

# Ácido Linoleico Conjugado (CLA) - Benefícios Para Saúde, Sua Presença e Estabilidade em Produtos Lácteos

## Conjugated Linoleic Acid (CLA) - Health Benefits, Its Presence and Stability in Dairy Products

Patrícia Blumer Zacarchenco<sup>a\*</sup>; Darlila A. Gallina<sup>a</sup>; Leila Maria Spadoti<sup>a</sup>;  
Fabiana Katia Helena Souza Trento<sup>a</sup>; Maria Izabel Merino de Medeiros<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Tecnologia de Alimentos, SP, Brasil

\*E-mail: pblumer@ital.sp.gov.br

Recebido: 21 de maio de 2012; Aceito: 5 de dezembro de 2012.

### Resumo

O crescente interesse pelo CLA (*conjugated linoleic acid*) se iniciou com a descoberta de que inibia tumores induzidos quimicamente. Este grupo de substâncias está associado à gordura do leite bovino que é a fonte natural mais rica em CLA. O teor de CLA originalmente encontrado no leite pode ser aumentado de 3 maneiras. O aumento pode ser conseguido com mudanças na dieta dos animais, pela síntese por bactérias lácticas e probióticas na fermentação do leite e pela adição de CLA sintético aos produtos lácteos com teor reduzido de gordura. Igualmente importantes são as pesquisas sobre a relação entre parâmetros do processamento de produtos lácteos e o conteúdo de CLA. Estes conhecimentos forneceram fundamentos para a fabricação de produtos lácteos com teores elevados de CLA que possam ter benefícios a saúde. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão crítica da literatura sobre os benefícios à saúde relacionados ao CLA e sua presença e estabilidade em produtos lácteos.

**Palavras-chave:** Ácido Linoléico. Leite. Laticínios.

### Abstract

*The growing interest in CLA (conjugated linoleic acid) was started when its effects on inhibition of tumors was verified. Milk fat is the richest natural dietary source of CLA. There are three main ways to increase the original level of CLA in milk. This content could be increased by altering the diet of the animals, in the fermentation processes by lactic acid and probiotic bacteria and by adding synthetic CLA on the low fat dairy products. The studies on processing parameters of dairy products and its influence on the level of CLA are also important. This knowledge offers the basis to the industrial production of dairy products with high levels of CLA presenting health benefits. The aim of this study was a critical review on health benefits of CLA and its presence and stability in dairy products.*

**Keywords:** Linoleic Acid. Milk. Dairy Products.

### 1 Introdução

A dieta é um fator relevante para prevenir alguns tipos de câncer. Dentre os componentes da dieta mais relacionados a prejuízos à saúde estão as gorduras. Contudo, a eliminação total da ingestão deste grupo de substâncias pode não trazer benefícios. A gordura dietética é um macronutriente importante na dieta de todos os animais. Além do papel como fonte de energia e do efeito na composição das membranas, a gordura dietética exerce também profundos efeitos na expressão gênica, levando a modificações no metabolismo, crescimento e diferenciação celular<sup>1</sup>. Os ácidos linoléicos conjugados (CLA ou *Conjugated Linolenic Acids*) correspondem a um grupo heterogêneo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico encontrados, principalmente, na fração gordurosa de produtos lácteos e carnes de ruminantes<sup>2</sup>.

Desde a descoberta de que o CLA inibia tumores induzidos quimicamente, várias pesquisas se iniciaram para determinar as propriedades fisiológicas, bioquímicas e físicas dos isômeros do CLA. Os avanços nestas pesquisas indicam que os isômeros dos ácidos graxos conjugados possuem potentes atividades biológicas que os destacam em

benefícios para a saúde humana<sup>3</sup>. Exemplos destas atividades biológicas são citados por Pariza *et al.*<sup>4</sup>, como a ação do isômero *trans*-10,*cis*-12 do CLA sobre adipócitos com a redução da absorção de lipídios através da inibição da lipase lipoprotéica e da desaturase estearoil-CoA e sua influência sobre o metabolismo lipídico em cultivo de células humanas Hep-G2 de fígado. Estes autores destacaram ainda a inibição de processos de carcinogênese em modelos animais pelos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10,*cis*-12 do CLA. Já Kim *et al.*<sup>5</sup> salientaram o decréscimo em um terço dos níveis de TNF- $\alpha$  no músculo esquelético após 8 semanas quando a dieta de ratos diabéticos foi suplementada com 1% de uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do CLA.

O CLA é referido por alguns autores como um composto bioativo presente em alimentos. Alguns destes compostos bioativos têm mostrado capacidade de modular a resposta inflamatória e atenuar a carcinogênese. Há evidências de que várias substâncias presentes nos alimentos como ácidos graxos poliinsaturados com insaturações nos carbonos 3 e 6 da cadeia (n-3 e n-6), CLA, curcumina, resveratrol, genisteína, vitamina A e D, entre outros, podem modular vários pontos do processo

inflamatório<sup>5</sup>. Dentre os ácidos graxos poliinsaturados n-3 destaca-se o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), embora o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) também têm sido bastante estudados.

O CLA natural consiste, principalmente, de ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienóico (9*c*,11*t*-18:2) formado pela biohidrogenação de ácido linoléico em animais ruminantes, embora outros isômeros geométricos e posicionais também sejam encontrados. O CLA comercial é produzido por isomerização alcalina de óleos ricos em ácido linoléico, como os de girassol, e tende a conter uma mistura equimolar de ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienóico e ácido 10-*trans*-12-*cis*-octadecadienóico juntamente com quantidades variáveis (mas acima de 30%) de outros isômeros posicionais e geométricos<sup>6</sup>. Nos alimentos, o CLA é encontrado na gordura láctea, no tecido adiposo de ruminantes e em produtos derivados destes, embora existam exceções. A dieta do animal influencia no teor de CLA de sua gordura corporal e no teor de CLA presente em seu leite. Esta quantidade de CLA é aumentada quando o animal se alimenta de pasto ou de oleaginosas, como a soja<sup>7</sup>.

A elevação do CLA é a opção mais interessante para o leite e derivados de ruminantes, não só pelas inúmeras evidências de funcionalidade, relacionadas à propriedades anticarcinogênica, antioxidante, fator de crescimento, lipólise e/ou redução da lipogênese, especialmente no tecido adiposo abdominal, e aumento da resposta imune, mas também pela singularidade da sua presença na gordura de ruminantes, uma vez que a síntese natural desta molécula tem como origem a fermentação ruminal a partir dos lipídios dietéticos<sup>8</sup>.

