

## **EFEITO BIOLÓGICO DE LEITE EM PÓ RICOS EM ÁCIDO LINOLEICO COJUGADO (CLA) EM ANIMAIS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

MARIANA DE SOUSA<sup>1\*</sup>; MARIA TERESA BERTOLDO PACHECO<sup>2</sup>; VERA SÔNIA NUNES DA SILVA<sup>3</sup>,  
APARECIDA SÔNIA DE SOUZA<sup>3</sup>; SUELI R. BAGGIO<sup>3</sup>; ANA POSSENTI<sup>4</sup>  
Nº0901003

### **RESUMO**

Ácido linoleico conjugado (CLA) exerce influência positiva na saúde humana, mas a ingestão destes ácidos graxos na dieta é reduzida, sendo recomendado um aumento no consumo de CLA. Um caminho para aumentar o conteúdo de CLA na dieta sem mudanças radicais nos hábitos alimentares seria enriquecer os produtos alimentares comumente consumidos com suplementos de CLA. Vários efeitos fisiológicos do CLA têm sido identificados, incluindo efeitos na composição corporal, glicose sérica e insulina, carcinogênese, cardiovasculares, formação óssea e função imune. Adicionalmente, os isômeros de CLA podem ser alongados e desaturados dentro do corpo, e estes metabólitos podem ter efeitos posteriores os quais não tem sido identificados ou entendidos, embora eles possam desempenhar um importante efeito que o CLA tem sobre o carcinogênese e alterações cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos biológicos do leite em pó enriquecido com CLA na regressão da aterosclerose induzida experimentalmente em hamsters. O leite em pó enriquecido de CLA com Tonalin (COGNIS) foi produzido em escala industrial pela CAPSA (espanha). A composição e o perfil de ácidos graxos foram determinados nas amostras de leite por Cromatografia Gasosa e Ag+HPLC. Três grupos de hamsters (n=30) com hipercolesterolemia induzida e um grupo controle (n=10) foram mantidos por 5 semanas em dietas formuladas de acordo com a AIN-93M. Contendo: a) mistura de leite em pó desnatado e leite em pó integral; b) leite em pó mais 0,5 ml/dia de óleo de CLA por gavagem oral; c) leite em pó enriquecido de CLA. Todas as dietas continham 0,1% de colesterol e foram comparadas as dietas controle comercial. A condição fisiológica do sangue, perfil lipídico e peso corporal foram monitorados semanalmente. Foram avaliados: triglicerídeos totais, índice glicêmico, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e algumas enzimas (ALT, AST). Os fígados foram analisados com relação ao nível de lipídeos, colesterol e histopatologia do tecido. O leite em pó enriquecido com CLA continha 65% de CLA o qual compreende 2 maiores isômeros: C18:2 cis-9, trans 11 e C18:2 cis-10, trans-12 o qual representa 90% do total do CLA. Foram encontrados outros isômeros de CLA em menores concentrações. A proporção de lipoproteínas potencialmente aterogênicas (VLDL+LDL) e anti-aterogênicas (HDL) foi significativamente menor em hamsters alimentados com leite em pó desnatado enriquecido de CLA comparado aos outros tratamentos. A condição fisiológica do sangue e as enzimas hepáticas foram similares para todos os grupos. O funcionamento hepático e o índice glicêmico de hamsters recebendo leite em pó desnatado enriquecido com CLA não foram afetados. Estes dados sugerem que o ácido linoleico conjugado incorporado ao leite em pó causa redução dos triglicerídeos plasmáticos, aumentando o HDL em hamsters hipercolesterolêmicos e ocasionaram uma redução no peso corpóreo final. Entretanto, o presente estudo mostra que dieta enriquecida com CLA reduz os índices aterogênicos em hamsters hipercolesterolêmicos. Palavras chaves: ácido linoléico conjugado, hipercolesterolemia, hamsters.

### **Abstract**

Conjugated linoleic acid (CLA) exerts a strong positive influence on human health but intake of these fatty acids is typically too low, and increased consumption of CLA is recommended. A good way to raise the CLA content in the diet without a radical change in eating habits seems to be the enrichment of commonly consumed food products with CLA supplements. A multitude of physiological effects of CLA have been identified, including effects on body composition, serum glucose and insulin, carcinogenesis, cardiovascular variables, bone formation, and immune function. Additionally, CLA isomers can be elongated and desaturated within the body, and these metabolites may have even further effects which are not yet well identified or understood, although they may play an important role in the effects that CLA has on carcinogenesis and

