckere et al (1999), que também observaram aumento nos níveis de triglicerídeos no plasma de hamster após suplementação com 2% de um mix de CLAs por quatro semanas. Machado et al (2010), relataram que Animais alimentados com ácidos graxos *trans*, como é o caso dos CLAs, apresentam concentrações de triglicerídeos maiores nas partículas de VLDL e LDL comparados com animais alimentados com ácidos graxos polinsaturados.

Os resultados obtidos por este estudo quanto aos níveis séricos de ALT Figura 14a e AST Figura 14b, não diferiram significativamente ($p > 0,05$) ou foram inferiores aos resultados encontrados no grupo controle, indicando que a suplementação com CLAs não provocou dano hepático, e estão de acordo com os resultados encontrados por Kim et al (2008). Esses autores avaliaram a suplementação de 0,5 e 1,5% de CLAs em ratos durante 5 semanas e não observaram diferença significativa para os níveis de ALT, mas uma redução nos níveis de AST de uma forma dose-dependente.

Figura 14. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, alanina aminotransferase (**a**), aspartato aminotransferase (**b**). Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$), quando utilizado o teste de Tukey (gráfico a) ou quando utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (gráfico b).

No estudo realizado por Yamasaki et al. (2000), foram analisados os efeitos da suplementação dos CLAs sobre o fígado de ratos e esses autores observaram que o tratamento adicional de CLAs pode provocar a peroxidação lipídica e em

doses elevadas podem causar problemas como danos hepáticos. ANDREOLI et al. 2009 estudaram três grupos, um grupo controle, o segundo grupo foi alimentado com uma dieta rica em gorduras e o terceiro grupo recebeu a dieta rica em gorduras acrescido de 3% CLAs (*cis9*, *trans11*, e *trans10*, *cis12*) durante 30 dias, os resultados para alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) tiveram níveis semelhantes em todos os grupos, os valores permaneceram dentro dos níveis considerados normais para as enzimas indicadoras de dano oxidativo.

O ácido linoleico conjugado também tem sido apontado por alguns pesquisadores como responsável por promover acúmulo de lípidos no fígado de animais, o que pode resultar em esteatose e esteatohepatite, no trabalho realizado por Santos-Zago et al., (2007) não foram observadas diferenças significantes ($p > 0,05$) quanto ao conteúdo de lípidos total hepático entre o grupo controle e os grupos que receberam mix de CLAs por 42 dias.

Para os dados de peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo de água, ração, óleo, colesterol, HDL-c e triglicerídeos foi realizada a análise multivariada utilizando a análise dos componentes principais (PCA), técnica utilizada para avaliar as correlações entre todos os resultados simultaneamente.

A análise multivariada é uma ferramenta estatística indicada quando o número de variáveis envolvidas é grande e o pesquisador não percebe como as observações podem ser resumidas em uma ou mais características que condensem o volume de informações. O objetivo é processar informações de modo a simplificar a estrutura dos dados e a sintetizar informações das amostras, facilitando o entendimento do relacionamento existente entre as variáveis do processo (OLIVEIRA, 2010).

A estatística multivariada realiza a redução e sumarização de dados explicando-as através de suas dimensões comuns, que são os fatores calculados. É possível encontrar tantos fatores quanto forem as variáveis, porém há uma perda de objetividade ao se utilizar um grande número de fatores. A redução do número de fatores se dá através da análise de correlação.

Os autovalores (Eigenvalues) obtidos por PCA para variáveis são apresentados na tabela 8. Eles foram organizados em ordem decrescente, indicando a importância do respectivo fator para explicar a variação dos dados.

Os fatores 1 e 2, foram selecionados, pois dois componentes principais são suficientes para explicar 57,18% da variância.

Tabela 8. Eigenvalues da matriz de correlação e as estatísticas relacionadas.

Value number	Eigenvalue	% Total Variance	Cumulat Eigenvalue	% Cumulative
1	3,690770	41,00855	3,690770	41,0086
2	1,455845	16,17606	5,146615	57,1846
3	1,182585	13,13983	6,329200	70,3244
4	1,027076	11,41196	7,356276	81,7364
5	0,663530	7,37256	8,019806	89,1090
6	0,594967	6,61074	8,614773	95,7197
7	0,260573	2,89525	8,875345	98,6149
8	0,124655	1,38505	9,000000	100,0000

A influência da variação percentual do HDL-colesterol, peso final, ganho de peso, consumos de água, ração e óleo no primeiro componente principal e a influência do triglicerídeos e peso inicial no segundo componente principal são mostrados na Figura 15. Observa-se na figura 15, a distribuição das variáveis no círculo de correlação, onde as variáveis mais próximas ao círculo de correlação são altamente representativas para o plano fatorial traçado.

Figura 15. Projeção das variáveis sobre o plano-fator [o fator 1 (41,01%) em comparação com o fator 2 (16,18%)].

No presente estudo, PCA foi utilizada para determinar a similaridade entre todos os grupos de animais tratados com diferentes concentrações de óleos e

para mostrar quais as variáveis que mais contribuíram para a diferenciação. O primeiro componente principal (PC) (eigenvalue 3,69) associou o HDL-colesterol, peso final, ganho de peso, consumo de água, ração e óleo, enquanto o segundo PC (eigenvalue 1,45) foi associado ao conteúdo de TG e o peso inicial. O primeiro PC (componente principal) é o mais importante para o estudo, pois é derivado do maior autovalor e possui uma variância explicada de 41% de toda a variabilidade do conjunto de dados. Os dois primeiros PCs levaram em conta 57,18% da variância total. Na figura 16, pode-se observar que apresentaram o maior valor de HDL-c, maior peso final, ganho de peso, consumo de água, ração e óleo, os animais que estavam dispostos no lado esquerdo do gráfico enquanto os animais presentes no lado direito do gráfico de dispersão apresentaram menores valores destes parâmetros, exceto para o parâmetro consumo de óleo. Amostras incluídas no primeiro quadrante (à direita e acima) apresentam características muito semelhantes, de baixo HDL-c e baixo teor TG. Pode-se observar que os grupos de animais não estão totalmente bem separados, apresentando algumas sobreposições entre os grupos.

Figura 16. Projeção dos animais sobre o plano-fator: PC1 e PC2. As variáveis foram: colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides (TG), peso final, ganho de peso, consumos de água, ração e óleo.

O diferencial de técnicas de estatística multivariada, como a PCA é que o pesquisador pode observar correlações entre os parâmetros e os animais simultaneamente, o que permite a identificação de características importantes.

5. 3. 1 INFLUÊNCIA DAS SUPLEMENTAÇÕES COM ÓLEO DE SOJA E COM FFA-CLA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Pesquisas demonstraram que os CLAs apresentavam atividade antioxidante (LEUNG, et al., 2000; YU 2001; YU et al., 2002a) e isso foi proposto como uma possível explicação para a efeitos anticarcinogênicos e aterogênicos (FAGALI e CATALÀ, 2008). A avaliação da atividade antioxidante dos CLAs em animais é feita por determinação da quantidade das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e também pela atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e das glutatonas (GSH), (SANTOS ZAGO, 2008).

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A determinação da peroxidação lipídica no soro e nos tecidos dos animais estudados foi realizada através da medida de produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostram que não houve diferença estatística na produção de TBARS no soro, entre os grupos estudados, Figura 17a. Já para o tecido hepático, houve uma redução do índice da peroxidação lipídica dos animais tratados com OS 1% ($1,07 \pm 0,33$ mmoles de TBARS/mg de proteína), quando comparado ao grupo OS 2% ($1,62 \pm 0,29$ mmoles de TBARS/mg de proteína) com $p < 0,05$, ilustrada na Figura 17b, para os demais grupos não foram observadas diferenças estatísticas, entretanto percebe-se uma tendência à diminuição da produção de TBARS nos animais suplementados com FFA-CLA 1% e FFA-CLA 2%.

Neste estudo no tecido cerebral, os produtos resultantes da peroxidação lipídica tiveram uma redução de TBARS nos grupos OS 2%, FFA-CLA 1% e FFA-CLA 4% ($10,91 \pm 2,95$; $11,88 \pm 2,44$; $12,51 \pm 1,89$ μ moles de TBARS/mg de proteína, respectivamente). Esses índices foram estatisticamente diferentes do

encontrado no grupo FFA-CLA 2% ($16,04 \pm 1,37$ mmoles de TBARS/mg de proteína), mas esses índices não diferiram dos valores encontrados nos grupos controle, OS 1% e OS 4%. Dados mostrados na Figura 17c.

No tecido muscular o índice de peroxidação lipídica para os grupo tratados com FFA-CLA não diferiu estatisticamente do grupo controle, entretanto percebe-se uma tendência ao aumento da produção de TBARS nos grupos suplementados com OS (Figura 17d).

Figura 17 Efeito da suplementação com FFA-CLAs e OS na peroxidação lipídica no soro (a), tecido hepático (b), cerebral (c) e muscular (d) em ratos, durante 40 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão ($n = 7 - 8$). $p < 0,05$.

Em estudo realizado por Santos Zago et al. (2007) com animais Wistar suplementados com dois mix de CLAs por 42 dias, foi observado que os índices de TBARS no soro dos grupos suplementados com CLAs, foram inferiores aos valores encontrados no grupo controle (ácido linoleico), entretanto os índices de

peroxidação lipídica no tecido hepático não diferiram estatisticamente entre os grupos estudados. Andreoli et al. (2009) estudando em três grupos de ratos, um grupo controle, um segundo grupo alimentado com uma dieta rica em gorduras e o terceiro grupo recebendo a dieta rica em gorduras acrescido de 3% CLAs (*cis*9, *trans*11, e *trans*10, *cis*12) durante 30 dias, não observaram diferença entre os grupos para o índice de peroxidação lipídica no fígado dos animais estudados. Neste estudo, também não foram observadas alterações para os níveis de TBARS no soro e fígado dos grupos estudados.

Deve-se salientar que os resultados da suplementação de óleo de soja e a diferença entre os grupos 1 e 2% nos valores de TBARS, não apresentaram uma correlação dose resposta. No entanto, deve-se destacar que quando comparados com o controle, os dois grupos apresentam-se com resultados similares e também são semelhantes aos grupos tratados com 4% OS, 1, 2 e 4% de CLA. Estas observações serão complementadas com os resultados da avaliação de ácidos graxos nos fígados destes animais, isto é, o nível de incorporação do ácido linoleico (OS) e dos CLAs nos tecidos. Pois a presença dos ácidos graxos polinsaturados pode gerar a produção de radicais livres devido às configurações não conjugadas, fazendo com que o carbono metilênico entre eles fiquem sujeitos à perda de um átomo de hidrogênio a qual está associada à elevada concentração eletrônica das duplas ligações levando a um efeito indutivo negativo (McCLEMENTS; DECKER, 2008; OLADIJI et al. 2009).

É recente o interesse em estudar os efeitos da suplementação de CLAs nos tecidos cerebral e muscular. Como consequência são poucos os estudos nesses tecidos e os resultados não são conclusivos. De acordo com Valenzuela (2008) os ácidos graxos que possuem uma ligação *trans* como é o caso dos CLAs praticamente não são incorporados no tecido cerebral, diferentemente do que acontece nos tecidos hepático e adiposo. O que acontece no tecido cerebral é que a barreira hemato-encefálica é seletiva e impede a passagem de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans*, e dessa forma a incorporação desses ácidos graxos seria mínima.

Barbosa et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação de CLAs e óleo de linhaça na atividade subtipos de fosfolipase A₂ em cérebro de ratos Wistar, para este estudo 48 ratos receberam por gavagem: 1,1 mL/dia durante 30 dias de solução salina (controle), CLAs, óleo de girassol, e óleo de linhaça, os

resultados mostraram que há aumento na atividade dos subtipos de fosfolipase A_2 no cortex para os grupos alimentados com óleo de girassol, e óleo de linhaça, e aumento na atividade dos subtipos de fosfolipase A_2 no hipocampo do grupo alimentado com CLAs. Este estudo demonstra que apesar de a incorporação de CLAs ser mínima no tecido cerebral, é suficiente para interferir em rotas metabólicas. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas para o nível de peroxidação lipídica, através da medida de TBARS, no cérebro dos animais estudados. É possível que a proteção conferida pela barreira hematoencefálica seja a explicação para este efeito.

