

Amanda Della Giustina

**EFEITO DOS ÓLEOS DE COCO E CÁRTAMO NA  
ADIPOSIDADE ABDOMINAL E PERFIL LIPÍDICO DE RATAS  
REALIMENTADAS COM FRUTOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, Dra.

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

A large empty rectangular box with a thin black border, occupying the lower half of the page. It is positioned centrally below the text and appears to be a placeholder for a barcode or other identifying information.

Amanda Della Giustina

**EFEITO DOS ÓLEOS DE COCO E CÁRTAMO NA  
ADIPOSIDADE ABDOMINAL E PERFIL LIPÍDICO DE RATAS  
REALIMENTADAS COM FRUTOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em: \_\_\_/ \_\_\_/ \_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, Dra. – Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Helio Vannucchi, Dr.  
Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

---

Edson Luiz da Silva, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Sandra Regina Paulon Avancini, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Gerson Luis Faccin, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



## **DEDICATÓRIA**

À minha família.  
Constantes incentivadores e meu porto seguro.



## AGRADECIMENTOS

A **Deus**. Fé em Ti sempre.

À **minha família** pelo amor, paciência, companheirismo e carinho. Presente para compartilhar as vitórias e os momentos difíceis.

À minha orientadora, **Prof<sup>ª</sup> Dra. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte**. Sempre lembrarei o seu acolhimento, a oportunidade que deu a uma completa desconhecida. Agradeço a confiança em meu trabalho, o respeito como profissional e o apoio nos momentos necessários.

Ao **Gerson**. Excelente profissional, sempre disposto a repassar o seu conhecimento. Agradeço pelas contribuições, pela disponibilidade e participação nos experimentos.

Aos **amigos** pelos bons momentos de alegria e descontração, apoio e incentivo.

Aos **amigos do mestrado**, partilhar destes momentos com vocês fez tudo ser mais fácil.

Aos **graduandos** Livia, Jandir, Iana, Amanda Donini, Taís, Andressa e Marcos e a todos do Laboratório de Pesquisa em Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose/UFSC, agradeço o auxílio nos experimentos e análises.

À amiga **Lilian**, agradeço de coração a sua amizade. Em todos os momentos que necessitei de ajuda, você estava lá. Admiro a sua personalidade e seu profissionalismo.

Ao **PPGN**, pelo apoio institucional. Aos professores, agradeço pelo conhecimento e contribuições. À Candice, agradeço pela atenção.

Ao **Programa de Bolsas Demanda Social (CAPES)**. Agradeço pelo período de bolsa concedida.

À todos que contribuíram para a realização deste estudo.





*"There is no passion to be found playing small - in settling for a life that is less than the one you are capable of living."*

Nelson Mandela



## RESUMO

Alterações no metabolismo dos ácidos graxos podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento de complicações metabólicas. A frutose tem sido relacionada com alterações no perfil lipídico, acúmulo de gordura hepática e no tecido adiposo, sendo utilizada como modelo para induzir esteatose hepática em animais. Alguns óleos vêm sendo consumidos a fim de reduzir gordura abdominal e melhorar o perfil lipídico. Este estudo objetivou investigar o efeito dos óleos de coco e de cártamo na adiposidade abdominal, na glicemia e em parâmetros lipídicos de ratas realimentadas com frutose após jejum. Foram utilizadas 48 ratas *Wistar* adultas, mantidas em gaiolas individuais e distribuídas em seis grupos de oito animais: Controle-C, Soja-F, Óleo de Coco 1-Co1, Óleo de Coco 2-Co2, Óleo de Cártamo 1-Ca1 e Óleo de Cártamo 2-Ca2. O experimento totalizou 17 dias. Após adaptados por sete dias, os grupos receberam por sete dias dieta com óleo teste como fonte lipídica, permaneceram em jejum durante 48 horas e foram realimentados com dieta contendo frutose por 24 horas. Os grupos Co2 e Ca2 receberam dieta com seu óleo teste na intervenção e realimentação. Usou-se dieta AIN-93G com modificações. Ao final, realizou-se a eutanásia e foram coletadas amostras de sangue e órgãos para as determinações bioquímicas. O fígado, coração, rim e tecido adiposo retroperitoneal foram pesados para comparação entre grupos. Foram realizados os homogenatos hepático e cardíaco para a determinar os parâmetros lipídicos. Os dados foram analisados no software *GraphPad Instat 3.0*, sendo significativo o valor de  $p < 0,05$ . Utilizou-se o ANOVA e pós-teste de Tukey ou Kruskal-wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos. Não houve alteração plasmática. No fígado, o óleo de coco aumentou as concentrações de triglicerídeos e reduziu colesterol e não HDL-c. No coração, o óleo de cártamo elevou as concentrações de triglicerídeos, colesterol e não HDL-c. Não houve alteração no peso de tecido adiposo e órgãos.

**Palavras-chave:** óleo de coco, óleo de cártamo, adiposidade abdominal, metabolismo lipídico, frutose.



## ABSTRACT

Changes in fatty acid metabolism may play an important role in the development of metabolic complications. Fructose has been associated with changes in lipid profile, liver and adipose tissue fat accumulation, so it is used for development of hepatic steatosis in animal models. Some oils have been consumed to reduce abdominal fat and improve the lipid profile. The aim of this study was to investigate the effect of coconut and safflower oil on abdominal adiposity, glucose and lipid profile in rats fructose-refed after fasting. 48 female Wistar rats were housed in individual cages and randomly distributed in six groups: Control-C, Soybean Oil-S, Coconut Oil 1-Co1, Coconut Oil 2-Co2, Safflower Oil 1-Ca1 and Safflower Oil 2-Ca2. The experiment lasted 17 days. After six day in an adaptation period, the groups received during a week coconut or safflower oil diet as a lipid source. Then, they were fasted for 48 hours and refed with a fructose rich diet for 24 hours. The Co2 and Ca2 groups received diet with its oil test before and after refeeding. All diets were prepared according to AIN-93G recommendations. After 17 days, the animals were euthanized and blood samples were collected for biochemical analyzes. The liver, heart, kidney and retroperitoneal adipose tissue were weighed for comparison between groups. The liver and heart were homogenates and lipid profile was performed. Data were analyzed with GraphPad Instat 3.0 software, considering statistically significant p value <0.05. ANOVA with Tukey post-test or Kruskal-wallis with Dunn post-test were used for comparison between groups. There was no plasma change. In the liver, coconut oil increased the concentrations of triglycerides and reduced cholesterol and non-HDL-c. In the heart, safflower oil increased concentrations of triglycerides, cholesterol and non-HDL-c. No changes were observed in weight of adipose tissue and organs.