cardiovascular variables. The aim of this study was to evaluate the effects of CLA enriched milk powder in the regression of experimentally-induced atherosclerosis in hamsters. Enriched CLA milk powder with Tonalín® (COGNIS) was produced at industrial-scale by CAPSA (Spain). Fatty acid composition and CLA isomer profiles were determined in milk samples by GC and Ag+-HPLC. Four groups of hypercholesterolemic-induced hamsters (n=30) (Golden syrius) were maintained for five weeks on diets formulated according to AIN-93M containing: a) mix of whole and skim milk powder; b) skim milk powder plus 0.5 mL/day of CLA oil by oral gavage; c) CLA enriched skim milk powder. All diets contained 0.1% cholesterol and were compared to the control commercial diet. Blood physiological status, lipid profile and body weight was monitored weekly. Total triglycerols, glycemic index, total and LDL, HDL and VLDL cholesterol and some enzymes (ALT, AST) were also analyzed. The livers were examined in regard to lipid level, and the cholesterol and tissue histopathology. The CLA enriched skim milk contained 65 % of CLA which comprised in 2 major isomers: C18:2 *cis*-9, *trans*-11 and C18:2 *cis*-10, *trans*-12 that represented the 90% of total CLA. Other minor CLA isomers were also presented. The ratio of potentially atherogenic lipoproteins (VLDL+LDL) to antiatherogenic HDL was significantly lower in hamsters fed diet of CLA-enriched skim milk compared with the other treatments. Liver enzyme activity and blood physiological status was similar for all groups. The liver function and glycemic index in hamsters receiving CLA-enriched skim milk were not affected. These data suggest that conjugated linoleic acid incorporated in skim milk powder causes a reduction of plasmatic triglycerols, an increase in HDL in hypercholesterolemic hamsters and brought about a reduction in final body weight. Therefore, the present study shows that the CLA-enriched diet reduces the atherosclerosis index, in hypercholesterolemic hamsters.

**Key words:** Conjugated linoleic acid, hypercholesterolemic, hamsters

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC – Faculdade de Nutrição – Universidade Paulista

<sup>2</sup> Orientador: Pesquisador, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos- Instituto de Tecnologia de Alimentos, C.P. 139, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos- Instituto de Tecnologia de Alimentos, C.P. 139, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisador, CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

## 1- INTRODUÇÃO

O ácido linoléico conjugado (CLA) compreende um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico (18:2), os quais têm apenas uma ligação simples entre as insaturações. Embora possam existir diversos isômeros possíveis com esta característica, dois deles (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) têm despertado grande interesse em função dos seus efeitos biológicos já identificados. Os CLAs suplementados na dieta afetam a deposição de gordura na carcaça de animais em crescimento, como camundongos e suínos. A maior parte dos experimentos conduzidos tem utilizado suplementos comerciais contendo uma mistura de isômeros dos CLAs (Monici et al, 2007, Park *et al.*, 1999; Ostrowska *et al.*, 1999).

Estudos usando diferentes modelos animais relacionaram os CLAs a vários outros efeitos positivos que poderiam favorecer a saúde humana, incluindo a redução na aterosclerose e prevenção e tratamento do *diabetes mellitus* não-dependente de insulina (Sebedio *et al.*, 1999). Sendo entretanto descrito resultados contraditórios na literatura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o efeito de duas fontes de CLAs nos níveis plasmáticos de lipídeos; glicemia; peso e depósitos de gordura corporal, perfil lipídico e de

colesterol no plasma, aterogênese e toxicidade hepática em hamsters adultos machos hipercolesterolêmicos da linhagem *Golden syrian*.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

#### **Fonte de CLAs**

Leite em pó integral, desnatado e formulado industrialmente com a adição de ácido linoléico conjugado (CLAs) e o óleo de tonalin foram gentilmente fornecidos pela empresa Corporación Alimentaría Peñasanta, S.A. (CAPSA/ Madri, Espanha).

#### **Fonte de Colesterol.**

O colesterol utilizado nas dietas experimentais para induzir a hipercolesterolemia foi fornecido pela Eskisa S.A. Ind. Comércio, fabricado pela Dolder.

### **2.2 MÉTODOS**

#### **Caracterização da matéria-prima e dietas experimentais**

Para a caracterização foram feitas as seguintes determinações químicas no leite em pó (Horwitz, 2000): **Proteína** (AOAC 2000, v.2, cap. 33, Met. 930.29, p.61), **Lípides** (Método Rose-Gottlieb, AOAC 2000, v.2, cap. 33, Met. 932.06, p.61), **Composição de ácidos graxos** (AOCS 1998, v.2, Met. Ce 1F-96, Ce 1-62, Ce 2-66; AOAC 2000, Met. 996.06) e **Carboidratos**: determinados por diferença, usando a fórmula:  $100 - (\text{proteína} + \text{lipídeos totais} + \text{fibra bruta} + \text{cinzas})$ . As análises bioquímicas foram realizadas por Kits da Labtest.