Rahman et al. (2009) avaliaram os efeitos dos isômeros de CLA em prevenir a perda muscular associada a idade, para este estudo foram escolhidos animais C57BL/6 com 12 meses de idade, os camundongos foram suplementados com 0,5% de *cis9*, *trans11*, o isômero *trans10*, *cis12*, ou um mix de CLAs (*cis9*, *trans11*, e *trans10*, *cis12*) por 6 meses. Os resultados para o índice de peroxidação lipídica, demonstraram que a suplementação com os isômeros de CLAs e com o mix de CLAs foi capaz de inibir a oxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle que não recebeu suplementação. Apesar dos valores encontrados no estudo de Rahman et al., (2009) para o mix de CLAs terem sido semelhantes aos valores encontrados neste estudo, não se encontra diferença significativa para inibição da oxidação entre os grupos tratados e o controle. Entretanto, esses autores avaliaram o músculo *quadríceps* em um modelo animal diferente do do que foi avaliado neste estudo, que fez avaliação do músculo avaliado foi o *gastrocnêmio*, em ratos Wistar. Isto sugere que os CLAs apresentam diferentes efeitos dependendo do compartimento muscular estudado, bem como do tecido, do modelo animal e da dose utilizada.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Nos resultados pôde-se observar que a atividade da enzima antioxidante CAT no fígado para os grupos que foram suplementados com 1% e 2% de FFA-CLA foi significativamente menor quando comparada aos grupos que receberam 1% e 2% de OS, e também quando comparados ao grupo controle (Figura 18a). Ainda neste mesmo órgão, houve um aumento significativo na atividade de SOD apenas para os grupos OS 2% (60 U de atividade enzimática/mg de proteína) e

FFA-CLA 4% (52 U de atividade enzimática/mg de proteína), (Figura 18b). Para a enzima GPx apenas o grupo que recebeu OS 2% apresentou aumento na atividade desta enzima, em relação ao controle (água) (Figura 18c).

Figura 18. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (a), superóxido dismutase (SOD) (b), glutathiona peroxidase (GPx) (c) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupo controle), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em fígado de ratos, suplementados durante 40 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 7-8), $p < 0,05$.

Neste estudo, foi observada redução na atividade da CAT para os grupos que receberam 1% e 2% de CLA em relação aos controles (água, 1% OS e 2% OS). Entretanto, não foram observadas quaisquer diferença para os níveis de SOD e GPx no fígado dos animais que receberam CLA em relação ao controle; embora houvesse uma redução na atividade da GPx nos grupos que receberam CLA em relação aos respectivos 1%, 2% e 4% OS, estes últimos também não diferiram do controle (água).

A atividade antioxidante dos CLAs foi demonstrada em células de hepatócitos de ratos Sprague-Dawley, neste estudo, a SOD foi diminuída em células expostas aos CLAs sugerindo que a produção de O_2 , o iniciador das grandes cascatas de radicais de oxigênio que alimenta a peroxidação lipídica, não ocorre em células tratadas com concentrados de CLAs. Foi observado que a atividade da CAT diminuiu significativamente, mas a GPx não teve qualquer efeito significativo (CANTWELL et al., 1999).

Santos-Zago et al., (2007) estudaram os efeitos da suplementação de dois tipos diferentes de mix de CLAs (2% em relação ao consumo alimentar), em ratos Wistar machos por 42 dias e observaram diferença significativa ($p < 0,05$) quanto a atividade da catalase no soro, apenas para o grupo que recebeu uma das misturas comerciais de CLAs (*AdvantEdge®*) em relação ao controle. A redução da atividade da catalase pode indicar menor produção de peróxido que, por sua vez, indicam um menor grau de estresse oxidativo.

Em outro estudo camundongos CF¹ foram divididos em três grupos, um grupo controle, um grupo foi alimentado com uma dieta rica em gorduras e o terceiro grupo recebeu a dieta rica em gorduras acrescido de 3% CLAs (*cis9*, *trans11*, e *trans10*, *cis12*) durante 30 dias, os resultados mostraram que o grupo alimentado com CLAs apresentou um aumento no conteúdo de glutathionas totais (GSH). Já a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) e CAT não aumentaram com a suplementação de CLAs (ANDREOLI et al. 2009).

Os resultados deste estudo estão de acordo com os trabalhos citados acima, mas embora os resultados de redução da atividade da catalase nos levem a concluir que o CLA age como antioxidante, ele não alterou os níveis das enzimas SOD e GPx, bem como não foi observada alteração na medida da peroxidação lipídica no fígado dos animais suplementados com CLA. Portanto, mais estudos são necessários para apontar o efeito dos CLAs na oxidação de lipídeos biológicos.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx no cérebro estão apresentados na figura 19. Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas na atividade da GPx no cérebro para o grupo OS 4% em relação ao controle (Figura 19b).

Figura 19. Comportamento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), glutathione peroxidase (GPx) (b) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupo controle), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em cérebro de ratos, suplementados durante 40 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 7-8), $p < 0,05$.

Não existem estudos que avaliam o efeito dos CLAs nas enzimas antioxidantes no cérebro, mas alguns trabalhos mostram que os CLAs são minimamente incorporados neste tecido. Park, (2009), sugere que os CLAs possam estar envolvidos na redução da produção de eicosanóides, interferindo nas vias de sinalização celular, inibindo a síntese de DNA, aumentando a apoptose, ou inibindo a angiogênese. No estudo realizado por Barbosa et al. (2009) observou-se que a incorporação de CLAs no tecido cerebral é mínima, mas é suficiente para interferir em rotas metabólicas. Kim et al. (2008) estudaram os efeitos da suplementação de CLAs em animais Sprague Dawley e verificaram que o aumento do isômero *cis9*, *trans11*, no cérebro pode exercer um papel importante na redução do nível de apoptose. Com relação às enzimas antioxidantes, este estudo mostra que os CLAs não alteram a atividade da SOD e GPx no cérebro de ratos. Apesar das funções biológicas e os mecanismos específicos de ação dos CLAs ainda não estarem totalmente claros, estudos que avaliam os efeitos no tecido cerebral são necessários.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx no músculo estão apresentadas na figura 20a e figura 20b respectivamente, as atividades dessas enzimas não foram significativamente diferentes para nenhum dos grupos testados.

Figura 20. Comportamento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), glutathiona peroxidase (GPx) (b) – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupo controle), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em músculo gastrocnemius de ratos, suplementados durante 40 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 7-8), $p < 0,05$.

Assim como para o cérebro, o efeito dos CLAs na atividade das enzimas antioxidantes no músculo esquelético é escasso. De acordo com Rahman et al (2009), o estresse oxidativo exerce um papel importante na diminuição da massa magra muscular associado ao envelhecimento, ao estudar a suplementação de fêmeas C57BL/6 com isômeros isolados de CLAs (*cis9*, *trans11*, ou *trans10*, *cis12*) e também com um mix desses isômeros, foi observado um aumento nos níveis de atividade da CAT e GPx no músculo *quadríceps* dos animais suplementados com CLAs quando comparados aos suplementados com a dieta controle (óleo de milho), e comparando o efeito entre os isômeros isolados a suplementação com o *trans10*, *cis12* apresentou maior atividade dessas enzimas do que o *cis9*, *trans11*. Os resultados deste estudo contrariam os achados de Rahman et al (2009), pois não houve quaisquer alteração na atividade das enzimas SOD e GPx no músculo dos animais estudados. Entretanto, esses autores avaliaram o músculo *quadríceps*, enquanto neste estudo o músculo avaliado foi o *gastrocnêmio*. Isto sugere que o efeito do CLA é variável dependendo do compartimento muscular estudado e, portanto, estudos adicionais são necessários para que possamos concluir sobre os efeitos dos CLAs como antioxidantes neste tecido.

A análise de correlação foi feita entre as análises de TBARS e enzimas antioxidantes. A correlação linear de Pearson (r) para as análises no tecido

hepático foi moderada ($r=0,5164$ e $p=0,001$) entre TBARS e SOD e fraca ($r=0,4956$ e $p=0,001$) entre CAT e SOD, não houve correlação entre os outros parâmetros analisados para este tecido. Já no tecido cerebral houve correlação fraca ($r=0,4928$ e $p=0,001$) apenas entre GPx e SOD. E para o tecido muscular a correlação entre TBARS e SOD foi negativa e fraca ($r=-0,2910$ e $p=0,050$) e a correlação entre SOD e GPx foi fraca ($r=0,3471$ e $p=0,018$). Todos os resultados obtidos com a análise de correlação de Pearson (r) estão apresentados no anexo 6. Correlações significativamente moderada e fracas foram encontradas neste estudo, não houve ainda correlação significativa entre as outras variáveis analisadas.

5.3.2 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO

No presente estudo a influência da suplementação com CLAs na composição de ácidos graxos em quatro importantes tecidos (Fígado, Cérebro, Músculo e Tecido adiposo) foi avaliada e comparada com um grupo controle suplementado com 1% de água e três grupos experimentais suplementados com óleo de soja.

Os resultados para a determinação do perfil de ácidos graxos nos tecidos hepático, cerebral, muscular e adiposo, estão apresentados nas tabelas 9 - 12. Os isômeros *cis9*, *trans11* e *trans10*, *cis12*, foram incorporados no fígado, músculo e tecido adiposo (tabelas 9, 11 e 12), dos animais que foram suplementados com CLAs. No cérebro observou-se a incorporação apenas do isômero *cis9*, *trans11* (tabela10).

A análise de composição de ácidos graxos, mostrou que o aumento na proporção de C18:2, nos grupos suplementados com óleo de soja (OS), não diferiu do grupo controle nos tecidos hepático, cerebral e muscular. No tecido adiposo a proporção de C18:2 para os grupos tratados com OS não diferiu estatisticamente do grupo controle, entretanto percebe-se um aumento na proporção deste ácido graxo no grupo suplementado com OS 4%. O esperado era um aumento na proporção de C18:2, nos grupos alimentados com OS correspondente a porcentagem suplementada, assim como o observado nos grupos experimentais suplementados com CLAs.

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos no tecido hepático, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.

Ácidos Graxos	Controle	OS 1%	OS 2%	OS 4%	FFA- CLA 1%	FFA-CLA 2%	FFA- CLA 4%
C 13:0	4,5 ± 0,9 ^a	5,3 ± 1,1 ^a	2,1 ± 0,3 ^b	2,2 ± 0,3 ^b	3,6 ± 0,5 ^{ab}	4,0 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,6 ^a
C 16:0	17,8 ± 0,7 ^a	17,2 ± 0,9 ^a	15,7 ± 0,3 ^b	15,3 ± 0,5 ^b	17,7 ± 0,8 ^a	16,8 ± 0,4 ^{ab}	15,9 ± 0,7 ^a
C 18:0	16,1 ± 0,8 ^a	17,2 ± 0,8 ^a	18,3 ± 1,3 ^a	18,5 ± 0,6 ^a	18,2 ± 1,1 ^a	19,0 ± 0,9 ^{ab}	20,8 ± 1,6 ^b
C 18:1t	6,4 ± 0,8 ^a	7,0 ± 2,1 ^a	6,0 ± 0,7 ^a	6,7 ± 0,6 ^a	5,7 ± 1,1 ^a	5,7 ± 1,4 ^a	4,1 ± 2,9 ^a
C 18:1c	2,5 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	1,4 ± 1,0 ^{ab}	1,7 ± 0,1 ^{ab}	1,1 ± 0,8 ^b
C 18:2c	24,3 ± 1,2 ^{ab}	23,1 ± 1,7 ^{ab}	25,1 ± 2,1 ^a	25,4 ± 1,6 ^a	23,9 ± 1,3 ^{ab}	22,1 ± 1,0 ^{ab}	21,4 ± 1,3 ^b
CLA 9c11t					1,1 ± 0,3 ^a	1,7 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,8 ^a
CLA 10t12c					0,7 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,3 ^a
C 20:4 n6	24,7 ± 1,1 ^a	23,8 ± 1,8 ^a	25,9 ± 1,3 ^a	25,4 ± 0,9 ^a	23,9 ± 1,8 ^a	23,6 ± 2,0 ^a	23,3 ± 2,6 ^a
C 22:6 n3	3,5 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,4 ^a	4,9 ± 0,4 ^b	4,5 ± 0,4 ^{ab}	3,9 ± 0,4 ^a	4,3 ± 0,4 ^{ab}	4,4 ± 0,3 ^{ab}
Saturados	33,9 ± 0,8 ^a	34,4 ± 0,9 ^a	34,0 ± 0,8 ^a	33,9 ± 0,5 ^a	35,9 ± 1,0 ^{ab}	35,8 ± 0,6 ^b	36,7 ± 1,1 ^b
Monoinsaturados	2,5 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	1,4 ± 1,0 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,8 ^a
Poliinsaturados	52,6 ± 0,9 ^a	51,0 ± 1,3 ^a	55,8 ± 1,3 ^b	55,3 ± 1,0 ^b	53,5 ± 0,8 ^{ab}	52,8 ± 0,8 ^a	53,5 ± 1,1 ^{ab}
Trans	6,4 ± 0,8 ^a	7,0 ± 2,1 ^a	6,0 ± 0,7 ^a	6,7 ± 0,6 ^a	5,7 ± 1,1 ^a	5,7 ± 1,4 ^a	4,1 ± 2,9 ^a

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.
Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).