**Keywords:** coconut oil, safflower oil, abdominal adiposity, lipid metabolism, fructose.



## LISTA DE FIGURAS

### **DISSERTAÇÃO**

**Figura 1** – Protocolo experimental..... 29

### **ARTIGO**

**Figura 1** – Protocolo experimental..... 41





## LISTA DE TABELAS

### DISSERTAÇÃO

<b>Tabela 1</b> - Substituições dietéticas nos diferentes períodos e grupos experimentais.....	33
--	----

### ARTIGO

<b>Tabela 1</b> – Efeito dos óleos testes sobre a variação de peso corporal (g) e o consumo alimentar (g) de ratas <i>Wistar</i> realimentadas após jejum.....	44
--	----

<b>Tabela 2</b> – Efeito dos óleos testes sobre os parâmetros plasmáticos de ratas <i>Wistar</i> realimentadas após jejum.....	46
--	----

<b>Tabela 3</b> – Efeito dos óleos teste sobre os parâmetros hepáticos de ratas <i>Wistar</i> realimentadas após jejum.....	47
---	----

<b>Tabela 4</b> – Efeito dos óleos testes sobre os parâmetros cardíacos de ratas <i>Wistar</i> realimentadas após jejum.....	48
--	----

<b>Tabela 5</b> – Efeito dos óleos testes no peso absoluto (g) do tecido adiposo, fígado, coração e rim de ratas <i>Wistar</i> realimentadas após jejum.....	49
--	----

/



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Composição das rações dos grupos experimentais no período de adaptação.....	31
<b>Quadro 2</b> – Composição das rações dos grupos experimentais na fase de intervenção e realimentação com óleo de coco ou cártamo...	32



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL - Ácidos Graxos Livres  
QM – Quilomícron  
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade  
IDL - lipoproteína de densidade intermediária  
*LDL* - lipoproteína de baixa densidade  
*HDL* - lipoproteína de alta densidade  
*HDL-c* - *High Density Lipoprotein*-colesterol  
LPL - lipoproteína lipase  
LRP - *LDL receptor-related*  
ATGL - lipase dos triglicerídeos do adipócito  
LSH - lipase hormônio-sensível  
ATP – adenosina trifosfato  
L-PK – Piruvato quinase  
ACC - acetil-CoA carboxilase  
FAZ - ácido graxo sintase  
SREBP-1c - proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol-1c  
ChREBP - proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidrato  
ChoRE - *carbohydrate responsive element*  
RBD - *refining, bleaching, and deodorizing*  
PNO - *Philippine National Standards*  
AGCM – ácido graxo de cadeia média  
AGCC – ácido graxo de cadeia curta  
CPT-1 - carnitina palmitoiltransferase-1  
PPAR $\alpha$  - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa  
AA – ácido araquidônico  
COX - ciclooxigenase  
PGI<sub>2</sub>, - prostaglandina I<sub>2</sub>  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
mRNA – RNA mensageiro  
PBS – tampão salino fosfato  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
BSA – albumina sérica bovina  
CCB – Azul de comassie



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	27
2.1	METABOLISMO LIPÍDICO.....	27
2.1.1	<b>Esteatose hepática não-alcoólica</b> .....	29
2.1.2	<b>Frutose e indução de esteatose hepática não-alcoólica</b> .....	31
2.1.3	<b>Adiposidade abdominal</b> .....	3333
2.2	<b>ÓLEOS E GORDURAS</b> .....	33
2.2.1	<b>Óleo de Coco</b> .....	34
2.2.1.1	Mecanismos de ação.....	35
2.2.2	<b>Óleo de Cártamo</b> .....	36
2.2.2.1	Mecanismos de ação.....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	41
4.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	41
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	41
4.3	ENSAIO BIOLÓGICO.....	41
4.3.1	<b>Animais e Grupos Experimentais</b> .....	41
4.3.2	<b>Rações Experimentais</b> .....	42
4.3.3	<b>Eutanásia e coleta de amostras</b> .....	45
4.4	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	45
4.5	DETERMINAÇÕES HEPÁTICAS E CARDÍACAS.....	45
4.5.1	<b>Preparação de homogenato tecidual</b> .....	45
4.5.2	<b>Extração e determinação de lipídeos teciduais</b> .....	45
4.5.3	<b>Determinação e normatização por proteínas teciduais</b> .....	46
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	46
<b>5</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL</b> .....	47
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
1		
	<b>ANEXOS</b> .....	67





# 1 INTRODUÇÃO

A prevalência de sobrepeso e obesidade tem aumentado de forma preocupante e tornou-se um dos principais problemas de saúde pública da sociedade moderna devido à sua proporção epidêmica (BARROSO; ABREU; FRANCISCHETTI, 2002; PRENTICE, 2006). O desequilíbrio entre a ingestão de nutrientes e o gasto energético revela-se uma importante causa de excesso de peso, ocasionando diversas alterações metabólicas (DIAS, 2009).