Este artigo objetivou realizar uma revisão da literatura sobre os benefícios à saúde relacionados ao CLA e sua presença e estabilidade em produtos lácteos. Também foi apresentada a análise crítica destas informações pelos autores.

## 2 Desenvolvimento

### 2.1 CLA e benefícios a saúde

Praticamente todos os estudos sobre os benefícios do CLA na saúde usam uma mistura de isômeros de ácidos graxos livres produzidos por isomerização catalisada do ácido linoléico ou óleos ricos em ácido linoléico. Os isômeros *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10 e *cis*-12, em geral, predominam em quantidades aproximadamente iguais e são considerados como as formas biologicamente ativas<sup>7</sup>. Já é aceito que um único isômero não é responsável por todas as atividades biológicas. As pesquisas atuais sobre os efeitos do CLA na saúde estão procurando elucidar os papéis de seus isômeros individualmente<sup>8</sup>.

Mesmo sabendo que outros isômeros do CLA podem ser encontrados em alimentos para humanos, a forma que predomina é o ácido rumênico (RA). O RA representa mais de 80% do CLA presente na gordura do leite e mais de 75% do CLA presente na gordura da carne<sup>10-13</sup>.

A ingestão diária normal de CLA na dieta é de 150 – 400 mg/g<sup>14</sup>. Usando várias metodologias, McGuire *et al.*<sup>11</sup>

relataram que a estimativa da ingestão de RA pela população varia de 50 a 1.000 mg/dia. Contudo, a maioria das estimativas de ingestão de RA apontavam valores entre 50 e 250 mg/dia nos Estados Unidos e de 350 a 430 mg/dia na Alemanha. As diferenças registradas na ingestão de RA se devem ao alto consumo de gordura por populações como a alemã, bem como às altas concentrações de RA em alimentos encontrados em algumas regiões<sup>11</sup>. As fontes de RA na dieta americana são, principalmente, os produtos cárneos e lácteos. Contudo, a ingestão de CLA e RA podem, atualmente, ser aumentadas pela ingestão de CLA sintético na forma de suplementos disponíveis em lojas especializadas. Estes suplementos também contêm outros isômeros de CLA, além de outros ácidos graxos identificados e não identificados.

As quantidades diárias de CLA na dieta de homens e mulheres de vários países já foram estudadas<sup>15,16</sup>. As estimativas de ingestão de CLA variam de 0,3 a 1,5g/pessoa por dia e parecem depender do sexo e da quantidade de alimentos de origem animal ou vegetal na dieta. Ip *et al.*<sup>17</sup> estimaram que um humano de 70 kg deve consumir 3g CLA/dia para conseguir os efeitos benéficos de inibição do processo de carcinogênese da glândula mamária. Isto corresponde a três vezes mais o teor de CLA da dieta de um americano. Este cálculo foi obtido de estudos com ratos aos quais se forneceu dieta suplementada com CLA a 0,1% da dieta total. Estas quantidades são possíveis de serem adicionadas a alimentos para enriquecê-los com CLA.

O leite humano contém mais CLA que as marcas comerciais de fórmulas infantis, sendo 80% do CLA presente na forma de RA<sup>18</sup>. Devido ao potencial para alterar o crescimento e composição corporal, é importante fortificar fórmulas infantis com CLA. O aumento do consumo de alimentos ricos em RA aumenta as concentrações circulatórias desta substância<sup>19,20</sup>. Além disso, em mulheres lactantes que apresentaram maior consumo de produtos lácteos e cárneos, as concentrações de RA no leite foram maiores quando comparadas as de mulheres que consumiam pequenas quantidades de carne e produtos lácteos<sup>21</sup>, o que confirma a importância da ingestão na concentração de RA no organismo humano.

Há espécies de bactérias que sintetizam CLA a partir de ácido linoléico no intestino humano. Para determinar se as concentrações circulatórias de CLA podem ser alteradas pelo consumo de ácido linoléico, um estudo avaliou, por seis semanas, um molho para salada com óleo e vinagre oferecido aos participantes do estudo para aumentar o consumo de ácido linoléico em 2,5 vezes<sup>22</sup>. Contudo, ao final desta intervenção na dieta, nenhuma mudança na concentração circulatória de CLA foi detectada. Isto sugere que CLA deve estar presente na dieta humana para influenciar sua presença no organismo. Por outro lado, outros autores sugeriram que isômeros *cis*-9, *trans*-11 do CLA são produzidos na glândula mamária através da conversão de ácido vacênico (*trans*-11 18:1) pela ação de  $\Delta$ -9 desaturase<sup>23</sup>.

Uma questão importante é o aumento do teor natural de CLA de produtos lácteos e cárneos ou o aumento do consumo destes produtos. Os dados publicados por Knekt *et al.*<sup>24</sup> mostraram claramente que pequenos aumentos no consumo de leite (por exemplo, duas porções por dia ou o equivalente ao adicional de 55mg/dia de RA) estão associados com o decréscimo no risco de câncer de mama. A publicação “Carcinógenos e Anticarcinógenos na Dieta Humana” da Academia Nacional de Ciências<sup>25</sup> concluiu que “[...] ácido linoléico conjugado (CLA) é o único ácido graxo que mostrou inequivocamente inibir a carcinogênese em animais experimentais”. A descoberta de que CLA pode inibir a carcinogênese foi dirigida, principalmente, por Michael Pariza da Universidade de Wisconsin<sup>9</sup>. Ele inicialmente encontrou um modulador de mutagênese e um mutagênico bacteriano em extratos de cloreto de metileno de carne moída frita<sup>26,27</sup>.

O estudo epidemiológico de Aro *et al.*<sup>28</sup> mostrou que mulheres no período pós menopausa que ingeriam as menores quantidades de CLA em suas dietas apresentavam 3,3 vezes mais riscos de desenvolver câncer de mama do que mulheres com altos teores de CLA na dieta. Este estudo sugere que, pelo menos para câncer de mama, quantidades maiores de CLA na dieta podem ter efeito protetor. Os dados de Ip *et al.*<sup>17</sup>, demonstrando a propriedade anticarcinogênica de RA associados aos dados epidemiológicos de Knekt *et al.*<sup>24</sup> e aos trabalhos iniciais de Pariza<sup>8</sup> com extratos de carne moída frita, sugerem fortemente que os produtos lácteos e cárneos têm capacidade de reduzir câncer de mama e pele. Deste modo, alimentos contendo quantidades significantes de RA deveriam ser considerados alimentos funcionais.