Tabela 10. Perfil de ácidos graxos no tecido cerebral, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.

Ácidos Graxos	Controle	OS 1%	OS 2%	OS 4%	FFA- CLA 1%	FFA-CLA 2%	FFA- CLA 4%
C 13:0	6,8 ± 0,8 ^a	7,6 ± 2,9 ^a	9,0 ± 2,9 ^a	9,5 ± 0,5 ^a	9,2 ± 4,6 ^a	12,0 ± 6,0 ^a	10,1 ± 1,3 ^a
C 16:0	20,3 ± 0,9 ^a	21,8 ± 2,0 ^a	19,4 ± 1,2 ^a	19,0 ± 0,5 ^a	19,4 ± 2,1 ^a	20,0 ± 1,3 ^a	18,8 ± 0,7 ^a
C 18:0	19,8 ± 0,5 ^a	20,5 ± 2,6 ^a	19,6 ± 0,6 ^a	19,1 ± 0,1 ^a	19,0 ± 1,2 ^a	19,4 ± 1,3 ^a	18,7 ± 0,4 ^a
C 18:1t	0,9 ± 1,4 ^a	0,8 ± 0,5 ^a	0,7 ± 1,1 ^a	1,2 ± 1,0 ^a	1,7 ± 1,2 ^a	1,5 ± 1,1 ^a	1,6 ± 1,0 ^a
C 18:2c	23,4 ± 0,4 ^a	21,8 ± 0,4 ^{ab}	23,0 ± 0,1 ^a	22,3 ± 0,2 ^{ab}	22,6 ± 1,4 ^a	19,9 ± 2,5 ^b	22,4 ± 0,6 ^{ab}
CLA 9c11t					0,6 ± 0,9 ^a	1,1 ± 0,5 ^{ab}	1,4 ± 0,2 ^b
C 20:4 n6	10,8 ± 0,8 ^a	10,3 ± 1,5 ^a	10,5 ± 0,8 ^a	10,6 ± 0,4 ^a	10,1 ± 1,4 ^a	9,4 ± 0,6 ^a	9,3 ± 0,5 ^a
C 24:1 n9	4,6 ± 0,6 ^a	4,2 ± 1,1 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,6 ± 0,5 ^a	4,7 ± 0,6 ^a	4,4 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,4 ^a
C 22:6 n3	13,4 ± 0,6 ^a	12,9 ± 1,1 ^a	13,4 ± 0,5 ^a	13,6 ± 0,6 ^a	12,7 ± 1,6 ^a	12,3 ± 1,0 ^a	13,0 ± 0,3 ^a
Saturados	40,1 ± 0,7 ^a	42,3 ± 2,3 ^a	39,0 ± 0,9 ^{ab}	38,1 ± 0,3 ^b	38,4 ± 1,7 ^{ab}	39,3 ± 1,3 ^{ab}	37,5 ± 0,5 ^b
Monoinsaturados	4,6 ± 0,6 ^a	4,2 ± 1,1 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,6 ± 0,5 ^a	4,7 ± 0,6 ^a	4,4 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,4 ^a
Poliinsaturados	52,2 ± 0,6 ^a	49,3 ± 1,0 ^b	51,3 ± 0,4 ^{ab}	51,1 ± 0,4 ^{ab}	50,7 ± 1,2 ^{ab}	47,1 ± 0,9 ^b	50,8 ± 0,4 ^{ab}
Trans	0,9 ± 1,4 ^a	0,8 ± 0,5 ^a	0,7 ± 1,1 ^a	1,2 ± 1,0 ^a	1,7 ± 1,2 ^a	1,5 ± 1,1 ^a	1,6 ± 1,0 ^a

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.
Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).

Tabela 11. Perfil de ácidos graxos no tecido muscular, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.

Ácidos Graxos	Controle	OS 1%	OS 2%	OS 4%	FFA- CLA 1%	FFA-CLA 2%	FFA- CLA 4%
C 13:0	4,2 ± 0,5 ^a	3,9 ± 0,4 ^a	4,2 ± 0,4 ^a	2,9 ± 1,7 ^a	3,4 ± 0,4 ^a	4,2 ± 0,8 ^a	3,6 ± 0,2 ^a
C 16:0	23,2 ± 1,1 ^{ab}	20,6 ± 0,5 ^a	21,7 ± 1,4 ^a	23,3 ± 0,4 ^{ab}	21,6 ± 2,4 ^a	25,5 ± 1,7 ^b	21,4 ± 0,5 ^a
C 18:0	15,1 ± 3,5 ^a	15,8 ± 2,9 ^a	15,4 ± 1,1 ^a	15,4 ± 1,5 ^a	15,2 ± 2,7 ^a	15,4 ± 1,2 ^a	14,5 ± 0,7 ^a
C 18:1t	8,9 ± 0,8 ^{ab}	8,8 ± 1,9 ^{ab}	10,5 ± 1,7 ^a	7,6 ± 1,0 ^{ab}	9,9 ± 2,9 ^a	6,2 ± 0,3 ^b	7,6 ± 1,2 ^{ab}
C 18:2c	26,2 ± 4,4 ^a	26,9 ± 4,2 ^a	27,1 ± 1,8 ^a	27,4 ± 3,2 ^a	27,1 ± 2,1 ^a	24,0 ± 1,2 ^a	25,0 ± 1,1 ^a
CLA 9c11t					0,8 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,4 ^a
CLA 10t12c					0,7 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,1 ^a
C 20:4 n6	16,3 ± 3,5 ^a	15,7 ± 3,6 ^a	15,0 ± 1,4 ^a	16,5 ± 2,7 ^a	16,2 ± 3,3 ^a	17,2 ± 1,7 ^a	16,8 ± 1,0 ^a
C 22:6 n3	6,3 ± 1,9 ^a	8,2 ± 1,6 ^a	6,1 ± 0,6 ^a	6,8 ± 0,7 ^a	5,0 ± 3,5 ^a	4,9 ± 1,0 ^a	6,7 ± 0,8 ^a
Saturados	38,2 ± 2,3 ^a	36,5 ± 1,7 ^a	37,1 ± 1,2 ^a	38,7 ± 0,9 ^a	36,9 ± 2,6 ^a	40,8 ± 1,4 ^a	35,9 ± 0,6 ^a
Monoinsaturados	8,9 ± 0,8 ^a	8,8 ± 1,9 ^a	10,5 ± 1,7 ^a	7,6 ± 1,0 ^{ab}	9,9 ± 2,9 ^a	6,2 ± 0,3 ^b	7,6 ± 1,2 ^{ab}
Poliinsaturados	48,8 ± 3,3 ^a	50,9 ± 3,2 ^a	48,2 ± 1,3 ^a	50,8 ± 2,2 ^a	49,8 ± 1,8 ^a	48,7 ± 0,8 ^a	52,9 ± 0,7 ^a

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.
Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).

Tabela 12. Perfil de ácidos graxos no tecido adiposo, dos grupos experimentais. Resultados expressos em porcentagem do total de ácidos graxos.

Ácidos Graxos	Controle	OS 1%	OS 2%	OS 4%	FFA- CLA 1%	FFA-CLA 2%	FFA- CLA 4%
C 4:0	1,3 ± 1,4 ^a	1,4 ± 2,4 ^a	0,7 ± 0,7 ^a	0,9 ± 0,2 ^a			
C 8:0	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^a
C 11:0	0,7 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,3 ^a	0,6 ± 0,8 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,3 ^a
C 12:0	2,8 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,3 ^b	3,3 ± 0,7 ^a	3,5 ± 0,9 ^a	2,6 ± 0,1 ^a
C 13:0	1,6 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,2 ^a
C 14:1	0,5 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,9 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
C 15:1	16,0 ± 0,7 ^a	17,8 ± 1,0 ^a	17,6 ± 0,1 ^a	18,7 ± 1,3 ^b	18,7 ± 0,9 ^b	17,3 ± 0,6 ^a	16,6 ± 0,5 ^a
C 16:0	0,7 ± 0,0 ^a	0,8 ± 1,4 ^a	0,9 ± 0,2 ^a	1,0 ± 1,1 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,4 ^a
C 16:1	3,0 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,4 ^a
C 18:1c	25,1 ± 0,3 ^a	24,8 ± 0,9 ^a	24,9 ± 0,6 ^a	22,7 ± 0,6 ^b	23,7 ± 0,1 ^b	23,2 ± 0,2 ^b	23,3 ± 0,1 ^b
C 18:2c	44,5 ± 1,5 ^a	43,9 ± 1,8 ^a	44,5 ± 0,7 ^a	46,1 ± 0,3 ^a	39,8 ± 0,5 ^b	37,8 ± 0,2 ^b	35,6 ± 0,4 ^b
C 18:3 n3	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,7 ^a	0,8 ± 0,5 ^a	0,4 ± 1,4 ^a
CLA 9c11t					2,4 ± 0,3 ^a	5,1 ± 0,5 ^b	7,6 ± 1,0 ^c
CLA 10t12c					1,4 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,3 ^b	4,9 ± 0,7 ^b
C 21:0	1,0 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^b	1,5 ± 0,1 ^c	0,8 ± 0,3 ^{ab}	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,3 ± 0,2 ^b	0,5 ± 0,1 ^b
C 20:4 n6	1,2 ± 0,1 ^{ab}	1,2 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,7 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^b	2,5 ± 0,1 ^c	2,3 ± 0,0 ^c	2,1 ± 0,1 ^c
C 24:1 n9	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,2 ^c	-	-	-
C 22:6 n3	0,3 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,1 ^{ab}	0,1 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
Saturados	6,6 ± 0,3 ^a	6,0 ± 0,6 ^{ab}	6,8 ± 0,2 ^a	5,1 ± 0,6 ^b	6,4 ± 0,3 ^a	5,8 ± 0,3 ^{ab}	5,3 ± 0,2 ^b
Monoinsaturados	45,0 ± 0,4 ^a	46,4 ± 0,6 ^a	46,4 ± 0,3 ^a	46,4 ± 0,8 ^a	45,9 ± 0,3 ^a	43,9 ± 0,2 ^b	43,5 ± 0,3 ^b
Poliinsaturados	47,1 ± 0,3 ^a	46,4 ± 0,4 ^a	46,0 ± 0,3 ^a	48,3 ± 0,2 ^b	43,6 ± 0,3 ^c	41,7 ± 0,3 ^c	38,5 ± 0,5 ^c

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, p<0,05.

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=4).

Os resultados mostram que após a suplementação de FFA-CLA a proporção de C18:2 não diferiu do grupo controle nos tecidos hepático e muscular para todos os grupo experimentais. Comportamento diferente do observado por Kelley et al. (2006). Neste estudo para o tecido cerebral, somente no grupo que recebeu 2% de FFA-CLA, a proporção de C18:2 foi significativamente menor que o grupo controle. No tecido adiposo com a suplementação com CLAs, houve uma redução significativa na proporção de C18:1 e C18:2 para os três grupos tratados (FFA-CLA 1%, 2% e 4%), em relação ao grupo controle, levando a uma redução total de AGPI. Ainda no tecido adiposo houve um aumento na proporção do ácido araquidônico C20:4.