Os lipídeos apresentam elevado valor calórico e o seu consumo excessivo contribui expressivamente para o desenvolvimento de excesso de peso e acúmulo de gordura corporal. Ademais, a íntima relação entre este acúmulo de gordura no tecido adiposo, principalmente depositado na região abdominal, e complicações cardiovasculares, dislipidemias, resistência à ação da insulina e o diabetes mellitus tipo 2 tem sido apontada por diversos autores (LERARIO et al., 2002; RIBEIRO FILHO et al., 2006).

Entretanto, estudos recentes têm chamado atenção ao perfil de ácidos graxos na gordura da dieta, uma vez que ácidos graxos monoinsaturados  $\omega$ -9, bem como poliinsaturados  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 podem apresentar vários efeitos benéficos no tratamento ou prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis e suas comorbidades, particularmente, a adequada proporção na dieta – em torno de 2:1 a 4:1 de  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, respectivamente (MARTIN et al., 2006; HIRATSUKA et al., 2008). Desta maneira, alimentos e suplementos nutricionais utilizando ácidos graxos têm sido os alvos da indústria e da mídia não especializada, incentivando o consumo de produtos os quais, possivelmente, modificariam o balanço entre a lipogênese e a oxidação lipídica e, assim, poderiam reduzir ou reverter os efeitos negativos ocasionados pela adiposidade abdominal. Dentre os produtos do gênero disponíveis à comercialização, podemos citar como exemplos os óleos de cártamo e coco.

O óleo de cártamo é extraído das sementes da planta *Carthamus tinctorius L.* e apresenta em sua composição principalmente ácido linoléico ( $\omega$ -6), além do ácido oléico ( $\omega$ -9) (COŞGE; GÜRBÜZ; KIRALAN, 2007; TONGUÇ et al., 2012). O óleo de coco é obtido a partir da prensagem do fruto da espécie *Cocos nucifera L.* e tem como composto principal o ácido láurico – um ácido graxo de cadeia média (LIAU et al., 2011; ZAKARIA et al., 2011).

Devido aos possíveis efeitos na saciedade, aumento da taxa metabólica basal, redução do peso corporal e, principalmente, da adiposidade abdominal, a procura por estes óleos cresceu e o apelo de marketing tem favorecido o consumo de tais produtos, com foco no público obeso e prometendo emagrecimento rápido e saudável (DWYER; ALLISON; COATES, 2005). Contudo, estudos científicos apresentam resultados controversos e os mecanismos de ação, principalmente em organismos sob alterações metabólicas, continuam incertos, necessitando de modelos mais próximos à realidade da população que consome estes alimentos (CASTRO et al., 2011).

Dentre os modelos experimentais para estudo do metabolismo lipídico, existem protocolos que utilizam animais com modificações genéticas e os modelos dietéticos. A adoção de modelos alimentares com elevado conteúdo de carboidratos refinados, em particular, a frutose, parece eficaz em promover alterações metabólicas decorrentes da adiposidade excessiva (FAN; QIAO, 2009). Esta situação acontece em virtude da frutose não requerer insulina para sua absorção e, assim ela pode ser captada por transportadores específicos localizados no intestino e no fígado. Neste órgão, sofrerá a metabolização a frutose 1-fosfato, com posterior conversão e redução a glicerol 3-fosfato – precursor da síntese de triglicerídeos. Sendo assim, este carboidrato estimula a lipogênese e o acúmulo de triglicerídeos nos tecidos adiposo e hepático (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005).

O estado de restrição e realimentação também apresenta resultados interessantes quando aplicado com o intuito de se avaliar o metabolismo lipídico em função das alterações decorrentes da lipólise e lipogênese. Modificações na disponibilidade de nutrientes exigem adaptações hormonais e metabólicas a fim de garantir a manutenção da homeostase energética (PALOU et al., 2008), assim, a oferta aguda de elevadas quantidades de frutose na alimentação de ratos mantidos em jejum implica em mudanças metabólicas e acarreta em acúmulo de triglicerídeos no fígado, bem como no tecido adiposo (CASTRO et al., 2011).

Tendo em vista a existência de um modelo experimental capaz de reproduzir, em curto prazo, alterações metabólicas decorrentes do consumo dietético, bem como a carência de evidências científicas que comprovem os efeitos positivos da ingestão de suplementos a base de óleo de coco e cártamo, tem-se como justificativa a necessidade de estudos que avaliem o efeito destes óleos sobre o metabolismo lipídico e a contribuição dos mesmos para a redução da adiposidade abdominal.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 METABOLISMO LIPÍDICO

Os lipídeos são macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo e estão relacionados ao metabolismo energético (LEE; OLSON; EVANS, 2003). Em condições de excesso, estocam-se nas células do tecido adiposo sob a forma de triglicerídeos, os quais são formados em processos enzimáticos e resultam da ligação de uma molécula de glicerol a três moléculas de ácidos graxos livres (AGL) (MURRAY et al., 2006; COLEMAN; MASHEK, 2011). A solubilização e o transporte destes lipídeos pela circulação sanguínea até o tecido alvo dependem da ação de lipoproteínas, que são partículas compostas basicamente por apoproteínas e fosfolipídeos e diferenciam-se em tamanho, densidade e composição química (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

As principais classes de lipoproteínas incluem os quilomícrons (QM), responsáveis por transportar os lipídios ingeridos desde o intestino aos tecidos periféricos; as lipoproteínas de densidade muito baixa ou *very low density lipoprotein* (VLDL), produzidas pelo fígado e responsáveis pelo carreamento dos triglicerídeos derivados da via endógena do fígado aos tecidos extra-hepáticos; as lipoproteínas de densidade intermediária ou *intermediary density lipoprotein* (IDL) são ricas em triglicerídeos e podem ser convertidas em lipoproteínas de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL), as quais contêm elevadas quantidades de colesterol e possuem perfil aterogênico; por fim, a lipoproteína de densidade alta ou *high density lipoprotein* (HDL) remove o excesso de colesterol dos tecidos e direciona ao fígado, onde será catabolizado (MURRAY et al., 2006; BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