Venkatramanan *et al.*<sup>29</sup> serviram bebidas lácteas enriquecidas com CLA a 11 homens e 7 mulheres entre 30 e 60 anos com sobrepeso moderado e com hiperlipidemia moderada (acima de 2,5nmol/L de colesterol LDL). Foram servidos aos diferentes grupos (1) leite naturalmente enriquecido com 4,2% de CLA (*cis-9,trans-11*), (2) leite adicionado de 4,2% de CLA sintético (mistura dos isômeros *trans-10,cis-12; cis-9,trans-11*) e (3) leite sem adição de CLA. Estes autores concluíram que o leite enriquecido naturalmente com CLA não influenciou no perfil lipídico sanguíneo (colesterol total, LDL e HDL; concentração total de triglicérides) ou na massa corporal destes indivíduos. O estudo, contudo, foi realizado durante oito semanas com um período, entre os tratamentos, de quatro semanas sem o consumo da bebida. Além disso, estes autores colocaram que estratégias efetivas devem ser adotadas para aumentar o teor de CLA nos alimentos sem aumentar os níveis de gordura da dieta. Racine *et al.*<sup>30</sup> estudaram um grupo de 53 crianças entre 6 e 10 anos, sendo que 28 crianças receberam a bebida achocolatada com CLA e 25 consumiram o placebo. As crianças que receberam CLA ingeriram cerca de 3g/dia de uma mistura contendo 80% e CLA presente em uma bebida láctea achocolatada. O estudo foi realizado durante sete meses. Foram fabricadas bebidas lácteas achocolatadas

com 1,4% de gordura em embalagens de 250 gramas. O leite contendo CLA continha 3g de Clarinol (Lipid Nutrition BV, Wormerveer, Holanda) e 2,4 g de CLA por porção. O Clarinol contém 80% de CLA (mistura 50:50 de *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12*). O leite placebo continha 3 gramas de óleo de girassol fornecido pela mesma empresa. A suplementação com CLA foi efetiva na redução do acréscimo de massa gorda e sobre o percentil total de gordura das crianças estudadas. Contudo, houve um decréscimo nos níveis de colesterol HDL (*high density lipoprotein*) e pequena redução no aumento da massa óssea associados a ingestão da suplementação de CLA.

Crumb<sup>31</sup> colocou que o efeito do CLA sobre a massa corporal é um dos mais documentados campos de pesquisa sobre CLA. Segundo ele, isto se deve, provavelmente, a obesidade ser o maior fator de risco para outras doenças como arteriosclerose e diabetes. Contudo, o mecanismo através do qual o CLA induz a redução de massa corporal não está bem esclarecido, permanecendo dúvidas quanto à eficácia da suplementação de CLA em humanos.

Apesar das centenas de pesquisas sobre benefícios a saúde, é difícil de deduzir um mecanismo ou bases moleculares em comum para a ação *in vivo* do CLA<sup>2</sup>. Segundo Benjamin Spener<sup>2</sup> deve-se, ainda, considerar a possibilidade de efeitos negativos associados ao CLA como acúmulo de gordura no fígado e baço, indução de processo de carcinogênese do cólon e hiperproinsulinemia.

Ao se buscar sobre estudos dos benefícios do CLA à saúde humana é possível encontrar muitos artigos. Analisando-os se verificou a importância de todos os dados levantados até o momento. Contudo, há necessidade de realização de mais estudos com grupos maiores de participantes, por períodos maiores de tempo e envolvendo pessoas com e sem sobrepeso ou obesidade.

## 2.2 Fatores que influenciam o teor de CLA no leite

O conteúdo de CLA no leite é afetado por diversos fatores como a raça do animal, idade, lactações, dieta, variação sazonal e regional e processamento do leite. De todos estes fatores, a dieta animal é a que exerce maior influência e pode ser manipulada para a melhoria da concentração de CLA nos alimentos.

Segundo Bonfim *et al.*<sup>8</sup>, as estratégias de manipulação da dieta animal para aumento do teor de CLA do leite podem ser melhor compreendidas comparando o processo de biohidrogenação ruminal a um funil poroso por onde os ácidos graxos insaturados de 18 carbonos que entram no rúmen são convertidos e fluem do funil como ácido graxo esteárico (C18:0). Estas moléculas sofrem reações de isomerização e hidrogenação, produzindo intermediários até a conversão a ácido esteárico. O colo do funil simboliza a limitação de taxa que as enzimas responsáveis por este processo apresentam (*rate-limiting enzymes*). O fluxo metabólico desta rota é determinado por reações limitadas pela quantidade de

substrato. Por outro lado, a porosidade no corpo do funil indica que alguns ácidos graxos C18 insaturados ou seus intermediários podem não ser biohidrogenados. Entre estes intermediários estão o CLA e o ácido vacênico. As estratégias estão em interferir na biohidrogenação e aumentar a quantidade de intermediários antes da conversão a ácido esteárico. A principal estratégia de elevação de CLA na gordura do leite de ruminantes é a saturação do sistema enzimático com substrato (ácidos graxos precursores, especialmente C18:2) pela oferta de dieta rica em óleos vegetais ou contendo ácidos graxos insaturados. Assim, há acúmulo de intermediários (entre eles o CLA e ácido vacênico) que estarão disponíveis para absorção e metabolismo até sua excreção na gordura láctea. Há outras estratégias como o uso de moléculas que agem inibindo ou estimulando micro-organismos ou enzimas associadas à biohidrogenação. Exemplos destas possibilidades são a redução do pH ruminal, o uso de taninos e outros modificadores da fermentação, vitaminas e minerais. Também tem se empregado o uso de misturas de óleos vegetais com moduladores da fermentação ruminal.

O CLA no leite tem mostrado ser um composto estável sob tratamento térmico normal e condições de estocagem. O conteúdo total varia de 0,32 a 3,3% em relação ao teor total de ácidos graxos presentes no leite de vacas Holandesas sob dieta suplementada com pastagens<sup>32</sup>. Stanton *et al.*<sup>33</sup> mostraram que o alto número de lactações leva a alta concentração de CLA na gordura do leite.

A concentração de CLA no leite é dependente da estação. Todos os ruminantes mostram decréscimo dos níveis de CLA durante o inverno, e inversamente um aumento é observado durante o verão, o que está positivamente correlacionado com a disponibilidade de pastagem. Entretanto, pastagens de inverno contêm altas quantidades de PUFA's (polyunsaturated fatty acids), o que leva ao alto grau de biohidrogenação bacteriana no rúmen. O nível de CLA aumenta de 8,4 para 22,7 mg/g de gordura do leite quando aumenta, na dieta do animal, a participação de pastagens<sup>32</sup>.