#### **Ensaio Biológico**

##### **Aspectos Éticos**

O protocolo do ensaio biológico nº 1676-1 esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 17 de novembro de 2008.

##### **Dietas Experimentais**

As dietas experimentais isoprotéicas e isoenergéticas foram formuladas segundo o “American Institute of Nutrition” (DUFF et al., 2002), usando a dieta AIN-93M (REEVES et al., 1993, com exceção dos níveis de lipídeos, na primeira fase do experimento).

Para a primeira fase do ensaio, para obter o efeito hipercolesterolêmico a dieta foi calculada com 20% de lipídeo e 0,5% de colesterol. Para a segunda fase após o estabelecimento do estado de

hipercolesterolemia, os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos com 10 animais os quais receberam dietas específicas. O ensaio biológico constou de 4 tratamentos: **A.** CLA 1- Controle Negativo- Leite Desnatado sem CLA e 0.1 % colesterol; **B.** CLA 2 - Controle Positivo Leite Desnatado + 0.5 mL Tonalin (gavagem oral) e 0.1% colesterol; **C.** CLA 3 - Grupo Teste Leite Desnatado formulado com CLA e 0.1% colesterol; **D.** Grupo controle (ração comercial). Em ambas as fases foram consideradas um consumo individual de 8g por animal.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Composição centesimal das dietas experimentais

Os resultados da composição (Tabela 1) mostraram que o leite em pó desnatado, devido à menor concentração de lipídeos (1,63%), apresenta o maior teor de proteína (36,03%) em relação aos demais: leite em pó integral e desnatado com CLA, O leite integral apresentou 28,51% de lipídeos, onde predominaram os saturados (65,16%).

**Tabela 1.** Resultados percentuais da composição centesimal aproximada dos leites em pó

AMOSTRA	UMIDADE	CINZAS	PROTEÍNA	LIPÍDEOS	CARBOIDRATOS
Leite em pó desnatado	3,78	8,49	6,03	1,63	50,08
Leite em pó integral	3,26	6,06	27,46	28,51	34,71
Leite em pó desnatado + Tonalin (CLA)	1,71	8,17	34,70	8,96	46,47

Com relação aos lipídeos e triglicerídeos do plasma do grupo hipercolesterolêmicos (HD) todos os parâmetros analisados foram diferentes ( $p < 0,05$ ), indicando que a dieta promoveu o estado hipercolesterolêmico nos animais com 15 dias de alimentação (Tabela 2). Sendo assim teve início a segunda etapa do experimento, onde os animais receberam as dietas formuladas de acordo com AIN-93M acrescida de 0,1% de colesterol, para garantir que os animais mantiveram o colesterol elevado.

Com relação ao perfil lipídico do plasma, para a segunda fase do ensaio, os valores de TG apresentaram aumentados para os grupos que receberam dieta com leite, sendo que o tratamento com leite em pó desnatado enriquecido com CLA foi similar ( $p > 0,05$ ) ao grupo controle de ração comercial, apesar de receber na dieta 0,1% de colesterol (Tabela 3).

**Tabela 2.** Triglicérides e perfil lipídico de hamsters (*Golden Syrius*) alimentados por 15 dias com dieta aterogênica HD (20% lípidos de leite integral) adicionada de 0,5% de colesterol.

PARÂMETROS PLASMA (mg/dl)	Grupos/ Tratamentos	
	Controle <sup>1</sup>	Hipercoleterolemicos (HD)
Triglicerídeos	79, 34(18,6) <sup>b</sup>	162,55 (23,5) <sup>a</sup>
Colesterol total	92,4 (7,5) <sup>b</sup>	240,6 (3,6) <sup>a</sup>
LDL- colesterol	22,8 (3,3) <sup>b</sup>	184,0 (38,7) <sup>a</sup>
HDL- colesterol	32,16 (4,5) <sup>b</sup>	76,85 (4,2) <sup>a</sup>
VLDL- colesterol	15,86 (3,7) <sup>b</sup>	32,51 (4,7) <sup>a</sup>

<sup>1</sup> ração comercial, <sup>2</sup> dieta controle negativo

**Tabela 3.** Triglicerídeos e perfil lipídico de hamsters (*Golden sirian*) alimentados durante 35 dias com dietas experimentais: CLA1; CLA2 e CLA3.