O metabolismo lipídico tem início com a absorção intestinal da gordura proveniente da dieta. A fim de atravessar a luz intestinal e alcançar o plasma, os lipídeos precisam ser emulsificados por ácidos biliares e hidrolisados por enzimas específicas. Após a hidrólise, os lipídeos são absorvidos pelos enterócitos, resintetizados e acoplados em quilomícrons nascentes. Estas lipoproteínas são secretadas no sistema linfático e entram na circulação sanguínea cerca de duas horas após o consumo alimentar. Ao longo do percurso pelo sistema vascular, os quilomícrons nascentes liberam as apoproteínas apoA-I e apoA-IV para então receber as apoproteínas apoE e apoC-II, fundamentais aos

processos metabólicos que ocorrerão em seguida. A apoC-II ativa a lipoproteína lipase (LPL) nos capilares dos tecidos adiposo e muscular, o que facilita a quebra dos triglicerídeos presentes nos quilomícrons em ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são então parcialmente captados e armazenados nos adipócitos, enquanto o quilomícron remanescente retorna à circulação sanguínea sistêmica. A apoE é reconhecida pelo receptor de LDL no hepatócito, pela proteína *LDL receptor-related* (LRP) e pelo receptor Scavenger B-1, facilitando a endocitose lisossomal do quilomícron remanescente. Os produtos do metabolismo do quilomícron – glicerol, ácido graxo, colesterol, aminoácidos e resíduos de fosfato – são metabolizados e reciclados em novas lipoproteínas do tipo VLDL (KOHAN et al., 2011; BECHMANN et al., 2012).

O consumo alimentar fornece gordura para o metabolismo lipídico, contudo o organismo também utiliza vias endógenas para a produção energética, seja proveniente do tecido adiposo – por meio da lipólise e oxidação lipídica – ou pela formação de triglicerídeos a partir de carboidrato – lipogênese *de novo*.

A lipólise ocorre normalmente em estados de inanição e é inibida pela ação da insulina. Para o fornecimento de energia, os triglicerídeos armazenados nos adipócitos são hidrolisados consecutivamente até glicerol e ácido graxo livre, e esta ação é catalisada pelas enzimas lipase dos triglicerídeos do adipócito (ATGL), lipase hormônio-sensível (LSH) e lipase monoglicerídeo (ARNER, 2005). Após a quebra, a molécula de glicerol é convertida a gliceraldeído-3-fosfato e processada nas vias glicolítica ou gliconeogênese, enquanto os ácidos graxos livres seguirão a via da oxidação lipídica. Desta maneira, a lipólise revela-se uma fonte significativa de energia ao organismo. Ademais, indivíduos que apresentam resistência à ação da insulina também apresentam aumento da lipólise, o que disponibiliza elevadas quantidades de ácidos graxos livres para o pool plasmático, independentemente do consumo alimentar ou estado nutricional (BECHMANN et al., 2012).

A oxidação lipídica tem como objetivo a geração de acetil-coenzima A (acetil-CoA) e a utilização desta no ciclo de Krebs para a produção de ATP, ou então a formação de corpos cetônicos como fonte alternativa de energia para os tecidos periféricos. Chama-se de  $\beta$ -oxidação o processo de degradação da cadeia carbônica do ácido graxo a partir do segundo átomo de carbono adjacente ao grupo carboxila (COOH), e este é realizado, principalmente, nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Outros tipos de oxidação incluem  $\alpha$ -oxidação e  $\omega$

-oxidação, quando a degradação inicia-se pelo átomo de carbono terminal da cadeia e são realizadas por membros da família do Citocromo P450 4A nos microssomos. A família do Citocromo P450 compreende diversas hemoproteínas que catalizam a oxidação inicial de compostos endógenos e exógenos, como os AGLs, para posteriormente seguirem a via da  $\beta$ -oxidação. A oxidação de gorduras acontece predominantemente nas mitocôndrias, entretanto os sistemas de oxidação extramitocondriais são essenciais para situações em que há elevado fluxo de ácidos graxos para o fígado (LAVOIE; GAUTHIER, 2006; TESSARI et al., 2009).

A lipogênese *de novo* consiste na formação de ácidos graxos – e posterior conversão a triglicerídeos – a partir de carboidratos, quando a ingestão deste macronutriente excede as necessidades calóricas e a capacidade hepática de armazenamento sob a forma de glicogênio (STRABLE; NTAMBI, 2010). A glicose ingerida passa pelo processo de conversão a acetil-CoA pela enzima L-PK (Piruvato quinase do fígado, do inglês *liver-specific pyruvate kinase*), posteriormente convertida a malonil-CoA pela ACC (Acetil-CoA carboxilase, do inglês *Acetyl-CoA carboxylase*) e, finalmente, a ácido graxo pela ação da FAS (Ácido graxo sintase, do inglês *fatty acid synthase*) (BYRNE et al., 2009). Todo este processo acarreta em aumento da síntese e secreção de lipoproteínas do tipo VLDL, a fim de carrear os triglicerídeos até tecidos periféricos, como tecidos adiposos e musculares, para serem armazenados ou hidrolisados e oxidados como fonte energética (BARTELT et al., 2013; NEUSCHWANDER-TETRI, 2013).

Em situações em que ocorre o aumento na disponibilidade de ácidos graxos derivados da lipólise do tecido adiposo; aumento na síntese de ácidos graxos pela via da lipogênese *de novo*; adoção de dietas hiperlipídicas; diminuição no processo de  $\beta$ -oxidação mitocondrial; diminuição no clearance de partículas de VLDL, ou a combinação destes fatores, o indivíduo pode apresentar deposição excessiva de gordura no fígado, doença esta chamada de esteatose hepática não-alcoólica (BYRNE et al., 2009).