Jahreis *et al.*<sup>34</sup> conduziram estudos que mostraram a influência de diferentes dietas no conteúdo de CLA no leite. Estes pesquisadores compararam três diferentes tipos de gerenciamento na fazenda aplicando três diferentes métodos de alimentação. Vacas foram alimentadas com silagem de milho durante todo o ano (grupo interno), ou com pastagem no verão e silagem de milho no inverno (grupo convencional) ou com pastagem no verão e silagem de trevo-alfafa-grama no inverno (grupo ecológico). A maior quantidade de CLA no leite foi medida no grupo ecológico, enquanto o menor conteúdo de CLA foi encontrado no grupo de silagem de milho (interno). A aplicação de alimentação ecológica, que está associada a condições ricas de pastagem, resulta na produção de um leite naturalmente com alto CLA. Jones *et al.*<sup>35</sup> também mostraram a influência do enriquecimento da dieta de vacas leiteiras com óleo de peixe e óleo de girassol. O leite produzido por vacas

alimentadas com dietas controle e com dietas contendo óleo de peixe e óleo de girassol apresentou 0,54 e 4,69g de CLA total/100g de ácidos graxos, respectivamente.

Vários experimentos foram conduzidos para aumentar o conteúdo de CLA no leite, pela modulação da dieta das vacas. Chouinard *et al.*<sup>36</sup> verificaram o aumento de três a cinco vezes no teor de CLA de leite de animais com dieta suplementada com óleo de canola, soja e linhaça em relação ao grupo controle. Estes óleos são ricos em PUFA's. Estes autores avaliaram também a influência dos métodos de processamento para produção de soja como suplemento alimentar na dieta de vacas. A ração com soja extrusada e torrada resultou em duas a três vezes maior conteúdo de CLA na gordura do leite, em comparação com uma dieta contendo soja crua. Kelly *et al.*<sup>37</sup> também verificaram aumento nos níveis de CLA no leite de animais alimentados com óleo de girassol, linhaça ou canola<sup>37</sup>.

O uso de ração contendo óleos de peixe com altas quantidades de PUFA's, principalmente ácido eicosapentanoico (EPA) e ácido docosahexanoico (DHA), também resultaram no efeito de aumento de CLA no leite. Este resultado foi verificado por AbuGhazaleh *et al.*<sup>38</sup>, além de outros grupos de pesquisa apontados por Gnädig *et al.*<sup>32</sup>.

A suplementação da dieta com infusão abomasal de CLA foi avaliada como outra possibilidade para enriquecer o leite de vaca com CLA. Baumgard *et al.*<sup>39</sup> observaram que uma infusão com 10g/dia de 10t,12c-18:2 (0,05% de dieta) resultou em redução de 44% na produção de gordura do leite, demonstrando que apenas o 10t,12c-18:2 inibiu a síntese de gordura do leite, enquanto que o 9c,11t-18:2 não apresentou efeito algum. Também foi verificada que a suplementação com CLA reduz a produção de gordura do leite, sugerindo diminuição da síntese de novos ácidos graxos<sup>40,41</sup>. Estudos adicionais são necessários para determinar o mecanismo pelo qual o CLA inibiu a síntese de gordura no leite. Portanto, a aplicação deste método para enriquecer CLA no leite parece não valer a pena devido à desvantajosa redução da gordura do leite, resultando na redução do total de CLA no leite<sup>32,42</sup>.

### 2.3 A influência do processamento no conteúdo de CLA em produtos lácteos

Mundialmente, dentre os alimentos funcionais há grande número de produtos lácteos. Estes produtos podem ter seu teor de CLA elevado por ajustes nas dietas dos animais produtores de leite, por adição de CLA sintético e CLA que pode ser sintetizado a partir de ácido linoléico por algumas linhagens de bifidobactérias e bactérias lácticas. Esta última opção é bastante interessante na produção de leites fermentados com teores elevados de CLA e com baixos teores de gordura láctea, já que o substrato para produção de CLA poderia ser o ácido linoléico proveniente de gordura vegetal. As maiores fontes alimentares de ácido linoléico são óleos vegetais como os de semente de linho, soja e canola.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância

Sanitária) ainda não possui o CLA em sua “Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas” para alimentos<sup>43</sup>. Contudo, há produtos lácteos com elevado teor de CLA em mercados de outros países.

A gordura do leite é a fonte natural mais rica em CLA. Os produtos lácteos apresentam teores consideráveis de isômeros de CLA, como se pode verificar na Tabela 1. O mecanismo de formação de CLA no organismo dos ruminantes ainda não está totalmente esclarecido, mas reações enzimáticas microbianas envolvendo os ácidos linoléico e linolênico no rúmen são os principais fatores<sup>44</sup>.

**Tabela 1:** Concentração de isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA) em produtos lácteos

Amostra	mg CLA/kg alimento	Conteúdo de Gordura (%)	CLA na gordura (mg.kg <sup>-1</sup> )
Queijo Parmesão	622,3 ± 15,0	32,3 ± 0,9	1926,7
Queijo Cheddar	440,6 ± 14,5	32,5 ± 1,7	1355,7
Queijo Romano	356,9 ± 6,3	32,1 ± 0,8	1111,9
Queijo azul	169,3 ± 8,9	30,8 ± 1,5	549,8
Queijo processado	574,1 ± 24,8	31,8 ± 1,1	1805,3
<i>Cream cheese</i>	334,5 ± 13,3	35,5 ± 1,0	942,3
Leite pasteurizado integral	28,3 ± 1,9	4,0 ± 0,3	707,5
Leite cru integral	34,0 ± 1,0	4,1 ± 0,1	829,3

Produtos lácteos contendo ômega-3, fitoesteróis, isoflavonas, CLA, minerais e vitaminas têm papel importante no desenvolvimento de alimentos funcionais. O CLA é encontrado quase que exclusivamente em produtos de origem animal, com nível natural de aproximadamente 6 mg/g de gordura<sup>14</sup>.

Devido o grande potencial de alimentos nutracêuticos e funcionais nos mercados emergentes, as pesquisas relacionadas com CLA têm despertado crescente interesse, especialmente de produtos lácteos integrais com alto teor CLA. Como resultado destes esforços, alguns produtos lácteos com adição de CLA, como alguns iogurtes, têm sido introduzidos no mercado. Lin<sup>45</sup> demonstrou que a adição de 0,1% de ácido linoléico aumentou o conteúdo de *cis9-trans11*-CLA em iogurte desnatado sem afetar as propriedades sensoriais do produto final. Em diversos produtos lácteos com níveis de gordura variando de 0,05 g/100g (leite pasteurizado) a 26,5g/100g (dahi), os teores de CLA foram elevados por culturas lácteas microbianas sem prejudicar as propriedades sensoriais dos produtos<sup>14, 46</sup>.