O metabolismo dos isômeros do CLA é variável, tem efeitos únicos sobre os lipídeos dos diferentes tecidos e também é sensível às condições experimentais, principalmente quanto à forma de fornecimento dos CLAs (BANNI, 2002, SUBBAIAH et al. 2010). Kelley et al., (2006) avaliaram a influência dos isômeros de CLAs individualmente sobre a composição de ácidos graxos e o metabolismo de lipídeos. Camundongos (fêmeas com oito semanas), foram alimentadas com uma dieta controle, ou que continha 0,5% de um dos dois isômeros de CLAs por oito semanas. Observou-se que o isômero *cis9*, *trans11* reduziu a proporção de C18:1 no fígado, tecido adiposo e baço e aumentou a proporção de C18:2 no fígado, tecido adiposo, baço e coração. O isômero *trans10*, *cis12* reduziu a proporção de C18:2, C20:4 e C22:3 no fígado.

Yuan et al., (2009), avaliaram o efeito da suplementação de 1% de um mix de CLAs em camundongos por 6 semanas, e observaram a incorporação dos dois principais isômeros de CLAs (*cis9*, *trans11* e *trans10*, *cis12*) nos cinco tecidos estudados : Fígado, Coração, Rim, Baço e Tecido adiposo. A incorporação de CLAs no estudo citado, para o fígado foi de 1,76% e para o tecido adiposo 3,2%. Valores semelhantes foram encontrados neste estudo, os resultados mostraram que os níveis de CLAs encontrados no fígado dos animais suplementados com FFA-CLA, foram de 1,8% 2,7% e 4,3% para FFA-CLA 1%, 2% e 4% respectivamente e para o tecido adiposo destacam-se os níveis elevados de CLAs encontrados nos grupos experimentais que foram de 3,8%, 8,4% e 12,5%.

Em outro estudo os efeitos dos isômeros de CLA, foram avaliados em camundongos BALB/c. Os animais foram alimentados com dietas suplementadas com 1% do isômero *cis9*, *trans11*, 1% de *trans10*, *cis12*, ou uma mistura de CLAs

contendo ambos os isômeros em quantidades iguais durante 5 semanas. Um grupo controle foi alimentado com uma dieta enriquecida com óleo de girassol para equilibrar a energia. No grupo alimentado com o mix de CLAs houve uma redução significativa de tecido adiposo acompanhado por deposição de gordura nos fígados, quando comparado aos grupos controle e CLA *trans*10, *cis*12. Essas alterações na distribuição da gordura corporal implicaram em uma mudança tênue do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo e fígado. O aumento do fígado foi causado principalmente pelo acúmulo de C18 que representaram 67% do total de ésteres metílicos de ácidos graxos. Já a redução do tecido adiposo deveu-se principalmente a diminuição no percental de ácidos graxos monoinsaturados 16:0 / 16:1 e 18:0 / 18:1 os índices de dessaturação de tecido adiposo branco aumentou significativamente, sugerindo uma inibição da estearoil-CoA dessaturase no grupo que recebeu o CLA-mix (JAUDSZUS et al., 2010).

Estudos que avaliem a incorporação de CLAs no tecido cerebral, assim como no músculo esquelético são escassos, e é crescente o interesse em observar os efeitos da suplementação de CLAs nesses tecidos. De acordo com Fa et al. (2005) a incorporação de CLAs no cérebro foi detectada apenas em poucos casos e em concentrações muito baixas, os possíveis motivos são: a oferta relativamente baixa de isômeros de CLAs, sendo portanto o aporte insuficiente para serem incorporados; a incorporação preferencial de outros ácidos graxos pelo tecido cerebral; e a contra seleção de ácidos graxos *trans* com duplas ligações, como os CLAs.

Neste estudo observou-se a incorporação apenas do isômero *cis*9, *trans*11, no tecido cerebral, nas proporções de 0,6%, 1,1% e 1,4% para os grupos suplementados com FFA-CLA 1%, 2% e 4% respectivamente. Um aspecto que se deve destacar é que o tecido cerebral apresenta a barreira hemato-encefálica, que é seletiva, conforme destacado por Valenzuela (2008), quando discute a menor incorporação de ácidos graxos saturados e *trans* neste tecido. Portanto era esperado que no tecido cerebral houvesse uma menor incorporação dos isômeros de CLAs.

Lin et al., (2010), avaliaram os efeitos da suplementação na dieta de 1% CLAs (mix com *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12), no tecido cerebral de suínos jovens, e observaram que, a dieta rica em CLA tendeu a diminuir a concentração de ácido araquidônico, mas não teve efeitos no C18:2, C18:3n-6, C20:2n-6,

C20:3n-6 ou nas concentrações de DHA. Foram incorporados os dois isômeros de CLAs no tecido cerebral, as concentrações foram de 0,073 e 0,034 $\mu\text{mol/g}$ de tecido para os isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12 respectivamente.

Um dos possíveis mecanismo de ação dos CLAs, é a a ativação de fatores de transcrição, tais como PPARs, (BELURY, 2002, O'SHEA, et al., 2011). Os PPARs estão presentes em diferentes áreas do cérebro. Fa et al., (2005) sugerem a realização de estudos com períodos de suplementação maiores, a fim de estabelecer se a incorporação de CLAs em células do cérebro são capazes de modificar a incorporação do ácido araquidônico. E interferir na formação de eicosanóides, gerando um grande impacto sobre o cérebro, podendo contribuir para a patogênese de doenças neurológicas, como alzheimer e síndrome de parkinson.

No presente estudo, a suplementação de FFA-CLA, proporcionou a incorporação dos dois isômeros de CLAs (*cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12), no tecido muscular (*gastrocnemius*), nas proporções de 1,5%, 2,6% e 4,3% para os três grupos experimentais estudados, a incorporação foi dose dependente, e não foi observado mudanças nas proporções de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, diferente dos estudos relatados anteriormente.

Zaballa et al., (2006), avaliaram os efeitos da suplementação do isômero *trans*10, *cis*12 de CLAs no músculo de animais (Syrian Golden hamsters), o período de suplementação durou seis semanas. Foi observada uma modificação no perfil de ácidos graxos, no grupo suplementados com 1% de *trans*10, *cis*12, houve aumento na proporção de saturados (C16:0 e C18:0), diminuição de monoinsaturados (C16:1, C17:1) e decréscimo de polinsaturados (C18:2, C18:3n3 e C20:4n6). A incorporação do isômero *trans*10, *cis*12 foi dose dependente.

É preciso ressaltar que no estudo realizado por Zaballa et al., (2006) os animais foram suplementados com 1% e 0,5% do isômero *trans*10, *cis*12 de CLA, e foi observada a incorporação de diferentes isômeros de CLAs nas proporções de 1,16% de *trans*10, *cis*12, 0,14% de *cis*9, *trans*11 e 0,06% de *cis*9, *cis*11 quando suplementados com 1% e quando suplementados com 0,5% do isômero *trans*10, *cis*12 de CLA, foi observada a incorporação de 0,54% de *trans*10, *cis*12, 0,16% de *cis*9, *trans*11 e 0,05% de *cis*9, *cis*11.

No estudo realizado por Czauderna et al. (2007), os animais alimentados com dietas contendo mistura de 2% de CLAs tiveram o consumo de ração e o

ganho de peso reduzido, enquanto que a suplementação do isômero *trans*10, *cis*12 e Se resultou em maior ganho peso corporal. A suplementação com CLAs geralmente aumenta significativamente a concentração dos isômeros de CLA no coração e no músculo, entretanto no estudo citado apenas a suplementação com o *cis*9, *trans*11 mostrou incorporação nesses tecidos. A suplementação com os isômeros isolados de CLA, reduziu a concentração de AGPI e conteúdo total de ácidos graxos no coração e músculo comparados com ratos controle. Além disso, a adição de isômeros de CLA interferiu na conversão de ácidos linoleico e linolênico devido à concorrência dos isômeros de CLA para as mesmas enzimas ($\Delta 6$, $\Delta 5$, $\Delta 4$ - dessaturases e elongases).

Este comportamento observado por diferentes estudos (ZABALLA et al., 2006, KELLEY et al., 2006, YUAN et al., 2009), caracterizado por administrar uma determinada quantidade de isômeros de CLAs, resultando na incorporação de quantidades superiores à administrada também foi detectada neste estudo. É possível que os isômeros de CLAs sejam sintetizados no organismo animal.

Sabemos que os CLAs são produzidos no rúmen, devido à biohidrogenação pelas bactérias como *Butyrivibrio fibriosolvens* (NAGAO e YANAGITA, 2008). E também pela conversão endógena via delta-9 dessaturase de ácido vacênico na glândula mamária (PARK e PARIZA, 2007). No entanto, estudos em animais revelaram que ratos são capazes de produzir CLAs. E ainda, há evidências da síntese de CLAs por espécies da microbiota intestinal humana, principalmente as bifidobactérias (O'SHEA et al., 2011).

5.3.3 MORFOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO

A figura 21 apresenta o volume da massa adiposa do tecido epididimal, dos grupos experimentais. Pode-se observar que não houve diferença significativa entre o volume das células adiposas, para os grupos suplementados, quando comparados com o grupo controle.

Figura 21. Valores referentes ao volume do tecido adiposo epididimal dos grupos experimentais. Grupo controle (Água), óleo de soja (OS) e ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), suplementados durante 40 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n = 6), $p < 0,05$.

Atualmente sabe-se que a inflamação observada com a obesidade está associada com o desenvolvimento de inúmeras complicações. Assim há o interesse na elucidação dos mecanismos que regulam a produção de moléculas inflamatórias para melhorar a prevenção e o tratamento da obesidade e suas morbidades. O tecido adiposo não é mais considerado um reservatório passivo para o armazenamento de lipídios, mas sim um órgão importante que influencia o metabolismo energético, a sensibilidade à insulina e da inflamação através da secreção de proteínas, como as adipocinas. O desbalanço das adipocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e adiponectina, contribui para a inflamação que é uma característica da obesidade. Evidências sugerem que os ácidos graxos representam uma classe de moléculas que podem modular a produção de adipocinas, influenciando o estado inflamatório. Embora os mecanismos moleculares pelos quais os lipídeos regulam a produção de adipocinas permanecem obscuros, descobertas recentes indicam que a interação dieta-gene pode ter um papel importante na regulação da transcrição e secreção de adipocinas. E ainda polimorfismos nos genes que codificam TNF- α , IL-6 e adiponectina podem modificar os níveis circulantes destas adipocinas. Esta variação genética também pode alterar a influência de ácidos graxos na dieta sobre a produção de adipocinas (STRYJECKI e MUTCH, 2011).

Ippagunta et al. (2011), avaliaram o efeito anti-obesidade dos CLAs em camundongos alimentados com uma dieta a base de óleo de coco e compararam

com uma dieta a base de óleo de soja e ainda com uma terceira dieta livre de ácidos graxos. O objetivo foi determinar se o CLA altera lipólise em animais alimentados com bases diferentes de óleos. Os animais receberam a dieta por seis semanas, em seguida foram suplementados por 10, 12 dias de CLA ou nenhuma suplementação de CLA. Os camundongos alimentados com CLA tiveram menos gordura corporal quando comparados com os animais que não receberam CLA. Houve também uma interação CLA/óleo sobre a lipólise, os grupos que receberam óleo de coco e CLA, e também o grupo que recebeu a dieta livre de gorduras e foi suplementado com CLA, tiveram as taxas de lipólise aumentadas, mas os animais alimentados com óleo de soja e CLA não apresentaram alteração na lipólise. Em suma, o óleo de coco aumenta o efeito anti-obesidade do CLA e este efeito, pelo menos em parte, parece ser devido à lipólise. O efeito do CLA sobre a expressão e ativação de lipases e outras proteínas relacionadas a lipólise pode ser dependente do tempo.

Estudos demonstraram que o ácido linoleico conjugado (CLA) atua sobre acúmulo de gordura corporal em uma variedade de modelos animais. Lopes et al., (2008), investigaram o efeito dos CLAs no número e tamanho dos adipócitos do tecido adiposo inguinal e retroperitoneal em ratos Wistar. A dieta foi modificada, acrescentando 5,1% de óleo de palma, e os grupos experimentais foram suplementados por oito semanas com isômeros CLA da seguinte forma: 0,6% do *cis9, trans11*, 0,6% de *trans10, cis12*, 1,3% do mix *cs9, trans11* e *trans10, cis12*, e um grupo controle não suplementados para fins comparativos. Os animais alimentados com o *cis9, trans11* resultou em adipócitos maiores quando comparados a outros grupos. Independentemente do tratamento CLA na dieta, o tecido adiposo retroperitoneal apresentou adipócitos maiores e, portanto, um menor número de adipócitos por unidade de área, em comparação com a gordura inguinal.