### **2.1.1 Esteatose hepática não-alcoólica**

A esteatose hepática não-alcoólica representa um acúmulo hepático de triglicerídeos quando ausente o consumo significativo de álcool, causas bacterianas, virais, autoimunes ou indução por medicamentos (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; HERNAEZ, 2011; AGRAWAL;

DUSEJA, 2012; BECHMANN et al., 2012). Estima-se que esta doença afete de 10% a 24% da população adulta mundial, porém esses valores aumentam significativamente para indivíduos com obesidade (de 57,5% até 74%) (TARANTINO et al., 2007). A prevalência da esteatose hepática no Brasil ainda é desconhecida, contudo, acredita-se que a população brasileira também apresente elevada prevalência, devido ao aumento considerável dos casos de obesidade nas últimas décadas (MATTEONI et al., 2011). Além da obesidade, o desenvolvimento da esteatose hepática também apresenta associação com a resistência à ação da insulina (YILMAZ, 2012).

Em situações de resistência à ação da insulina, os tecidos musculoesqueléticos apresentam dificuldade para captar a glicose plasmática – situação esta intitulada como resistência periférica à ação da insulina. Entretanto, este processo, quando associado à obesidade e à esteatose hepática, também envolve o fígado e o tecido adiposo – onde ocorre um comprometimento na supressão da produção de glicose mediada pela insulina e na supressão da lipólise, respectivamente (KOTRONEN; YKI-JÄRVINEN, 2008; FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010). Sabe-se que a captação hepática de glicose independe de insulina – especialmente após um período de jejum – ou seja, a taxa de captação ocorrerá em virtude do aumento nas concentrações plasmáticas de glicose. Assim, a ação insulínica prejudicada, a hiperglicemia plasmática e a captação hepática de glicose independente de insulina favorecerão a conversão de carboidratos em ácidos graxos por meio da lipogênese *de novo* e o depósito de lipídeos no fígado (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007; VARELA-REY et al., 2009).

A lipogênese *de novo* e a lipólise podem ser consideradas como as principais fontes de ácidos graxos contribuintes para o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica. Tal processo também pode envolver a ação de hormônios, fatores de transcrição e receptores nucleares ou de membrana, resultando no estímulo à gliconeogênese e síntese de triacilgliceróis e alteração na capacidade da insulina em regular a absorção de glicose. Dois fatores de transcrição diretamente envolvidos na lipogênese *de novo* são o SREBP-1c e o ChREBP (ANSTEE; GOLDIN, 2006; KRAWCZYK; BONFRATE; PORTINCASA, 2010; AGRAWAL; DUSEJA, 2012).

O SREBP-1c (proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol-1c, do inglês *sterol regulatory element binding protein-1c*) é um fator de transcrição pertencente à família SREBP e pode ser considerado um mediador da ação da insulina sobre os genes que expressam as enzimas ACC e FAS. Estudos sugerem que anormalidades na função da

SREBP-1c podem contribuir de forma relevante para o desenvolvimento da esteatose hepática, pois, além de modular enzimas lipogênicas, o SREBP-1c também estimula a expressão de genes responsáveis pela elongação de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos. Contudo, este fator de transcrição não apresenta responsabilidade total pela síntese lipídica, ou seja, é imprescindível a sua atuação sinérgica com a insulina. Na verdade, em estados de resistência à ação da insulina com excessiva produção deste hormônio o SREBP-1c encontra-se superestimulado, e a associação de ambos promove a expressão de genes lipogênicos atuantes na lipogênese *de novo* (LIANG et al., 2002; AHMED; BYRNE, 2007).

A glicose, porém, atua na transcrição gênica de outro fator de transcrição, chamado de ChREBP (proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidrato, do inglês *carbohydrate responsive element binding protein*). Situações em que há elevada disponibilidade de glicose ativam a translocação deste fator do citosol celular para o núcleo, onde o ChREBP se ligará à região responsiva a carboidratos (*carbohydrate responsive element* – ChoRE) localizada em partes específicas dos genes lipogênicos e glicolíticos. Ressalta-se que a enzima-chave na conversão hepática de glicose a acetil-CoA, a L-PK, sofre regulação do fator ChREBP, e não do SREBP-1c (DENTIN et al., 2006; DENECHAUD et al., 2008; BENHAMED et al., 2012).

Outro carboidrato que tem despertado a atenção pela sua contribuição à lipogênese é a frutose. Evidências demonstram que o rápido crescimento da incidência de esteatose hepática apresenta relação com a ocidentalização dos hábitos alimentares e o elevado consumo de carboidratos refinados, especialmente a frutose (YILMAZ, 2012). Pesquisadores demonstraram que a ingestão de dietas contendo frutose promove aumento nas concentrações de triglicerídeos, quando comparadas a dietas com outros carboidratos, pois há aumento da síntese de gordura em detrimento da gliconeogênese em virtude da maior síntese hepática de glicerol e de ácidos graxos (BARREIROS; BOSSOLAN, TRINDADE, 2005).

### **2.1.2 Frutose e indução de esteatose hepática não-alcoólica**

Diferentes modelos dietéticos têm sido aplicados em estudos experimentais a fim de se estudar a implicação da ingestão de nutrientes e alimentos amplamente consumidos pela população sobre o desenvolvimento de comorbidades, como obesidade e dislipidemia. Em virtude das particularidades metabólicas, a frutose revela-se um

nutriente capaz de induzir alterações hepáticas e no metabolismo lipídico, possibilitando, assim, avaliar também o efeito de outros alimentos na reversão de tais alterações (MILLER; ADELI, 2008; DEKKER et al., 2010).

Embora isocalóricas, o metabolismo da frutose apresenta diferenças, em relação à glicose. Após a absorção no intestino delgado, a frutose é transportada pelo sistema portal até o fígado, onde sofre metabolização pela fosfofrutoquinase até frutose-1-fosfato. Esta molécula é clivada pela aldolase B e origina diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído, compostos estes que poderão seguir três vias diferentes: participar da via glicolítica fornecendo piruvato e liberando ATP; ser metabolizados até glicerol, necessário para a síntese de triglicerídeos, fosfolipídios e outros lipídios; ou, finalmente, formar a frutose-1,6-difosfato e, a partir dessa, originar glicose ou glicogênio (GABY, 2005; BARREIROS; BOSSOLAN, TRINDADE, 2005; BOTEZELLI, 2009).