PLASMA	Grupos/Tratamento			
mg/dl	Control <sup>1</sup>	CLA.1 <sup>2</sup>	CLA.2	CLA.3
Triglicerídeos	71,72 (14,3) <sup>c</sup>	240,84 (28,9) <sup>a</sup>	127,08 (20,2) <sup>b</sup>	91,53 (27,7) <sup>c b</sup>
Total colesterol	67,46 (5,99) <sup>b</sup>	144,41 (16,42) <sup>a</sup>	137,07 (16,65) <sup>a</sup>	129,34 (0,74) <sup>a</sup>
LDL- colesterol	42,85 (5,6) <sup>b</sup>	63,90 (15,1) <sup>a b</sup>	75,27 (15,5) <sup>a</sup>	62,45 (16,8) <sup>a b</sup>
HDL- colesterol	10,26 (0,9) <sup>b</sup>	28,25 (6,8) <sup>c</sup>	22,43 (7,6) <sup>c</sup>	47,16 (11,2) <sup>a</sup>
VLDL- colesterol	14,36 (2,9) <sup>b</sup>	48,17 (5,8) <sup>a</sup>	25,42 (7,6) <sup>c</sup>	22,91 (3,2) <sup>c</sup>
VLDL+LDL/ HDL	5,58	3,96	4,48	1,8

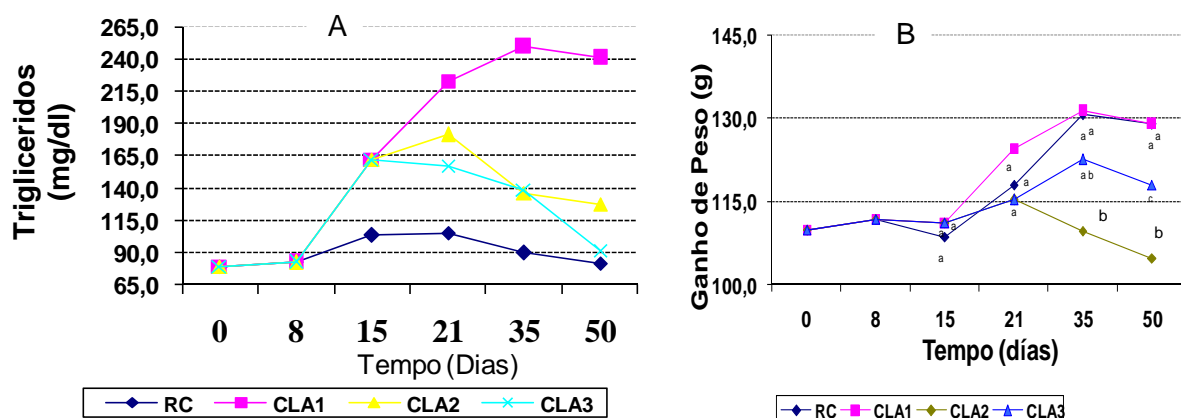
<sup>1</sup> ração comercial, <sup>2</sup> dieta controle negativo

Com relação ao colesterol e suas frações todos os tratamentos que receberam 0,1% de colesterol na dieta apresentaram valores maiores, sendo que entre os tratamentos a base de leite, não mostraram diferenças entre eles ( $p>0,05$ ). Contudo, o grupo CLA3 apresentou o maior valor de HDL, em relação aos demais tratamentos, inclusive ao controle ( $p>0,05$ ). O CLA2 mostrou o maior valor de LDL, similar ao CLA1 (Tabela 3).

Os grupos alimentados com leite e colesterol apresentaram o maior conteúdo de lipídeos no fígado, sendo que aqueles que receberam CLA adicionado ao leite em pó (CLA3) foram similares ao controle. Com relação ao conteúdo de colesterol por massa de fígado, todos os grupos diferiram entre si, sendo os grupos CLA2 e CLA3 de valores intermediários. O grupo CLA3 apresentou valores bem reduzidos com relação aos demais.

As enzimas séricas, que expressam o grau de agressão e comprometimento do funcionamento do fígado, não apresentaram diferenças entre os tratamentos, indicando a ausência de toxicidade da ingestão de CLA nas condições experimentais (Tabela 4).

A Figura 1 mostra o comportamento do nível de TG no plasma e do ganho de peso para os animais em tratamento, o grupo CLA1 e CLA2 não diferiram entre si.