Pesquisadores têm procurado determinar a influência de tratamentos térmicos (fornearmento, fritura) no conteúdo de CLA para avaliar a sua estabilidade em produtos alimentícios e evitar a redução pela oxidação. Segundo Precht *et al.*<sup>47</sup>, a relação entre o conteúdo de CLA e diferentes parâmetros de fabricação de produtos lácteos é uma área controversa. Estes autores justificaram a escolha das temperaturas de 200 e 225

°C por serem realísticas em processos de fritura e fornearmento, enquanto as temperaturas de 250 e 300 °C foram estudadas para avaliar os efeitos do superaquecimento da gordura. Produtos lácteos como queijos e doce de leite são bastante usados no recheio de outros alimentos posteriormente fritos ou assados. Devido à estrutura química com duplas ligações conjugadas, o CLA parece ser mais susceptível à oxidação ou isomerização durante o tratamento térmico do que o ácido linoléico. Neste estudo os autores observaram que a isomerização e a oxidação do CLA são baixas a 200 °C, mas estes efeitos indesejáveis podem aumentar em temperaturas mais elevadas. O aquecimento a 225 °C por 15 minutos diminuiu o isômero 9*c*,11*t*-18:2 de 1,7% para 1,1% do total de ácidos graxos, e na temperatura de 300 °C houve forte diminuição de 1,7% para 0,35%.

Os processos de aquecimento empregados na fabricação de queijos processados (como o requeijão) demonstraram não ter efeito significativo nos níveis de CLA ou isômeros CLA, exceto em aquecimento por microondas (96°C/5 min), o qual causou redução de 53% dos níveis de CLA no leite<sup>48</sup>. Sobre o aumento do teor de CLA na fabricação de produtos lácteos fermentados, Bisig *et al.*<sup>48</sup> destacaram que os teores de CLA não aumentam em quantidade relevante, além de haver a necessidade de adicionar ácido linoléico, o que pode gerar alteração de sabor. Herzallah *et al.*<sup>49</sup> também observaram que os tratamentos térmicos convencionais (pasteurização em trocador tubular a 85 °C/16s) e estocagem refrigerada de leite e produtos lácteos não causaram mudanças significativas no conteúdo de CLA, com exceção do leite aquecido a 63± 1 °C por 30 minutos e aquecimento em microondas por 5 minutos<sup>49</sup>. Boylston e Beitz<sup>50</sup> relataram que o processamento e a estocagem do iogurte por sete dias não alterou significativamente os teores de CLA e a composição de ácidos graxos.

No estudo de Shantha *et al.*<sup>51</sup>, iogurte desnatado mostrou aumento no teor de CLA com o processamento (5,25 mg total de CLA/g de gordura) em comparação com matéria-prima não processada (4,40 mg CLA/g de gordura). No entanto, durante o armazenamento não foram observadas alterações no conteúdo de CLA em produtos lácteos processados, como iogurte desnatado, iogurte regular, sorvete com pouca gordura e sorvete regular, creme ácido ou queijos como Mussarela, Cheddar e Gouda. O armazenamento não afetou a concentração de CLA em quaisquer dos produtos, sugerindo que o CLA é um componente estável<sup>51</sup>.

Produtos lácteos frequentemente sofrem fermentação microbiana durante o processamento. O uso de diferentes culturas, tratamentos térmicos ou períodos de maturação podem afetar os níveis de CLA no alimento final<sup>32</sup>. Jiang *et al.*<sup>52</sup> relataram a habilidade de espécies de *Propionibacterium* spp. para produzir CLA a partir de ácido linoléico livre. Já Lin *et al.*<sup>53</sup> avaliaram seis espécies de *Lactobacillus* spp. capazes de converter ácido linoléico em CLA, bem como

os efeitos da adição de 1000 e 5000 µg/ácido linoléico por mL. Estes pesquisadores observaram aumento acentuado no nível de CLA quando o ácido linoléico foi adicionado ao meio de cultivo. A incubação do *L. acidophilus* por 24 horas em 1000 µg/mL de ácido linoléico foi o método mais efetivo para promover a formação de CLA. O uso destas linhagens de *Lactobacillus* spp. pode ser uma das formas para o enriquecimento de iogurtes e queijos com CLA, durante a fermentação.

A Tabela 2 mostra os teores de CLA de alguns produtos lácteos fermentados e não fermentados.

**Tabela 2:** Concentração de ácido linoléico conjugado (CLA) em amostras comerciais de produtos lácteos fermentados e não fermentados

Amostra	(mg CLA / g gordura leite)	Cultura
Leite integral (% gordura)		
3,2	4,49	-
3,0	5,88	-
1,9	4,14	-
1,5	5,83	-
Buttermilk	4,66	<i>Lactococcus</i> spp.
Mellafil	6,07	<i>Lactococcus</i> spp.
Bifilus	4,47	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Dofilus	5,16	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Halsofil	5,24	<i>Lactococcus</i> spp.

Investigações recentes com bactérias probióticas (como *Lb. rhamnosus* ou *Lactobacillus acidophilus*, e propionibactéria e bifidobactérias, como *Bifidobacterium breve*) ou outras espécies deste grupo de bactérias mostraram, em escala laboratorial, um aumento nos teores de CLA sob condições onde o ácido linoléico livre (LA) estava disponível no meio de cultura. Taxas de conversão chegaram a 87% com *Propionibacteria freudenreichii* ssp. *shermanii*<sup>13</sup>. Maior conteúdo de CLA em leite fermentado usando *Lb. rhamnosus* sozinho ou em co-cultura com culturas tradicionais de iogurte também foi verificado<sup>49</sup>. Estes autores adicionaram óleo de soja hidrolisado ao leite como fonte lipídica, e o conteúdo de CLA 18:2 *cis*9, *trans*11 atingiu 0,97 mg/g lipídios com emprego de *Lb. rhamnosus* em co-cultura, após 14 dias de estocagem, o que foi significativamente maior do que os níveis de CLA em leite fermentado feito com a cultura padrão de iogurte (0,57 mg/g lipídios).