Em virtude da sua metabolização pela fosfofrutoquinase, a frutose não sofre regulação da insulina e, por desviar-se da principal etapa regulatória da glicólise (a conversão de glicose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato), pode participar continuamente na via glicolítica. Desta maneira, frutose pode originar descontroladamente glicose, glicogênio, lactato e piruvato e disponibilizar componentes para a formação de ácidos graxos. A associação destes componentes com a excessiva produção de ATP durante o metabolismo da frutose pode promover elevada produção de triglicerídeos e superestimular a lipogênese *de novo* (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005; DEKKER et al., 2010; LIM et al., 2010).

Apesar de o fator de transcrição SREBP-1c ser classicamente ativado pela insulina, estudos demonstraram que a frutose também pode estimulá-lo, com consequente ativação de genes envolvidos na lipogênese *de novo* – FAS e ACC (MIYAZAKI et al., 2004; BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005). Ademais, o consumo de frutose durante duas semanas, em substituição à glicose, promoveu aumento da atividade do fator de transcrição ChREBP em animais (KOO et al., 2009; DEKKER et al., 2010). Em seres humanos, a ingestão de frutose parece favorecer o acúmulo de lipídeos no tecido adiposo visceral, em especial nos indivíduos do sexo masculino, enquanto o consumo de glicose parece promover acúmulo no tecido subcutâneo (STANHOPE et al., 2009).



### 2.1.3 Adiposidade abdominal

O excesso de gordura corporal, *per se*, revela-se indesejável por ser um preditor de doenças metabólicas relacionadas com a obesidade, entretanto o tecido adiposo apresenta diferentes atividades metabólicas conforme a região onde está armazenado, ou seja, além da quantidade de gordura corporal, deve-se considerar a distribuição de tais depósitos lipídicos (LERARIO et al., 2002; SHADID; KOUTSARI; JENSEN, 2007). O tecido adiposo subcutâneo periférico (como exemplo, o glúteo-femoral) é responsável por funções estruturais de proteção e suporte, desta maneira apresenta atividade metabólica irrisória; já os depósitos localizados na região abdominal demonstram ser altamente ativos e podem ser considerados como um órgão de função endócrina (FOX et al., 2007).

Diversas etapas do metabolismo lipídico que se desenvolvem no tecido adiposo são peculiares ao tecido abdominal, principalmente o visceral, tais como a atividade lipolítica dependente de hormônios e mediada por fatores não humorais, a inibição da lipólise modulada pela ação da insulina, a expressão de enzimas lipolíticas, a síntese de triglicerídeos e a atividade da lipase lipoproteica (BARROSO; ABREU; FRANCISCHETTI, 2002; RIBEIRO FILHO et al., 2006).

Alterações no metabolismo dos ácidos graxos, associadas com obesidade abdominal, podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da resistência à ação da insulina. Observou-se que os tecidos adiposos localizados na região abdominal disponibilizam maior quantidade de ácidos graxos livres (AGL) diretamente ao sistema portal e ao fígado, independentemente do peso corporal total do indivíduo (KLEIN, 2004; SHADID; KOUTSARI; JENSEN, 2007), e o excesso de AGL circulante reduz a efetividade da insulina em estimular a captação de glicose pelas células musculares e em suprimir a produção hepática de glicose (LERARIO et al., 2002; DEKKER et al., 2010).

## 2.2 ÓLEOS E GORDURAS

Reduções no peso corporal, com conseqüente diminuição da adiposidade abdominal, demonstram-se benéficas especialmente a indivíduos com alterações metabólicas decorrentes da esteatose hepática e do excesso de tecido adiposo visceral. Entretanto, emagrecer e manter-se saudável exigem comprometimento e mudanças permanentes de hábitos alimentares e estilo de vida, o que dificulta a adesão a programas

de educação alimentar e práticas de exercício físico. Assim, a procura por métodos que facilitem o emagrecimento cresceu significativamente nos últimos anos, sendo os suplementos nutricionais uma alternativa de fácil acesso e baixo custo, quando comparada a procedimentos cirúrgicos e estéticos (BLANCK et al., 2007; ROGOVIK; GOLDMAN, 2009; PODDAR et al., 2011).

Os suplementos nutricionais podem atuar de diferentes maneiras na redução do peso corporal conforme a sua composição nutricional, contudo os principais efeitos metabólicos divulgados seriam a capacidade supressora do apetite e conseqüente diminuição do consumo alimentar, bem como o estímulo ao aumento do gasto calórico (termogênese) (DWYER; ALLISON; COATES, 2005). Dentre estes produtos, podemos citar os óleos de coco e cártamo.

### 2.2.1 Óleo de Coco

O óleo de coco é derivado da polpa do coco, o fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L). Segundo dados do Centro de Informações Tecnológicas e Comerciais para Fruticultura Tropical, da Embrapa, os países asiáticos, como Índia, Filipinas e Indonésia, são considerados os principais produtores da fruta e seus produtos secundários, enquanto o Brasil ocupa a 10ª colocação no ranking mundial de produção de coco (LIAU et al., 2011).

De acordo com a característica da polpa e a técnica utilizada para a extração da gordura pode-se obter óleos com diferentes qualidades. A polpa do fruto pode ser submetida ao processo de secagem (sob exposição à luz solar ou em equipamentos específicos) e prensada de forma mecânica, até a obtenção do óleo. Após, o produto sofre os processos de refinamento, descoloração e desodorização (*refining, bleaching, and deodorizing* - RBD), durante os quais o óleo é submetido a elevadas temperaturas e purificação com solventes químicos. Como produto final tem-se o óleo de coco refinado, ou copra. Em virtude do aquecimento, alguns compostos benéficos, como tocoferóis, tocotrienóis, polifenóis e outros antioxidantes podem se encontrar em quantidades significativamente reduzidas, se comparado ao óleo de coco virgem (NEVIN; RAJAMOCHAN, 2004; O'BRIEN, 2009; MARINA et al., 2009).