Botelho et al. (2005), estudaram o efeito dos CLAs sobre a composição corporal, em ratos wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos, suplementados com um mix de CLAs (AdvantEdge®) nas concentrações 1%, 2% e 4% sobre o consumo diário de dieta, e com ácido linoleico na concentração de 2%, constituindo o grupo controle. As suplementações com CLAs nas concentrações de 2% e 4% reduziram a gordura corporal em ratos Wistar saudáveis em crescimento, indicando que a suplementação com 2% é

economicamente mais viável. É importante destacar que a utilização de ratos em crescimento, é sustentada pela hipótese de que o CLA age sobre a lipogênese (BRODIE et al. 1999; BOTELHO et al. 2005).

Vale ressaltar que os modelos experimentais utilizados pelos autores citados acima são caracterizados por acúmulo de gordura visceral e uma leve obesidade, diferentemente dos animais deste estudo, ou ainda os estudos citados tiveram períodos de suplementação mais extensos, o que parece ser necessário visando uma diminuição mais expressiva da gordura corporal, assim como um aumento de massa magra. Na figura 22 estão apresentadas as Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo epididimal. Não foram observadas quaisquer diferenças para os tamanhos e números de células adiposas no tecido adiposo epididimal dos animais que receberam OS e CLA em relação ao controle.

Figura 22. Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo epididimal. (a) Grupo controle: o corte mostra adipocitos morfologicamente preservados. (b) Grupo suplementado com OS 2%: componentes preservados, e em número e tamanho semelhante ao grupo controle. (c) Grupo FFA-CLA 2%: o corte mostra os adipocitos em número e área semelhante aos outros grupos. 100x.

5.3.4 MORFOLOGIA DO MÚSCULO

A figura 23a apresenta a área das fibras do tecido muscular (gastrocnemius), pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para este parâmetro. O resultado para o diâmetro das fibras pode ser observado na figura 23b, não houve diferença significativa entre os grupos estudados, quando comparados com o grupo controle.

Figura 23. Valores referentes a área (a) e ao diâmetro (b) das fibras musculares. Grupos estudados: controle (água), óleo de soja (OS) e Ácido linoleico conjugado (FFA-CLA), em músculo gastrocnemius de ratos, suplementados durante 40 dias. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão ($n = 5$), $p < 0,05$.

A habilidade do ácido linoleico conjugado em alterar a composição corporal, aumentando a massa magra e reduzindo a gordura corporal em diferentes espécies, tais como: camundongos, hamsters, ratos, porcos e humanos tem sido amplamente estudada (PARK et al., 1997, AQUINO JUNIOR et al., 2009, RAHMAN et al. 2009, KENNEDY et al., 2010, LOPES, 2010).

Neste estudo era esperado que houvesse mudanças na área e diâmetro do tecido muscular assim como no volume de células do tecido adiposo epididimal, devido a incorporação do ácido linoleico (fornecido pelo OS) e dos CLAs nesses tecidos. Porém os resultados para esses parâmetros não foram significativamente diferentes. Na figura 24 observa-se as fotomicrografias de cortes histológicos de tecido muscular. Considerando o total de observações nos músculos dos animais

tratados com controle, OS e FFA-CLA, tanto a área obtida e o diâmetro obtido foram semelhantes entre os grupos estudados.

Figura 24. Fotomicrografias de cortes histológicos de músculo (*gastrocnemius*). (a) Grupo controle 20x, (b) Grupo suplementado com OS 2%. 20x. (c) Grupo suplementado com FFA-CLA 2%. 20x. Seções transversais coradas com HE.

Rahman et al. (2009), ao estudar a suplementação de fêmeas C57BL/6 com 0,5% de isômeros isolados de CLAs (*cis9*, *trans11*, ou *trans10*, *cis12*) e também com 0,5% de um mix desses isômeros, por 6 meses, mostrou aumento da massa muscular significativamente maior nos grupos que receberam o *trans10*, *cis12* CLA e grupo CLA-mix, quando comparados aos suplementados com 0,5% de *cis9*, *trans11* e com a dieta controle (óleo de milho).

Uma pesquisa realizada por Aquino Junior et al. (2009), avaliou os efeitos da suplementação com 2% de CLA, associada ao treinamento moderado em natação, por oito semanas em animais Wistar. Os resultados demonstraram que a suplementação com CLA, quando associada à prática de exercício físico, parece ter influência no balanço energético, uma vez que reduziu a massa corporal dos animais sem alterar a ingestão alimentar. Houve também contribuição para

melhora nas variáveis do perfil lipídico. Esses animais apresentaram maior adiposidade intra abdominal, aumento na glicemia em jejum e aumento no peso do fígado.

Os trabalhos existentes na literatura apresentam resultados muito discrepantes. Alguns trabalhos afirmam que o CLA auxilia na perda de massa corporal diminuindo o percentual de tecido adiposo. Outros descrevem que o CLA poderia aumentar a massa magra. Já outros concluem que a suplementação de CLA não resulta em mudanças na composição corporal dentre outros parâmetros. Os efeitos da suplementação de CLA, podem ser específicos para alguns tipos de populações, como no caso de indivíduos obesos. O efeito de aumento da massa muscular esquelética em função da suplementação com CLA é controverso e recentemente vem sendo muito discutido na literatura. Se este efeito realmente ocorre, os mecanismos são desconhecidos em termos de sinalização celular. Trabalhos com períodos de suplementação mais extensos são necessários visando uma diminuição mais expressiva da gordura corporal, assim como um aumento de massa magra.

5.4 ANÁLISE BIOLÓGICA (IN VIVO)- EXPERIMENTO II

Com o intuito de avaliar o efeito dos isômeros conjugados do ácido linoleico (9*cis*, 11*trans* e 10*trans*, 12 *cis*) em animais expostos a uma situação de estresse oxidativo e estado redox alterado, foi realizado um novo experimento biológico induzindo hepatopatia aguda nos animais pela administração de CCl₄.

A quantidade de suplemento utilizada neste segundo ensaio biológico foi escolhida com base na literatura. De acordo com Botelho et al. 2008 e Santos Zago et al. (2008), a suplementação com 2% de CLAs é mais viável economicamente.

Os resultados de consumo, ingestão alimentar, ganho de peso e CEA estão apresentados na Tabela 13. A suplementação com FFA-CLA, afetou a ingestão de ração e o ganho de peso, comportamento também observado no primeiro experimento, no entanto a diminuição nestes parâmetros analisados

não foi significativa quando comparados com os grupos controles. Nenhuma diferença foi observada ($p < 0,05$) no CEA.

Tabela 13. Consumo da amostra, ingestão alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar (CEA).

Grupos	Consumo de amostra (g/d)	Ingestão alimentar (g/ d)	Ganho de peso (g)	CEA
Controle -	$0,5 \pm 0,00$	$26,40 \pm 3,41^a$	$155,91 \pm 31,81^a$	0,20
Controle +	$0,5 \pm 0,00$	$25,88 \pm 3,20^a$	$155,59 \pm 17,54^a$	0,20
FFA-CLA 2%	$0,5 \pm 0,00$	$23,29 \pm 3,73^a$	$127,21 \pm 28,08^a$	0,18

* Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n=6), ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

As avaliações dos teores de colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos estão ilustrados na Figura 25, os dados estão apresentados como média e desvio-padrão, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Pôde-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos quanto aos níveis de colesterol total e HDL-colesterol Figuras 25a e 25b. Já nas análises de triglicérides, observa-se aumento nos níveis para o grupo suplementado com FFA-CLA2%, esses resultados para triglicerídeos são semelhantes aos encontrados por Diniz et al. (2008). Os resultados neste segundo experimento apresentam o mesmo comportamento observado no primeiro experimento, para os níveis de colesterol onde não houve diferença estatística entre os grupos, e ainda também foi observado o aumento de triglicérides no grupo suplementado com FFA-CLA2%.

Considerando que a administração de CCl_4 provoca injúria hepática aguda, é esperado que haja necrose hepatocelular, com elevação dos marcadores enzimáticos séricos e/ou plasmáticos, os quais são liberados do fígado para o sangue. Os níveis elevados de ALT, AST, alcalina fosfatase e bilirrubina no sangue são indicadores convencionais de injúria hepática (ANDRADE – WARTHA, 2007).

Os resultados obtidos pelo nosso estudo quanto aos níveis séricos de AST e ALT estão representados nas Figuras 26a e 26b, respectivamente. Os animais foram suplementados por 21 dias com água constituindo os grupos controle – e +, e o terceiro grupo foi suplementados com FFA-CLA 2%. Após este intervalo de tempo, foram injetados 3mL de CCl_4 (diluição 1:1 em azeite de oliva), via subcutânea nos grupos controle + e FFA-CLA2%, conforme o protocolo realizado

por Andrade-Wartha (2007). Porém observou-se que não houve alteração nos níveis de AST e ALT, nos três grupos experimentais.

Figura 25. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, colesterol total (a), HDL-colesterol (b) e triglicérides (c) em ratos com dano hepático induzido por CCl₄. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n=6), ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Figura 26. Efeito da suplementação de CLAs, sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos, alanina aminotransferase (a), aspartato aminotransferase (b). Em ratos com dano hepático induzido por CCl₄. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n=6), ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

O CCl_4 é metabolizado pelo sistema monooxigenase mitocondrial (P450 2E1). No decorrer do processo, o radical $\text{CCl}_3^\bullet$ é gerado e, rapidamente, se transforma em Cl_3COO^- (peróxido triclorometil). Os radicais originados provocam a peroxidação nos ácidos graxos dos fosfolípidios de membrana, resultando em radicais peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos e outros produtos, atuando como agentes oxidantes ativos. Portanto, a peroxidação lipídica exerce um papel fundamental na hepatopatia causada pelo CCl_4 (ANDRADE-WARTHA, 2007, FANG e LIN, 2008, PENG, et al., 2010).

Os resultados da determinação da peroxidação lipídica, realizada através da medida de produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), podem ser observados na figura 27. Neste estudo verificamos que no soro não houve diferença estatística ($p > 0,05$), entre os grupos. Já para o tecido hepático, houve uma redução do índice da peroxidação lipídica dos animais tratados com 2% de CLAs, quando comparado ao grupo controle (+), ilustrada na Figura 27b. Indicando que os CLAs possuem capacidade de proteger o tecido hepático dos danos provocados pelo estado redox alterado. O estudo de Yamazaki et al. (2000) observou os efeitos da suplementação com 1% e 2% de CLAs (*cis9*, *trans11*, e *trans10*, *cis12*) incorporados na dieta de ratos Sprague-Dawley, por 21 dias e esses autores demonstraram que o índice de peroxidação lipídica no soro não diferiu entre os grupos estudados, entretanto no tecido hepático os níveis de TBARS foram significativamente maiores nos grupos que foram suplementados com CLAs.

Figura 27. Efeito da suplementação de CLAs, na peroxidação lipídica no soro (a), e tecido hepático (b). Em ratos com dano hepático induzido por CCl_4 . Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão ($n=6$), ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O atividade dos CLAs como antioxidantes, foi estudada nos últimos anos, porém os resultados são contraditórios e não permitem tirar conclusões claras sobre a ação antioxidante deste composto. Foram realizados estudos *in vitro*, analisando a capacidade de sequestrar o radical DPPH• (FAGALI E CATALÁ, 2008). Células de hepatócitos de ratos Sprague-Dawley, neste estudo, a SOD foi diminuída em células expostas aos CLAs (CANTWELL et al., 1999). Animais também foram suplementados com CLAs, resultando em aumento de TBARS Yamazaki et al. (2000), ou nenhuma influência sobre a peroxidação lipídica no fígado (SANTOS ZAGO et al. 2007, ANDREOLI et al. 2009), influência na atividade da catalase (SANTOS-ZAGO et al., 2007) e aumento no conteúdo de glutathionas totais (GSH), (ANDREOLI et al. 2009).

Nos estudos realizados com CLAs os modelos experimentais utilizados pelos autores citados são animais eutróficos suplementados com CLAs ou os modelos são caracterizados por acúmulo de gordura visceral e uma leve obesidade, já que o principal efeito atribuído aos CLAs é sobre a mudança corporal, diferentemente dos animais deste segundo experimento.