Segundo Coakley *et al.*<sup>55</sup>, algumas espécies de bactérias probióticas sintetizam CLA. Das espécies estudadas, nove espécies de *Bifidobacterium* produziram o isômero *cis* 9, *trans* 11 do CLA a partir de ácido linoléico. A produção de CLA por bifidobactérias exhibe considerável variação entre as espécies. *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium dentium* foram as que mais eficientemente produziram CLA entre

as espécies avaliadas, com *B. breve* convertendo acima de 65% de ácido linoléico no isômero *c9, t11* do CLA, em meio contendo 0,55 mg/mL de ácido linoléico. As espécies também variaram consideravelmente quanto a sua sensibilidade ao ácido linoléico.

A produção de CLA por bifidobactérias probióticas proporciona amplas oportunidades de desenvolvimento de alimentos funcionais, em especial entre os leites fermentados. Nestes produtos, há a associação dos benefícios do CLA à saúde e dos probióticos. Os probióticos são definidos como adjuntos dietéticos microbianos que afetam benéficamente a fisiologia do hospedeiro pela regulação da imunidade local e sistêmica e pela melhora do balanço nutricional e microbiano no trato intestinal<sup>56</sup>. Há vários benefícios à saúde associados aos probióticos, tais como o controle da microbiota intestinal no indivíduo saudável e estabilização após o uso de antibióticos; promoção da resistência à colonização por patógenos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas, auxílio no controle e prevenção de dislipidemias, entre outros<sup>57</sup>.

Outro aspecto relacionado à ação do CLA e dos probióticos é que a gordura láctea, embora contenha CLA, contém colesterol. Pode ser interessante desenvolver produtos lácteos com reduzido teor de gordura láctea, mas que tenham sido adicionados de óleos vegetais ricos em ácido linoléico que é convertido, por algumas espécies de probióticos, em CLA.

Uma vez que o processamento de queijos também envolve fermentação bacteriana, alguns estudos têm sido conduzidos visando observar a síntese do CLA pelas bactérias neste tipo de produto, bem como o efeito das etapas de processo na manutenção do teor de CLA. Lin *et al.*<sup>58</sup> estudaram os efeitos do tipo de embalagem (latas e sacos de nylon), pH da massa durante o corte (5,5, 5,7, e 5,9), aditivos (hidroxianisol butilado (BHA), tirosina, lisina) e maturação (0, 1, 3 e 6 meses) sobre o conteúdo de ácido linoleico conjugado (CLA) em queijo Cheddar. O teor de CLA no queijo processado (ou queijo fundido) enlatado (3,03 mg/g de lipídios) foi significativamente mais elevado do que em um queijo envasado em embalagens de nylon a vácuo (2,70 mg/g de lipídios) após seis meses de maturação. Nos queijos com pH da massa de 5,5 e 5,9 durante o corte e contendo BHA, tirosina e lisina verificou-se teores significativamente mais baixos de CLA (2,19 mg de CLA/g gordura) após seis meses, em comparação com o queijo controle (2,70 mg de CLA/g gordura).

Em outro estudo, Lin *et al.*<sup>59</sup> verificaram o efeito da composição do fermento e do processamento sobre o conteúdo de CLA em queijo Cheddar e queijos semelhantes ao Cheddar (Cougar Gold® e Viking). Estes dois queijos são adicionadas de culturas adjuntas que não são empregadas no Cheddar tradicional. O queijo Cheddar estudado foi fabricado com fermento contendo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus*

*lactis* ssp. *cremoris*. O queijo Cougar Gold® continha, além destes dois micro-organismos, o *Lactobacillus helveticus*. O queijo Viking, por sua vez, além dos três micro-organismos já citados era adicionado de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Amostras em nove fases do processamento, desde leite cru até o queijo após seis meses de armazenamento foram avaliadas. O teor de CLA variou de 3,28 até 3,76mg/g de lipídios, considerando todas as etapas de processamento e estocagem. O conteúdo de CLA foi maior após três meses para o queijo Cheddar tradicional, que apresentou 3,76 mg de CLA/g de lipídios, em comparação com o Cougar Gold® e o Viking contendo 3,44 e 3,47 mg de CLA/g de lipídios, respectivamente. Todos os parâmetros de composição foram diretamente relacionados com o conteúdo de CLA (mg/100 g de amostra). Assim, o conteúdo de CLA nestes queijos pode ser controlado pelo estágio e condições de processamento. Foram encontradas pequenas diferenças no conteúdo de CLA das diferentes variedades de queijo tipo Cheddar avaliadas<sup>59</sup>.

Vários estudos têm sido empreendidos para determinar o conteúdo de CLA em queijos fundidos usando diferentes condições de processamento. Ensaio comparando processamentos destes queijos sob condições atmosféricas e inertes (nitrogênio) mostraram que o processamento sob condições atmosféricas em temperaturas de 80-90 °C por 10 minutos pode levar ao aumento do conteúdo de CLA no produto. Este efeito foi ampliado pela adição de proteínas de soro como um doador de hidrogênio ou de antioxidantes como o butilhidroxitolueno (BHT). O uso de ascorbato de Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> como aditivo parece ser útil para aumentar o nível de CLA<sup>60,61</sup>. Altas concentrações de CLA foram encontradas em produtos lácteos tratados termicamente, especialmente queijo processado. Alguns autores sugeriram que proteínas do soro catalisam a isomerização<sup>43</sup>.

A relação entre antioxidantes e doadores de hidrogênio com o teor de CLA pode estar ligada ao alimento e a apresentação dos ácidos graxos na matriz alimentar. No entanto, as mudanças no conteúdo de CLA, relatadas durante o processamento, são muito menos importantes do que as diferenças sazonais no leite. Assim, o conteúdo de CLA nos alimentos processados depende muito do teor de CLA no leite original<sup>32</sup>.

Jiang *et al.*<sup>62</sup> verificaram concentrações de CLA variando de 5,01 a 7,06 mg g<sup>-1</sup> de gordura em amostras de queijos duros comerciais (com 4 a 10 meses de fabricação). Além disso, o processamento e o tempo de maturação não alteraram a concentração de CLA nos queijos duros obtidos de forma experimental. As variações na concentração de CLA em produtos lácteos são pequenas quando comparadas com a grande variação em leite não processado. Por outro lado, a estabilidade do CLA durante a estocagem é importante sob o ponto de vista nutricional, uma vez que esta substância biologicamente ativa pode ser obtida a partir de dieta.