O óleo de coco virgem, de acordo com as normas estabelecidas no manual *Philippine National Standards* (PNO), é feito a partir da polpa fresca e madura, por métodos naturais ou mecânicos, com ou sem aquecimento, porém sem o uso de solventes químicos para refinamento.

Com a prensagem da polpa madura e fresca, obtém-se uma emulsão leitosa, a qual precisa ser separada para a obtenção do óleo. Esta separação pode ser realizada por centrifugação, ação enzimática, fermentativa ou por resfriamento, congelamento e posterior descongelamento em banho-maria. Em virtude do uso de técnicas que não requerem elevadas temperaturas e agentes químicos para refinamento, este tipo de óleo conserva os compostos antioxidantes presentes no fruto e suas características naturais (MANSOR et al., 2012; PHILIPPINES, 2004; APCC, 2009).

Embora apresente um importante conteúdo de antioxidantes, busca-se a utilização do óleo de coco em virtude do tipo de lipídeo que o compõe: o ácido graxo de cadeia média (AGCM). Classificados como saturados, estes ácidos possuem entre seis e 12 carbonos em sua cadeia (FIGUEIREDO-SILVA et al., 2012). O ácido láurico, um AGCM, corresponde a 50% da composição de ácidos graxos do óleo de coco, seguido por quantidades consideráveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como os ácidos cáprico, capróico e caprílico (ZAKARIA et al., 2011), o que torna o óleo de coco um alimento com baixas quantidades de ácidos graxos essenciais, como os ácidos linoléico e linolênico (IPPAGUNTA et al., 2011). Os AGCM apresentam algumas peculiaridades no que se refere ao metabolismo hepático e seus mecanismos de ação, e tais peculiaridades seriam responsáveis pelo efeito benéfico na adiposidade abdominal e perfil lipídico.

#### 2.2.1.1 Mecanismos de ação

Diferentemente dos ácidos graxos de cadeia longa, AGCM não requerem a ação transportadora dos quilomícrons via sistema linfático para alcançarem os tecidos-alvo, ou seja, os ácidos graxos de cadeia média percorrem a circulação diretamente pelo sistema portal, o que facilita a metabolização hepática e oxidação mitocondrial (FIGUEIREDO-SILVA et al., 2012). Ademais, em se tratando da oxidação mitocondrial, estes ácidos graxos seriam favorecidos por não dependerem de carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1), enzima-chave que facilita a entrada do ácido graxo na mitocôndria para sua posterior oxidação, ao converter o acil-CoA à acilcarnitina (GAO et al., 2013).

Em virtude da sua composição predominantemente de ácidos graxos saturados, há uma preocupação em relação a alterações no perfil bioquímico que este óleo poderia promover, potencialmente elevando o risco de doença cardiovascular. Os achados obtidos em estudos iniciais com o óleo de coco corroboravam esta ideia. Entretanto, críticas

surgiram em relação à metodologia adotada, dentre elas o uso de gordura hidrogenada de coco – a qual apresenta maior estabilidade para o uso culinário, porém contém elevadas quantidades de ácidos graxos trans que favorecem o desenvolvimento de dislipidemias e doenças cardiovasculares – e a adoção de dietas controle fonte de ácidos graxos poliinsaturados – amplamente descritos na literatura como eficazes agentes redutores de colesterol sanguíneo (DAYRIT, 2003; FERANIL et al., 2011).

### 2.2.2 Óleo de Cártamo

O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), em inglês chamado de *Safflower*, é uma planta pertencente à família das *Asteraceae*. Apesar de ser cultivada há muitos anos na região do Oriente Médio devido à sua capacidade de adaptação a climas áridos e solos com alta salinidade, atualmente a Índia, os Estados Unidos e o México são os principais produtores. Inicialmente, plantava-se o cártamo para o uso medicinal e para a produção de corantes alimentício e têxtil a partir das flores, contudo a indústria desenvolveu novos produtos com a semente da planta, dentre eles o óleo (COŞGE; KAYA, 2008; VOSOUGHKIA et al., 2011a; VOSOUGHKIA et al., 2011b; TONGUÇ et al., 2012).

O óleo de cártamo possui coloração amarelo dourado e sabor oleaginoso semelhante à noz. É constituído principalmente por ácido linoleico (70-85%), um ácido graxo poliinsaturado  $\omega$ -6, porém também apresenta ácido oleico (16-20%), ácido palmítico (6-8%) e ácido esteárico (2-3%) na sua composição. Fatores como a estabilidade durante os processos de cocção, baixo custo quando comparado a outros óleos (ex.: óleo de oliva) e seu elevado conteúdo de ácidos graxos essenciais tornam favorável o consumo deste produto. Ademais, a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados proporciona efeitos benéficos na prevenção e no tratamento de diversas comorbidades, como hipertensão arterial, aterosclerose e dislipidemias (COŞGE; GÜRBÜZ; KIRALAN, 2007; GECGEL et al., 2007; HAN et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

#### 2.2.2.1 Mecanismos de ação

A obesidade reflete um aumento do tecido adiposo, e este pode acontecer por meio da hipertrofia dos adipócitos já existentes; pelo recrutamento e diferenciação de adipoblastos em pré-adipócitos e, posteriormente, em novos adipócitos, ou por ambas as vias (MADSEN

et al., 2008; WARNKE et al., 2011). Alguns fatores de transcrição atuam neste processo de diferenciação celular, dentre eles o PPAR $\alpha$  (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa), um subtipo pertencente à classe de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma e que está vinculado ao processo de oxidação de ácidos graxos pelo fígado (AMRI; AILHAUD; GRIMALDI, 1994; HSU; HUANG, 2007). Pesquisadores demonstraram que os ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linoleico, podem agir como elemento de ligação ao PPAR $\alpha$  e, desta maneira, modular a diferenciação dos pré-adipócitos a células maduras do tecido adiposo (OKUNO et al., 1997). Ademais, o ácido graxo  $\omega$ -6 também apresenta a capacidade de suprimir a expressão hepática de mRNA de fatores de transcrição lipogênicos e seus ligantes, como exemplo o SREBP-1 e FAS (HSU; HUANG, 2006).