Estudos sobre os efeitos dos CLAs em modelos com alteração do estado redox são escasso. Yun et al. (2008) avaliaram os efeitos biológicos de uma mistura comercial de isômeros de CLA (41% CLA *cis*9, *trans*11 e 44% CLA *trans*10, *cis*12) em uma dieta sob um modelo de fibrose, induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Os animais (Wistar) foram divididos em dois grupos tratados com CCl₄, e receberam ração comercial (grupo controle) e ração modificada com 1% de CLAs. A dieta com CLAs inibiu significativamente o aumento das fibras de colágeno no fígados dos animais, já no grupo controle foi observado aumento no número de fibras de colágeno e fibrose ao redor da veia central. Ainda no grupo controle foi observado um aumento no número de células α -SMA (α -actina de músculo liso) ao redor da veia porta. No entanto, no grupo alimentado com CLAs o número células α -SMA era semelhante ao observado ao redor da veia porta de um fígado normal. Esses resultados indicam efeitos hepatoprotetores dos CLAs em fígados com fibrose provocada por CCl₄.

As atividades dos antioxidantes enzimáticos, avaliados nesse estudo, apresentam-se nas Figuras 28 e 29.

No tecido hepático, houve uma redução significativa das enzimas CAT ($p < 0,05$), do grupo controle induzido CCl₄ (+) em comparação ao controle normal (-), a

suplementação com CLAs, aumentou a atividade da CAT a valores próximos da atividade do grupo controle normal (-). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos relatados na literatura. A administração do CCl_4 promove o desequilíbrio entre a produção de EROS x defesas antioxidantes, por conseguinte originando o estresse oxidativo e modificando o estado redox celular (PENG, et al., 2010). Em contrapartida não foi observado diferença significativa na atividade da SOD entre os grupos estudados.

Figura 28. Comportamento da atividade das enzimas catalase (CAT) (a), superóxido dismutase (SOD) (b), – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupos controles) e Ácido linoleico conjugado (CLA), em fígado de ratos, com dano hepático induzido por CCl_4 . Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão ($n = 6$), $p < 0,05$.

Andreoli et al., (2009), avaliaram o efeito da suplementação de uma dieta rica em gorduras acrescido de 3% CLAs (*cis9*, *trans11*, e *trans10*, *cis12*) durante 30 dias, em um modelo animal saudável (camundongos CF¹). Os resultados mostraram que o grupo alimentado com CLAs apresentou um aumento no conteúdo de glutathionas reduzida (GSH) no tecido hepático. Já a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) e CAT não aumentaram com a suplementação de CLAs.

Nos resultados deste estudo pôde-se observar o aumento na atividade da GSH no fígado para o grupo que foi suplementado com FFA-CLA quando comparado ao grupo controle induzido CCl_4 (+), Figura 29a, e o aumento na atividade da GSH ($p < 0,05$), foi semelhante ao grupo controle normal (-). Percebe-se, ainda, um discreto aumento nas atividades da GR para o grupo tratado com CLAs (figura 29b).

Por um lado, o CCl_4 não interferiu na atividade da GPx em relação ao grupo controle +, já a atividade da GPx no grupo suplementado com CLAs foi menor que os grupos controles, resultados ilustrados na Figura 29c.

Figura 29. Comportamento da atividade da glutathione reduzida (GSH), **(a)**, e das enzimas antioxidantes glutathione redutase (GR), **(b)** e glutathione peroxidase (GPx), **(c)** – U/mg de proteína – frente à administração de Água (grupos controles) e Ácido linoleico conjugado (CLA), em fígado de ratos, com dano hepático induzido por CCl_4 . Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão ($n = 6$), $p < 0,05$.

6. CONCLUSÕES

O ácido linoléico conjugado não demonstrou capacidade antioxidante em diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*. A suplementação com FFA-CLAs leva ao aumento nos níveis de triglicérides, sem no entanto, interferir nos parâmetros de estresse oxidativo, embora tenha ocorrido a incorporação dos isômeros de CLAs em diferentes tecidos, as células adiposas e o tecido muscular não foi influenciado. No entanto foi observado efeito hepatoprotetor à prevenção do dano oxidativo causado por CCl_4 em ratos, dessa forma podemos tecer as seguintes considerações:

- ✓ A metodologia de esterificação com NaOCH_3 /metanol foi a mais adequada para a avaliação dos isômeros conjugados do ácido linoleico na forma de ácidos graxos livres (FFA-CLAs), e as condições escolhidas para a identificação e quantificação dos ácidos graxos nas amostras e nos tecidos foi a programação desenvolvida por Baublits e colaboradores.
- ✓ A amostra de FFA-CLA foi capaz de reagir apenas com o radical DPPH. Não sendo possível detectar a atividade antioxidante *in vitro* dos CLAs, nos outros sistemas estudados.
- ✓ O presente estudo demonstrou que a suplementação com FFA-CLAs leva ao aumento nos níveis de triglicérides, sem no entanto, interferir nos parâmetros de estresse oxidativo, embora haja incorporação dose-dependente nos tecidos hepático, muscular e adiposo. No cérebro observou-se a incorporação apenas do isômero *cis*9, *trans*11.
- ✓ Os efeitos hepatoprotetor, dos CLAs no segundo estudo foram atribuídos a sua prevenção na peroxidação lipídica e ao aumento da atividade da CAT, GSH e GR.

7. REFERÊNCIAS

ALDAI, N.; MURRAY, B. E.; NAJERA, A. I.; TROY, D. J.; OSORO, K. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 7, p. 1073-1083, 2005.

ALEKSUNES, L. M.; SLITT, A. M.; CHERRINGTON, N. J.; THIBODEAU, M. S.; ASSEN, C. D.; MANAUTOU, J. E. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. **Toxicological Sciences**, Cary, v.83, n.1, p.44-52, 2005.

ALI, Y. M.; KADIR, A. A.; AHMAD, Z.; YAAKUB, H.; ZAKARIA, Z. A.; ABDULLAH, M. N. H. Free radical scavenging activity of conjugated linoleic acid as single or mixed isomers. **Pharmaceutical Biology**. p.1–8, 2011.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P., BAHIA, M. V., AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quimica. Nova**. v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5.ed. Champaign: AOCS, 2004. P.1-2. (Official Method Ce 2-66-Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5.ed. Champaign: AOCS, 2004. (Official Method Cd 12b 92 - Oil Stability Index (OSI)).

ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal**. 2007, 130f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

ANDREOLI, M. F.; GONZALEZ, M. A.; MARTINELLI, M. I.; MOCCHIUTTI, N. O.; BERNAL, C. A. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. **Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 445-452, 2009.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-198, 2002.

AQUINO JUNIOR, A. E., DOURADO, G. K. Z. S., DUARTE, F. O., DUARTE, A. C. G. O., SENE-FIORESE, M. Efeito da suplementação com ácido linoleico conjugado e do treinamento em natação sobre a composição corporal e os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar em crescimento. **Revista de Nutrição**. v.22, n.4, p. 493 – 502, 2009.

ARAO, K.; WANG, Y. M. ; INOUE, N.; HIRATA, J.; CHA, J. Y. ; NAGAO, K. ; YANAGITA T. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9*cis*, 11*trans*, 13*cis* conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. **Lipids in Health and Disease**, v.3, p.24-30, 2004.

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

BARBOSA, N. R.; GAMA, M. A. S.; LOPES, F. C. F.; DEFILLIPO, P. P.; MURY, F. B.; TREVISANI, R.; OLIVEIRA, D. E.; GATTAZ, W. F. Activity of phospholipase A₂ (PLA₂) subtypes in rat brain is altered by feeding conjugated linoleic acid (CLA) and linseed oil. **The journal of the Alzheimer's association**. v. 5, Issue 4, Supplement, p. P326, 2009.

BAUBLITS, R. T.; POHLMAN, F. W.; BROWN JR., A. H.; JOHNSON, Z. B.; PROCTOR, A. SAWYER, J. DIAS-MORSE, P. GALLOWAY, D. L. Injection of conjugated linoleic acid into beef strip loins. **Meat Science**, v. 75, p. 84–93, 2007.

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.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acid as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition and Metabolism**, v. 6, p. 36-48, 2009.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**: a manual of biochemical methods. 2.ed. New York, London: Grune & Stratton, 1975. p.89-90.

BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 12, p. 789-810, 2006.

BLOIS, M. S.; Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, p.1199-1200, 1958.

BOCHKOV, V. N., OSKOLKOVA, O. V., BIRUKOV, K. G., LEVONEN, A. L., BINDER, C. J., STOCKL, J. Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.12, n.8, p. 1009-1059, 2010.

BOMFIM M. A. D., OLIVEIRA L. S., FERNANDES M. F. Uso da nutrição para a diferenciação e a valorização da qualidade do leite e da carne: um novo paradigma na nutrição de pequenos ruminantes. **I Congresso Brasileiro de Nutrição Animal, In: Anais do I Congresso Brasileiro de Nutrição Animal**, Fortaleza - Ceará – Brasil, 2008.

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

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 La Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, v. 58, n. 2, p. 156-163, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BREST, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Resolução Nº. 833, de 28 de março de 2007. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária resolve Determinar a apreensão, em todo território nacional, de todos os lotes do produto ácido linoleico conjugado - CLA, por não possuir registro no Ministério da Saúde. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=26272&mode=PRINT_VERSION. Acesso em: 14/03/10.

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

CANTWELL, H.; DEVERY, R.; O'SHEA, M.; STANTON, C. The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. **Lipids**, v. 34, n.8, p. 833-839, 1999.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, v.299, cap.5, p.50 -62, 1999.

CARVALHO, E. B. T.; MELO, I. L. P.; MANCINI-FILHO, J. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated linoleic fatty acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, p.295-307, 2010.

CHEN, J.; CAO, Y.; GAO, H.; YANG, L.; CHEN, Z.Y. Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.150, p.136-142, 2007.

CHRISTIE, W. W.; DOBSON, G.; ADLOF, R. O. A Practical Guide to the Isolation, Analysis and Identification of Conjugated Linoleic Acid. **Lipids**, v. 42, n. 12, p. 1073-1084, 2007.

CHRISTIE, W. W.; SÉBÉDIO, J. L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**, v.12, p.147-152, 2001.

CORDAIN, L.; WATKINS, B. A.; FLORANT, G. L.; KELHER, M.; ROGERS, L.; LI, Y. Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.

56, p.181-191, 2001.

CORSINI, M. S.; JORGE, N.; Estabilidade oxidativa de óleos vegetais utilizados em frituras de mandioca palito congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p.27-32, 2006.

CZAUDEANA, M.; KOWALCZYK, J.; KORNILUK, K. Effect of dietary conjugated linoleic acid and selenized yeast on the concentration of fatty acids and minerals in rats. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 135-150, 2007.

DAY. B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical pharmacology**. v.77 p.285–296, 2009.

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

DI GIROLAMO, M.; MENDLINGER, S.; FERTIG, J. W. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **Am J Physiol**, v. 221, p. 850-858, 1971.

DINIZ, Y. S.; SANTOS, P. P.; ASSALIN, H. B.; SOUZA, G. A.; ROCHA, K. K. H.R.; EBAID, G. M.X.; SEIVA, F.R.F.; AMAUCHI, J.F.; NOVELLI FILHO, J. L. V.B.; NOVELLI, E.L.B. Conjugated linoleic acid and cardiac health: oxidative stress and anergic metabolism in standard and sucrose-rich diets. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p.318-325, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2. p.446-52, 2006.

FA, M., DIANA, A., CARTA, G., CORDEDDU, L., MELIS, M. P., MURRU, E., SOGOS, V., BANNI, S. Incorporation and metabolism of c9,t11 and t10,c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1736, p. 61 – 66, 2005.

FAGALI, N.; CATALÁ, A. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH• techniques. **Biophysical Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 56-62, 2008.

FANG, H-L., LIN, W-C. Corn oil enhancing hepatic lipid peroxidation induced by CCl₄ does not aggravate liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p.2267–2273, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

GAYDA, D. P.; PARIZA, M. W. Activation of 2-amino-3-methyl imidazo- 4 5-F quinone and 2-amino fluorine for bacterial mutagenesis by primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. **Mutation Research**, v. 118, p.7–14, 1983.

GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v.12, n.4, p.7-15, 2006.