Muito interessante é o estudo de Campbell *et al.*<sup>63</sup> de

fortificação de leite por adição de “óleo de CLA” produzido a partir de óleo de girassol com teor de CLA aumentado por via enzimática. Estes pesquisadores avaliaram os efeitos da adição de CLA nas características sensoriais, químicas e físicas de leite fluido com teor de gordura de 2%. Lotes de leite com 2% de gordura total (2% CLA, 1% CLA: 1% gordura láctea, 2% gordura láctea) foram obtidos pela adição de creme ou “óleo contendo CLA” em leite desnatado pasteurizado e homogeneizado. A análise sensorial descritiva revelou que os leites com 1 e 2% de CLA apresentaram baixa intensidade de sabor a “óleo vegetal”. Não foram verificadas diferenças na viscosidade entre os leites. As pontuações sensoriais quanto a aceitação foram menores para os leites fortificados com CLA quando comparados com os leites controle mas a adição de uma mistura de cacau em pó aumentou a aceitabilidade.

### 3 Conclusão

Há diversos benefícios à saúde associados à ingestão de CLA. Os vários estudos realizados para verificar estes benefícios acabaram reforçando a importância dos produtos lácteos na dieta como fonte de CLA. Contudo, há necessidade de realização de mais estudos com seres humanos, envolvendo maior número de participantes com e sem comorbidades e em intervalos de ingestão de CLA maiores.

Embora este grupo de substâncias ainda não esteja previsto na “Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas” pela legislação brasileira (ANVISA), futuramente sua inclusão poderá acontecer, o que oferecerá oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos lácteos funcionais.

Diversas pesquisas mostraram que existem espécies de lactobacilos, bifidobactérias e propionibactérias que são capazes de converter eficientemente o ácido linoléico em CLA. No entanto, pesquisas relacionadas a iogurte e queijo não apresentaram elevados níveis de CLA, possivelmente porque esses produtos lácteos não foram fabricados com espécies de bactérias lácticas específicas produtoras de CLA. Além disso, a origem do leite, a variação sazonal de produção, além das condições de processamento e maturação podem influenciar o teor de CLA nos queijos.

Uma das vias mais acessíveis para aumento dos níveis de CLA do leite e produtos lácteos é a manipulação da dieta de ruminantes e, em menor grau, a fabricação de produtos lácteos fermentados com culturas selecionadas que apresentem um elevado potencial para produzir CLA.

Com base nos dados disponíveis até o presente, verifica-se que o aumento de CLA por fermentações bacterianas em queijos e outros alimentos lácteos fermentados é relativamente menor em comparação com outros métodos, como a adição de CLA. Em relação às etapas de fabricação e a estocagem dos produtos lácteos, os processos térmicos convencionais e a estocagem refrigerada parecem não afetar ou diminuir o conteúdo de CLA.

Um modo promissor de aumentar o teor de CLA no leite

é a adição deste grupo de compostos (como o caso citado de adição de Clarinol, mistura 50:50 de *cis*-9,*trans*-11 e *trans*-10,*cis*-12). Contudo, para que haja aceitação pelos consumidores, sabores como chocolate ou morango podem ser adicionados. Este grupo de pesquisa avalia este modo de aumento do teor de CLA em produtos lácteos como um área ainda pouco explorada para formulação de novos produtos.

## Referências

- Campos TBF. A suplementação crônica com ácido linoléico conjugado promove redução da massa adiposa e compromete a sensibilidade à insulina no tecido adiposo branco periepidual. São Paulo: USP; 2007.
- Benjamin S, Spener F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metabol* 2009;6(1):36-49.
- Watkins BA, Li Y. CLA in functional food: enrichment of animal products. In: Sebedio JL, Christie WW, Adlof RO. *Advances in conjugated linoleic acid research*. USA: AOAC; 2003. p.2.
- Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research* 2001;40(4):283-98
- Kim YS, Young MR, Bobe G, Colburn NH, Milner JA. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. *Cancer Prev Res* 2009;2(3):200-8.
- Christie WW. Analysis of conjugated linolenic acid: an overview In: Sebedio JL, Christie WW, Adlof RO. *Advances in conjugated linoleic acid research*. USA: AOAC; 2003.
- Parodi PW. Conjugated linolenic acid in food. In: Sebedio JL, Christie WW, Adlof RO. *Advances in conjugated linoleic acid research*. USA: AOAC; 2003.
- Bomfim MAD, Queiroga RCE, Aguila MB, Medeiros MC, Fisberg M, Rodrigues MT, *et al.* Abordagem multidisciplinar de P,D&I para o desenvolvimento de produto lácteo caprino com alto teor de CLA e alegação de propriedade funcional. *Rev Bras Zootec* 2011;40(1):98-106.
- McGuire, MA, McGuire, MK. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *J Animal Sci* 2000;77:1-8.
- Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 1992;5(3):185-97.
- McGuire MK, McGuire MA, Ritzenthaler K, Shultz TD. Dietary sources and intakes of conjugated linoleic acid intake in humans. In: Yurawecz MP, Mossoba MM, Pariza MW, Nelson GJ. *Advances in conjugated linoleic acid research*. USA: AOCS; 1999, p.1.
- Sehat N, Kramer JKG, Mossoba MM, Yurawecz MP, Roach JAG, Eulitz K, *et al.* Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles: Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 1998;33(10):963-71.
- Yurawecz MP, Roach JAG, Sehat N, Mossoba MM, Kramer JKG, Fritsche J, *et al.* A new conjugated linoleic acid isomer, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 1998;33(8):803-9.
- Özer BH, Kirmaci HA. Functional milks and dairy beverages. *Int J Dairy Tech* 2010;63(1):1-15.
- Parodi PW. Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Australian J Dairy Tech* 1994 49(2):93-7
- Jiang J, Wolk A, Vessby B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 1999;70(1):21-7.
- Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, McGinley J, Thompson HJ, *et al.* Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J Nut* 1999;129(12):2135-42.
- McGuire MK, Park YS, Behre RA, Harrison LY, Shultz TD, McGuire, MA. Conjugated linoleic acid concentrations of human milk and infant formula. *Nutr Res* 1997;17(8):1277-83.
- Britton M, Fong C, Wickens D, Yudkin J. Diet as a source of phospholipid esterified 9,11-octadecadienoic acid in humans. *Clin Sci* 1992;83(1):97-101.
- Huang YC, Luedecke LO, Shultz TD. Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid concentrations in men. *Nut Res* 1994;14(3):373-86.
- Park Y, McGuire MK, Behre R, McGuire MA, Evans MA, Shultz TD. High fat dairy product consumption increases  $\Delta$ 9c,11t-18:2 (rumenic acid) and total lipid concentrations of human milk. *Lipids* 1999;34(6):543-9.
- Herbel BK, McGuire MK, McGuire MA, Shultz TD. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;67(2):332-37.
- Santora, JE, Palmquist, DL, Roehrig, KL. Transvaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *J Nutr* 2000;130(2):208-15.
- Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Pukkala E, Aromaa A. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Brit J Cancer* 1996;73(5):687-91.
- NRC. *Carcinogens and anticarcinogens in the human diet*. Washington: National Academy; 1996.
- Pariza PW, Loretz LJ, Storkson JM, Holland NC. Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. *Cancer Res* 1983;43(5):2444s-6s.
- Pariza PW, Ashoor SH, Chu FS, Lund DB. Effects of temperature and time on mutagen formation in panfried hamburger. *Cancer Let* 1979;7(2/3):63-9.
- Aro A, Mannisto S, Salminen I, Ovaskainen ML, Kataja V, Uusitupa M. Inverse association between dietary and serum conjugated linolenic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer* 2000;38(2):151-7.
- Venkatramanan S, Joseph SV, Chouinard PY, Jacques H, Farnworth ER, Jones PJH. Milk enriched with conjugated linoleic acid fails to alter blood lipids or body composition in moderately overweight, borderline hyperlipidemic individuals. *J Am College Nut* 2010;29(2):152-9.
- Racine NM, Watras AC, Carrel AL, Allen DB, McVean JJ, Clark RR, *et al.* Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *Am J Clin Nutr* 2010;91(5):1157-64.
- Crumb DJ. Conjugated Linoleic Acid (CLA)-an overview. *Int J Appl Res Natal Prod* 2011;4(3):12-8.
- Gnädig S, Xué Y, Berdeaux O, Chardigny JM, Sebedio JL. Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional ingredient. In: Mattila-Sandholm T, Saarela M. *Funcional dairy products*. USA: CCR; 2003.
- Stanton C, Lawless F, Kjellmer G, Harrington D, Devery R,