**Figura 1.** Triglicerídeos e ganho de peso de hamsters (*Golden sirian*) alimentados com tratamentos CLA1, CLA2, CLA3 e ração comercial controle (RC), durante 45 dias.

**Tabela 4.** Parâmetros plasmáticos e dos tecido hepático de hamsters em diferentes tratamentos.

PARAMETROS	Grupos/ Tratamentos			
	CO - Controle <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup> -CLA.1	CLA.2	CLA.3
Glicose (mg/dL)	108,4 (11,1) <sup>a</sup>	116,4 (11,7) <sup>a</sup>	120 (9,9) <sup>a</sup>	117,8 (18,9) <sup>a</sup>
Tecido adiposo visceral*, %	1,0 (0,29) <sup>b</sup>	1,93 (0,53) <sup>a</sup>	0,86 (0,26) <sup>b</sup>	0,96 (0,30) <sup>b</sup>
Fígado*, % pc	3,55 (0,32) <sup>b</sup>	5,03 (0,66) <sup>a</sup>	4,12 (0,71) <sup>b c</sup>	4,82 (0,16) <sup>a c</sup>
Lipídeos**, %	15,90 (2,56) <sup>b</sup>	23,39 (0,81) <sup>a</sup>	22,55 (1,84) <sup>a</sup>	18,83 (1,55) <sup>a b</sup>
Colesterol**, %	182,64 (0,24) <sup>d</sup>	1305,25 (5,53) <sup>a</sup>	675,09 (2,0) <sup>b</sup>	296,64 (7,75) <sup>c</sup>
AST, (U/L)	32,37 (10,54) <sup>a</sup>	33,66 (11,64) <sup>a</sup>	32,90 (10,70) <sup>a</sup>	26,77 (7,32) <sup>a</sup>
ALT, (U/L)	44,00 (8,07) <sup>a</sup>	35,20(12,05) <sup>a</sup>	34,36(15,07) <sup>a</sup>	27,32(10,25) <sup>a</sup>

\* gramas de tecido por 100g de peso corporal; \*\*g/100g tecido ; U/L = unidades por litro

#### 4. CONCLUSÃO

→ O leite em pó enriquecido com CLA continha 65% de CLA o qual compreende 2 maiores isômeros: C18:2 cis-9, trans 11 e C18:2 cis-10, trans-12 o qual representa 90% do total do CLA. A proporção de lipoproteínas potencialmente aterogênicas

(VLDL+LDL) e anti-aterogênicas (HDL) foi significativamente menor em hamsters alimentados com leite em pó desnatado enriquecido de CLA comparado aos outros tratamentos (CLA3).

- A condição fisiológica do sangue e as enzimas hepáticas foram similares para todos os grupos. O funcionamento hepático e o índice glicêmico de hamsters recebendo leite em pó desnatado enriquecido com CLA não foram afetados.
- Estes dados sugerem que o ácido linoleico conjugado incorporado ao leite em pó causa redução dos triglicerídeos plasmáticos, aumentando o HDL em hamsters hipercolesterolêmicos e ocasionaram uma redução no peso corpóreo final. Entretanto, o presente estudo mostra que dieta enriquecida com CLA reduz os índices aterogênicos em hamsters hipercolesterolêmicos.

## 5. REFERÊNCIAS

- MONICI, K.S.Q.; BERTOLDO PACHECO, M.T.; BALDINI, V.L.S. Ácido linoléico conjugado: efeitos biológicos e suas contribuições. **Nutrição Brasil**, v.6, p: 168-175, 2007.
- HORWITZ, W. (Ed.), **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17<sup>a</sup>. Edição, Gaithersburg, Maryland: AOAC, v.2, cap.33, 2000
- PARK, Y.; ALBRIGTH, K.J.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; PARIZA, M.W. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v.34, n., p.235-241, 1999.
- OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R.F.; BAUMAN, D.E.; DUNSHEA, F.R. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. **Journal of Nutrition**, v.129, p.2037-2042, 1999.
- DUFFY, P. H., et al. Effect of the AIN-93M Purified Diet and Dietary Restriction on Survival in Sprague-Dawley Rats: Implications for Chronic Studies. **Journal of Nutrition**, V. 132, p. 101-107, 2002.
- TERPSTRA, A.H.M.; JAVADI, M.; BEYNEN, A.C.; KOCSIS, S.; LANKHORST, A.E.; LEMMENS, A.G.; MOHEDE, I.C.M. Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. **Journal of Nutrition**, v.133, p.3181-3186, 2003.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, Nov. 1993.