GIUDETTI, A. M.; BEYNEN, A. C.; LEMMENS, A. G.; GNONI, G.V.; GEELEN, M. J.H. Hepatic lipid and cerbohydrate metabolism in rats fed a commercial mexture of conjugated linoleic acids (Clarinol G-80). **European Journal of Nutrition**, v.44, p.33-39, 2005.

GOEDECKE, J. H.; RAE, D. E.; SMUTS, C. M.; LAMBERT, E. V.; O'SHEA, M. Conjugated Linoleic Acid Isomers, α 10 α 12 and α 9 α 11, are Differentially Incorporated into Adipose Tissue and Skeletal Muscle in Humans. **Lipids**, v. 44, n. 11, p. 983-988, 2009.

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

HARO A. M., ARTACHO R., CABRERA-VIQUE C. Ácido linoleico conjugado: interés actual en nutrición humana. **Medicina Clinica** (Barcelona). v.127, l:13, p.508-15, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p.1841–1856, 2005.

HUR, S. J.; PARK, G.B.; JOO, S. T. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. **Livestock Science**, v. 110, n. 3, p. 221-229, 2007.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA _ PESQUISA DE ORÇAMENTO FAMILIAR (POF) 2002/2003 - Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil, 2004.

IPPAGUNTA, S., HADENFELDT, T. J., MINER, J. L., HARGRAVE-BARNES, K. M. Dietary Conjugated Linoleic Acid Induces Lipolysis in Adipose Tissue of Coconut Oil-Fed Mice but not Soy Oil-Fed Mice. **Lipids** v. 46, p. 821–830, 2011.

JAVADI, M; BEYNEN, A. C.; HOVENIER, R.; LANKHORST, Æ.; LEMMENS, A. G.; TERPSTRA, A. H. M.; GEELLEN, M. J. H. Prolonged feeding of mice with conjugated linoleic acid increases hepatic fatty acid synthesis relative to oxidation. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.15, p. 680–687, 2004.

JAUDSZUS, A., MOECKEL, P., HAMELMANN, E., JAHREIS, G. Trans-10,cis-12-CLA-Caused Lipodystrophy Is Associated with Profound Changes of Fatty Acid Profiles of Liver, White Adipose Tissue and Erythrocytes in Mice: Possible Link to Tissue-Specific Alterations of Fatty Acid Desaturation. **Annals of Nutrition & Metabolism**. v.57 p.103–111, 2010.

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

KELLEY, D. S.; BARTOLINIA, G. L.; NEWMANA, J. W.; VEMURIA, M.; MACKEY, B. E. Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12, and c9, t11 conjugated linoleic acid. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 74, p. 331–338, 2006.

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

KIM, M.; KIM, S.; JEONG, J. H.; PARK, H. S. The effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the levels of apoptotic proteins and fatty acid ethyl esters (FAEEs) in the brain of chronic ethanol-treated rat. **The FASEB Journal**, v. 22, 1b703, 2008.

KOBA, K.; BELURY, M. A.; SUGANO, M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. **Lipid Technology**, v. 19, n. 9, p. 200-203, 2007.

KRAMER, J. K. G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z.; ZHOU, J.; JAHREIS, G.; DUGAN, M. E. R. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 79 (suppl), p. 1137S-45S, 2004.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. 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**, v. 32, p. 1219–1228, 1997.

KRAMER, J. K. G.; SEHAT, N.; DUGAN, M. E. R.; MOSSOB, M. M.; YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; EULITZ, K.; AALHUS, J. L.; SCHAEFER, A. L.; KU, Y. Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 33, n. 6, p. 549-558, 1998.

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

LAGUERRE, M.; DECKER, E. A.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. DOI:10.1097/MCO.0b013e32833aff12, 2010.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**. v.46, p. 244–282, 2007.

LEUNG, Y. H.; LIU, R. H. *Trans*-10, *cis*-12-Conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than *cis*-9,*trans*-11-conjugated linoleic acid isomer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5469–5475, 2000.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008, 182f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.

LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **American Journal Physiology**, v. 275, p. E934-941, 1998.

LIN, X., BO, J., OLIVER, S. A. M., BENJAMIN A. CORL, JACOBI, S.K., OLIVER, W. T., HARRELL, R. J., ODLE, J., Dietary conjugated linoleic acid alters long chain polyunsaturated fatty acid metabolism in brain and liver of neonatal pigs. **Journal of Nutritional Biochemistry**. DOI:10.1016/J.JNUTBIO.2010.09.002, 2010.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. **Lipids**, v. 39, p. 1197-1206, 2004.

LOPES, D. C. F. **Desenvolvimento de bebida lacteal adicionada de ácido linoleico conjugado e ensaio clínico em mulheres obesas.** 2010, 160f. Tese - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2010.

LOPES, P. A., MARTINS, S. V., PINHO, M. S., ALFAIA, C. M., FONTES, C. M. G. A., RODRIGUES, P. O., MORAIS, G. S. L., CASTRO, M. F., PINTO, R., PRATES, J. A. M. Diet supplementation with the cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocytes in Wistar rats. **Nutrition Research** v.28 p. 480–486, 2008.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; LISSI E. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. **Free Radical Research**, v. 40, n. 9, p. 979–985, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MACHADO, R. M.; STEFANO, J. T.; OLIVEIRA, C. P. M. S. MELLO, E. S.; FERREIRA, F. D.; NUNES, V. S.; LIMA, V. M. R. QUINTÃO, E. C. R. CATANOZI, S.; NAKANDAKARE, E. R. LOTTENBERG. A. M. P. Intake of *trans* Fatty Acids Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Reduces Adipose Tissue Fat Content. **Journal of Nutrition**. v. 140 n. 6 p.1127-1132, 2010

MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. *In*: COSTA, N. M. B. e ROSA, C. O. B. **Componentes Bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Rubio, 2010. cap.18, p. 297-305.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GARCIA-MARTÍNEZ, M. C.; FONTECHA, J.; SALVADOR, D. Evaluación de la oxidación en un aceite rico en ácido linoleico conjugado (tonalín). **XII Congresso Latinoamericano de óleos e Gorduras, In: Anais do XII Congresso Latinoamericano de óleos e Gorduras**, p.1-6, 2007.

MARTINS, E. F.; TORRES, R. P.; MALUF, L. M. P.; MANCINI-FILHO, J.; NISHIYAMA, A.; PERES, C. M.; MIYASAKA. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos graxos por cromatografia. *In*: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. (Org.). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002, p.33-41.

McAFEE, A. J.; MCSORLEY, E. M.; CUSKELLY, G. J.; MOSS, B. W.; WALLACE, J. M. W.; BONHAM, M. P.; FEARON, A. M. Red Meat consumption: An overview of the risks and benefits. **Meat Science**, v. 84, n. 1, p. 1-13, 2010.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipids. *In*: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's: Food Chemistry**, 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p. 155-216.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MCGUIRE, M. K., PARK, Y., BEHRE, R. A., HARRISON, L. Y., SHULTZ, T. D., MCGUIRE, M. A. Conjugated linoleic acid concentration of human milk and infant formula. **Nutritional Research**. v.17, p.1277–1283, 1997.

McLEOD, R. S.; LEBLANC, A. M.; LANGILLE, M. A.; MITCHELL, P.L.; CURRIE, D. L. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.16, n.5, p.435-445, 2005.

MÉNDEZ, E. et al. Validation of the rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. **Journal American Oil Chemistry Society**., v.73, n.8, p.1033-1037, 1996.

MIAO, L., CLAIR, D. K. ST. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v.47, p.344–356, 2009.

MILLER, H. E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.48, n.2, p.91, 1971.

MINIHANE, A. M.; LOVEGROVE, J. A. Health benefits of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). *In*: WILLIAMS, C.; BUTTRISS, J. **Improving the fat content of foods**. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap.5, p.107-140.

MITCHELL, P. L.; MCLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. **Biochemistry Cell Biology**, v. 86, n. 4, p. 293-301, 2008.

MOUTSIOULIS, A. A.; RULE, D. C.; MURRIETA, C. M.; BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L.; BARBANO, D. M.; CAREY, G. B. Human breast milk enrichment in conjugated linoleic acid after consumption of a conjugated linoleic acid-rich food product: a pilot study.(Report). **Nutrition Research**, v. 28, n. 7, p. 437-443, 2008.

MORAES, F.; LUCIANE, M.; COLLA, L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletronica Farmacêutica*. v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 2, p. 127-146, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: Principles of Biochemistry Student CD-ROM. Versão para Windows. 2004. 1 CD-ROM

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.95, p.351–358, 1979.

OLIVEIRA, L. R. **Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa do pequi (Caryocar spp) processado e in natura**. 2010, Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

O'SHEA, E.F., COTTER, P. D., STANTON, C., ROSS, P. R., HILL, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal Food Microbiololy**. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025) . 2011.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an Improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PARIZA, M. W.; HARGRAVES, W. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, **Carcinogenesis**, v.6, 591–593, 1985.

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

PARK, Y. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad *trans* fat? **Journal of food composition and analysis**, v. 22S, p. S4-S12, 2009.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice, **Lipids**, 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, n. 3, p. 311-323, 2007.

PENG, W-H., TIENA, Y-C., HUANG, C-Y., HUANG, T-H., LIAO, J-C., KUO, C-L., LIN, Y-C. Fraxinus rhynchophylla ethanol extract attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via down-regulating the expressions of uPA, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127, p.606–613, 2010.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**. v. 34, n. 3, p. 231-247, dez. 2009.

PINHEIRO, F. G. **Ácido linoleico conjugado em cortes bovinos e laticínios: avaliação de metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários**. 2010, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PRIOR. R. L.; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p.950-956, 2000.

RAHMAN, M. M.; HALADE, G. V.; JAMALI, A. E.; FERNANDES, G. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents age-associated skeletal muscle loss. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n. 4, p. 513-518, 2009.

RAINER, L.; HEISS, C. J. Conjugated linoleic acid: Health implications and effects on body composition. **Journal American Diet Association**, v. 104, n. 6, p. 963-968, 2004.

RAMALHO, V. C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos, **Quimica Nova**. v. 29, n.4, p.755-760, 2006.

RAMÍREZ-SANTANA, C., CASTELLOTE, C., CASTELLA, M., MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C., RIVERO, M., PÉREZ-CANOA, F. J., FRANCHA, À. Enhancement of antibody synthesis in rats by feeding cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid during early life. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.22 p.495–501, 2011.

REYNOLDS, C. M.; ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signaling. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4-6, p. 199-204, 2010.

RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. **Food Research International**, v. 42, p. 401–410, 2009.

RITZENTHALER K. L., MCGUIRE M. K., FALEN R., SHULTZ T.D., DASGUPTA N., MCGUIRE M.A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **Journal Nutrition**. v. 131 p.1548-54, 2001.

ROACH, J. A. G.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, P.; KRAMER, J. K. G. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta**. v. 465, Issues 1-2, p. 207-226, 2002.

RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **Journal Biology Chemistry**, v. 239, p. 375-380, 1964.

RUCH, R. J., KLAUNIG, J. E., SCHULTZ, N. E., ASKARI, A. B., LACHER, D. A., PEREIRA, M. A., GOLDBLATT, P. J. Mechanisms of Chloroform and Carbon Tetrachloride Toxicity in Primary Cultured Mouse Hepatocytes. **Environmental Health Perspectives**. v. 69, p. 301-305, 1986.

SANTOS-ZAGO, L. F., BOTELHO, A. P., OLIVEIRA, A. C. Os efeitos do ácido linoleico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n.2 p.195-221, 2008.

SANTOS-ZAGO, L. F.; BOTELHO, A. P.; OLIVEIRA, A. C. Supplementation with commercial mixtures of conjugated linoleic acid in association with vitamin E and processo f lipid autoxidation in rats. **Lipids**, v.42, n.9, p.845-854, 2007.

SASSANO, G.; SANDERSON, P.; FRANX, J.; GROOT, P.; STRAALLEN, J. V.; BASSAGANYA-RIERA, J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 6, p. 1046-1052, 2009.

SCHUBERT, S.Y.; LANSKY, E.P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 11-17, 1999.

SIES, H., KOCH, O. R., MARTINO E., BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22 n.1, p.94-103, 1999.

SO, M. H.; TSE, I. M.; LI, E. T. 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. **Journal of**

Nutrition, v.139, p.145–51, 2009.

STRYJECKI, C., MUTCH, D. M. Fatty acid–gene interactions, adipokines and obesity. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 65, p.285–297, 2011.