- Connolly JF, *et al.* Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated-linoleic acid content, *J Food Sci* 1997;62(5):1083-6.
34. Jahreis G, Fritsche J, Steinhart H. Monthly variation of milk composition with special regard to fatty acids depending on season and farm management systems: conventional versus ecological, *Europ J Lipid Sci Tech* 1996;98(11):356-9.
35. Jones EL, Shingfield KJ, Kohen C, Jones AK, Lupoli B, Grandison AS, *et al.* Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci* 2005;88(8):2923-37
36. Chouinard PY, Corneau L, Butler WR, Chilliard Y, Drackley JK, Bauman DE. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci* 2001;84(3):680-90.
37. Kelly M, Berry JR, Dwyer DA, Griinari JM, Chouinard PY, Vanamburgh ME, *et al.* Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nut* 1998;128(5):881-5.
38. AbuGhazaleh AA, Schingoethe DJ, Hippen AR, Kalscheur KF. Conjugated linoleic acid increases in milk when cows fed fish meal and extruded soybeans for an extended period of time. *J Dairy Sci* 2004;87(6):1758-66.
39. Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebo A, Bauman DE. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000;278(1):179-84.
40. Looor JJ, Herbein JH. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J Nutr* 1998;128(12):2411-9.
41. Baumgard LH, Sangster JK, Bauman DE. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J Nutr* 2001;131(6):1764-9.
42. Chouinard PY, Corneau L, Saebo A, Bauman DE. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J Dairy Sci* 1999;82(12):2737-45.
43. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas 2008. [acesso em 8 fev. 2012]. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm).
44. Fox PF, McSweeney PLH. Dairy chemistry and biochemistry. London: Blackie Academic & Professional; 1998.
45. Lin TY. Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructooligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. *Aust J Dairy Technol* 2003;58(1):11-4.
46. Sieber R, Collomba M, Aeschlimanna A, Jelenb P, Eyera H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products: review. *Int Dairy J* 2004;14:1-15.
47. Precht D, Molkenin J, Vahlendieck M. Influence of the heating temperature on the fat composition of milk fat with emphasis on *cis*-/*trans*-isomerization. *Nahrung* 1999;43(1):25-33.
48. Bisig W, Eberhard P, Collomb M, Rehberger B. Influence of processing on the fatty acid composition and the content of conjugated linoleic acid in organic and conventional dairy products-a review. *Lait* 2007;87(1):1-19.
49. Herzallah SM, Humeid MA, Al-Ismail KM. Effect of heating and processing methods of milk and dairy products on conjugated linoleic acid and trans fatty acid isomer content. *J Dairy Sci* 2005;88(4):1301-10.
50. Boylston TD, Beitz DC. Conjugated Linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *J Food Sci* 2002;67(5):1973-8.
51. Shantha NC, Ram LN, O'Leary J, Hicks CL, Decker EA. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *J Food Sci* 1995;60(4):695-7.
52. Jiang J, Björck L, Fondén R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J Appl Microb* 1998;85(1):95-102.
53. Lin TY, Lin CW, Lee CH. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem* 1999;67(1):1-5.
54. Xu S, Boylston TD, Glatz BA. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *J Agric Food Chem* 2005;53(23):9064-72.
55. Coakley M, Ross RP, Nordgren M, Fitzgerald G, Devery R, Stanton C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J Appl Microb* 2002;94(1):138-45.
56. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infec Diseases* 2008;46(2):58-61.
57. Hord NG. Eukaryotic-microbiota crosstalk: potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics. *Ann Rev Nut* 2008;28:215-31.
58. Lin H, Boylston TD, Luedecke LO, Shultz TD. Factors affecting the conjugated linoleic acid content of cheddar cheese. *J Agric Food Chem* 1998;46(3):801-7.
59. Lin H, Boylston TD, Luedecke LO, Shultz. Conjugated linoleic acid content of Cheddar-type Cheeses as Affected by Processing. *J Food Sci* 1999;64(5):874-8.
60. Shantha NC, Decker EA, Ustunol Z. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *J Am Oil Chem Soc* 1992;69(5):425-8.
61. Shantha NC, Decker EA. Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese containing hydrogen donors, iron and dairy-based additives. *J Am Oil Chem Soc* 1992;69(5):425-8.
62. Jiang J, Björck L, Fonden R. Conjugated linoleic acid in Swedish Dairy Products with special reference to the manufacture of hard cheeses. *Int Dairy J* 1997;7(12):863-7.
63. Campbell W, Drake MA, Larick DK. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (cla) on the quality of fluid milk. *J Dairy Sci* 2003;86(1):43-51.