SUBBAIAH, P. V.; SIRCAR, D.; AIZEZI, B.; MINTZER, E. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers on the biophysical and biochemical properties of model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, n. 3, p. 506–514, 2010.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidised glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. v. 27, p.502-522, 1969.

TSOFLIOU, F., FYFE, C. L., MATHESON, I., JACKSON, D. M., GRAHAM W. HORGAN, G. W. WAHLE, K. W. J. AHREN, B., WILLIAMS, L. M., SNEDDON, A. A. Modulation of fasted and postprandial plasma lipids in healthy volunteers by a dietary mixture of omega-3 fatty acids and Conjugated linoleic acid. **Journal of Food Lipids**. v.16, p. 499–513, 2009.

VALENZUELA B. A. Ácidos grasos con Isomería *trans* I. Su origen y los efectos en la salud humana. **Revista Chilena de Nutrición** v. 35, n.3, p. 162-171, 2008.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

WAHLE, K. W. J.; HEYS, S. D.; ROTONDO, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 6, p. 553-587, 2004.

WALLACE, R. J.; MCKAIN, N.; SHINGFIELD, K. J.; DEVILLARD. E. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. **Journal Lipid Research**, v. 48, n. 10, p. 2247-2254, 2007.

WANDERS, A. J.; LEDER, L.; BANGA J.D.; KATAN M.B.; BROUWER. I.A. 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, n. 8, p. 587–590, 2010.

WARREN, J. M.; SIMON, V. A.; BARTOLINI, G.; ERICKSON, K. L.; MACKEY B. E.; KELLEY, D. S. *Trans*-10,*cis*-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: Possible roles of specific lipid metabolism genes. **Lipids**. v. 38, n. 5, p.497-504, 2003.

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

YAMASAKI M.; MANSHO, K.; MISHIMA, H.; KIMURA, G.; SASAKI, M.; KASAI, M.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. 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. 6367-6371, 2000.

YAMASAKI, M.; KITAGAWA, T.; KOYANAGI, N.; CHUJO, H.; MAEDA, H.; KOHNO-MURASE, J.; IMAMURA, J.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. **Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 54-59, 2006.

YANG, L.; LEUNG, L. K.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acid. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n.10, p. 4212-4217, 2009.

YU, L. Free Radical Scavenging Properties of Conjugated Linoleic Acids. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p3452–3456, 2001.

YU, L. L.; ADAMS, D.; GABEL, M. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4135-4140, 2002a.

YU, Y., CORRELL, P. H., HEUVEL, J. P. V. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism, **Biochimistry. Biophysical. Acta.** v.1581, p. 89–99, 2002b.

YUAN, G-F.; SINCLAIR, A. J.; SUN, H. Y.; Li, D. Fatty acid composition in tissues of mice fed diets containing conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid. **Journal of Food Lipids**, v. 16, n. 2, p. 148-163, 2009.

YUN, H-S., DO, S-H., JEONG,W-I., YANG, H-J., YUAN, D-W., HONG, I-H., LEE, H-R., LEE, I-S., KIM, Y-K., CHOID, M-S., KIM H-A, JEONG, K-S. Cytotoxic effects of the conjugated linoleic acid isomers t10c12, c9t11-CLA and mixed form on rat hepatic stellate cells and CCl4-induced hepatic fibrosis. **Journal of Nutritional Biochemistry.** v.19, p.175–183, 2008.

ZABALA, A., FERNÁNDEZ-QUINTELA, A., MACARULLA, M. T., SIMÓN, E., RODRÍGUEZ, V. M., NAVARRO, V., PORTILLO, M. Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters. **Nutrition.** v. 22, Issue 5, p. 528-533, 2006.

ZHANG, A.; CHEN, Z. Y. Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 74, p.1611-1613, 1997.

ZHOU, X.; SUN, C.; LIU, J.; ZHAO, D. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR γ gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 18, n. 5, p. 361-368, 2008.

ZLATANOS, S. N.; LASKARIDIS, K.; SAGREDOS, A. Conjugated linoleic acid content of human plasma. **Lipids in Health and Disease**, v. 7, p. 34-39, 2008.

ANEXO 1**RAÇÃO COMERCIAL****Nuvilab CR-1**

Composição do Produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de Garantia por Quilograma do Produto:

Umidade (máx)	12,50	%
Proteína Bruta (min)	22,00	%
Extrato Etéreo (min)	4,50	%
Matéria Mineral (máx)	10,00	%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00	%
Cálcio (máx)	1,40	%
Fósforo (min)	0,80	%

Enriquecimento por Quilograma do Produto:

Vitaminas: Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.800,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg, biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais: Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300,00 mg.

Aditivos: Antioxidante 100,00 mg.

Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA

Uso: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Apresentação: Peletizada, (extrusada ou farelada sob consulta).

ANEXO 2

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – EXPERIMENTO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Of. CEEA/PCF nº 41/2007

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeitos dos isômeros conjugados do ácido linoléico sobre a peroxidação lipídica em ratos" (Protocolo CEEA nº153), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Eliane Bonifácio Silva e do orientador(a) Prof. Jorge Mancini Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/09/2007.

São Paulo, 13 de setembro de 2007.

Prof.ª Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

ANEXO 3

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – EXPERIMENTO II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/59/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Efeito dos isômeros conjugados do ácido linoléico (9cis, 11trans e 10trans, 12cis) e do ácido α -linolênico (9cis, 11trans, 13ics) no modelo de hepatotoxicidade induzidas por tetracloreto de carbono em ratos" (Protocolo CEU/FCF/281), de responsabilidade das pesquisadoras **Eliane Bonifácio Teixeira de Carvalho e Ilana Louise Pereira de Melo** sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 12 de julho de 2010.

São Paulo, 9 de agosto de 2010.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO 4

LAUDO FORNECIDO PELA COGNIS DO BRASIL

cognis

Cognis GmbH
Leonard Bernstein
Robert-Herzen-Str. 1
D-66267 Bartleben
Telefon (+49) 7303/13-0
Telefax (+49) 7303/13-
www.cognis.com

Cognis GmbH - P.O. Box 1062 - D-66267 Bartleben

Certificate of Analysis
(acc. to EN 10204 2.2)

Date
01.04.2008

Your purchase order/date

Our delivery number/date

Our order number/date

Customer number

Material:
721020
TONALIN FFA 80

FDMM0028

Test report
This is to confirm that our delivery meets the specification of our quality control and corresponds to the order confirmation.

The Cognis quality management system is certified according to DIN ISO 9001. The values contained herein reflect the values obtained from random sampling by our quality assurance department. However, this does not absolve or relieve the buyer from performing quality control testing upon receipt of goods nor shall this imply any warranty regarding specific properties or the suitability of a product for a specific purpose.

Improper handling or storage can alter the product. The powder density of powder products may differ due to manufacturing, transportation or storage conditions.

Batch GR80863161

date of manufacturing: 02/2008 best before: 02/2011

Parameter/Method	Unit	Value	min.	max.
acid value mg KOH/g CP-1002	-	197,0	185,0	204,0
peroxide value meq O2/kg CP-1008	-	0,3	0,0	10,0

Gesellschaft zur
Lebensmittel-Haltung
Eis-Verfahren
Spezialanwendung
Düsseldorf 40243

Cognis GmbH
Robert-Herzen-Str. 1
40765 Mannheim
067-61-10 067-61-10000

Gesellschaft für
Lebensmittel-Haltung
Eis-Verfahren
Spezialanwendung
Düsseldorf 40243

Deutsche Bank AG, Düsseldorf
Konto 227 201 100 BIC 227 201 100
BIC 227 201 100 BIC 227 201 100
SWIFT 227 201 100 BIC 227 201 100

Page 1 / 3

Cognis GmbH
 Location Bietzen
 Robert-Hansen-Str. 1
 D-89257 Bietzen
 Telefon (+49) 7303/13-0
 Telefax (+49) 7303/13-
 www.cognis.com

Cognis GmbH - P.O. Box 1003 - D-89251 Bietzen

Delivery item/data

Material 721020 TONALIN FFA 80
 Batch GR80553161

FDMM0025

Parameter/Method	Unit	Value	min.	max.
Iodine value g I/100g CP-1007	-	171	121	
saponification value mg KOH/g CP-1003	-	187	185	204
color value CP-1012	-	0,2	0,0	2,0
heavy metals content (as Pb) EX-1010	ppm	10,0	0,0	10,0
FA C 18:0 (Spectrum) IA-1072	%(AR)	2,2	0,0	4,0
FA C 18:0 (Spectrum) IA-1172	%(AR)	2,8	0,0	4,0
FA C 18:1 c9 (Spectrum) IA-1272	%(AR)	12	10	20
FA C 18:2 c9,c12 (Spectrum) IA-1372	%(AR)	0,2	0,0	3,0
FA C 18:2 conjug., total (Spect.) IA-1472	%(AR)	81	78	84
FA C 18:2 c9,c11 (Spectrum) IA-1572	%(AR)	39,5	37,5	42,0
FA C 18:2 110,c12 (Spectrum) IA-1672	%(AR)	39,3	37,5	42,0

Under Monitoring:

unsaponifiable matter (IUPAC) 0 - 1,0 %

This document was automatically generated and is valid without a signature. Due to spacing considerations, the complete parameter text may not appear.

Sachverständige
 Sachverständige
 Dr. Michael
 Dr. Michael

Cognis GmbH
 Robert-Hansen-Str. 1
 D-89257 Bietzen
 UST-ID-Nr. 1581485285

Sachverständige
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael

Sachverständige
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael
 Dr. Michael

Page 2 / 3

ANEXO 5**CROMATOGRAMA REFERENTE AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO**

ANEXO 6**CORRELAÇÕES LINEARES DE PEARSON (r)****Tabela 6-1.** Correlações lineares de Pearson (r) entre os parâmetros do lipidograma

r	COLESTEROL	TG
	0,3541*	-0.1574
HDL	p=0.018	p=0.308
	-0.0980	
TG	p=0.527	

Tabela 6-2. Correlações lineares de Pearson (r) entre TBARS e as enzimas ALT e AST.

r	TBARS	AST
	0.0362	0.0703
ALT	p=0.809	p=0.638
	.2743	
AST	p=0.062	

As tabelas 6-1 e 6-2 apresentam as correlações lineares de Pearson (r) entre as análises do lipidograma e TBARS e enzimas marcadoras de dano hepático respectivamente. *p<0,01.

Tabela 6-3. Tecido hepático

r	TBARS	CAT	SOD
	0,5164*	0,4956*	
SOD	p=0.001	p=0.001	
	0.0670		
CAT	p=0.681		
	0.0537	0.2365	0.1753
GPx	p=0.742	p=0.142	p=0.279

Tabela 6-4. Tecido cerebral

r	SOD	TBARS
	0,4928*	0.2798
GPX	p=0.001	p=.085
		0.0860
SOD		p=0.603

Tabela 6-5. Tecido muscular

r	TBARS	GPx
	-0,2910	0,3471*
SOD	p=0.050	p=0.018
	-0.1026	
GPx	p=0.498	

As tabelas 6-3, 6-4 e 6-5 apresentam as correlações lineares de Pearson (r) entre as análises de TBARS e enzimas antioxidantes para os tecidos hepático, cerebral e muscular respectivamente. *p<0,01;**p<0,05.

Tabela 6-6. Correlações lineares de Pearson (r) entre TBARS e os tecidos analisados.

r	TBARS(CRBR)	TBARS(MÚSC)
	0.1067	
TBARS(MÚSC)	p=.555	
	-0.3428	0.0074
TBARS(FGD)	p=0.051	p=0.968

Tabela 6-7. Correlações lineares de Pearson (r) entre SOD e os tecidos.

r	SOD(CRBR)	SOD(MÚSC)
	0,3175*	
SOD(MÚSC)	p=0.026	
	-.0980	-.0544
SOD(FGD)	p=.503	p=.711

Tabela 6-8. Correlações lineares de Pearson (r) entre GPx e os tecidos.

r	GPX(CRBR)	GPX(FGD)
	-0.0904	
GPX(FGD)	p=0.546	
	0.1275	0.1247
GPX(MÚSC)	p=0.393	p=0.404

As tabelas 6-6, 6-7 e 6-8 apresentam as correlações lineares de Pearson (r) entre as análises de TBARS, SOD e GPX e os tecidos estudados. Não houve correlação entre esses parâmetros.