Na sua via metabólica normal, o ácido linoleico pode converter-se em ácido araquidônico (AA). O ácido araquidônico tem sido identificado como um dos principais componentes adipogênicos encontrados no soro sanguíneo, em virtude da sua capacidade de estimular a captação de glicose nos adipócitos, ao aumentar as concentrações de receptores para a glicose na membrana celular e, desta forma, elevar a disponibilidade de substrato energético para o processo de lipogênese *de novo* (MASSIERA et al., 2003). Sob a ação da ciclooxigenase (COX), este ácido pode originar mediadores químicos coletivamente denominados eicosanóides, como a prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, ou prostaciclina), a qual é sintetizada e liberada por pré-adipócitos (WORTMAN et al., 2009). Contudo, o papel do AA como contribuinte para a lipogênese revela-se contraditório, considerando que testes *in vitro* apontaram ação inibitória do AA na diferenciação primária de pré-adipócitos (MADSEN et al., 2008).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito dos óleos de coco e de cártamo na adiposidade abdominal, perfil lipídico e glicemia de ratas realimentadas com dieta rica em frutose após jejum de 48 horas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar o consumo de ração e a variação de peso dos animais experimentais;
- Determinar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, HDL-c, não HDL-c e glicose dos animais experimentais;
- Determinar as concentrações de triglicerídeos, colesterol total, HDL-c e não HDL-c no fígado e coração dos animais experimentais;
- Verificar o peso do tecido adiposo abdominal, fígado, coração e rim dos animais experimentais.





## 4 MÉTODOS

### 4.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina - Protocolo nº PP00785. O ensaio biológico foi realizado de acordo com os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

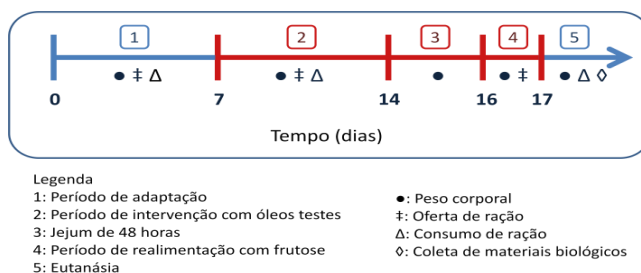
O estudo apresenta delineamento experimental randomizado.

### 4.3 ENSAIO BIOLÓGICO

O ensaio biológico foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O protocolo experimental (Figura 1) seguiu metodologia proposta por Castro et al. (2011), com o intuito de promover o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcoólica.

**Figura 1** – Protocolo experimental



#### 4.3.1 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizadas 48 ratas da linhagem *Wistar*, adultas, com peso médio de 155 gramas, as quais foram alojadas em gaiolas metabólicas, mantidas em ambiente climatizado ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e em ciclo claro-escuro constante (12 horas). Após uma semana de adaptação sob alimentação

com dieta AIN-93G (dieta controle), os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de oito animais cada:

- Controle (C) – alimentados com dieta controle por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta controle por 24 horas;
- Soja (S) – alimentados com dieta controle por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas;
- Óleo de Coco 1 (Co1) – alimentados com dieta com óleo de coco por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas;
- Óleo de Coco 2 (Co2) – alimentados com dieta com óleo de coco por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose e com óleo de coco por 24 horas;
- Óleo de Cártamo 1 (Ca1) – alimentados com dieta com óleo de cártamo por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas;
- Óleo de Cártamo 2 (Ca2) – alimentados com dieta com óleo de cártamo por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose e com óleo de cártamo por 24 horas;

Os grupos Co2 e Ca2 diferiram dos grupos Co1 e Ca1 por receberem dieta com óleo de coco ou cártamo no período de intervenção e durante a realimentação com frutose, respectivamente. Os animais receberam água e ração *ad libitum* (exceto na fase de jejum, na qual receberam somente água) e foram pesados cinco vezes durante o experimento: no início do período de adaptação, no início de cada nova fase do período experimental e no dia da eutanásia. A variação de peso corporal foi calculada segundo a fórmula: peso corporal final – peso inicial. Todos os demais foram eutanasiados ao final do período de realimentação.

#### **4.3.2 Rações Experimentais**

As rações experimentais foram preparadas segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), com alteração da fonte lipídica (substituindo o óleo de soja por óleo de coco ou de cártamo) e de

carboidrato (substituindo as fontes de amido e a sacarose por frutose). Os óleos de coco extravirgem e de cártamo foram adquiridos em lojas especializadas na cidade de Florianópolis-SC e selecionados segundo a forma de apresentação (líquidos) e a disponibilidade no mercado local. As rações foram ofertadas na forma de pó e em comedouros de aço inox, sendo pesadas e repostas duas vezes na semana. O consumo foi obtido pela diferença de peso entre a dieta oferecida e as sobras.

A composição das rações dos períodos de adaptação e experimental, bem como as alterações dietéticas realizadas nos diferentes momentos do experimento, são apresentadas nos Quadros 1e 2 e na Tabela 1.

**Quadro 1** - Composição das rações dos grupos experimentais no período de adaptação. Florianópolis, 2014.

<b>AIN-93G</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade<sup>1</sup></b>
Caseína	200,000
Amido de milho	397,486
Amido de milho dextrinizado	132,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	70,000
Fibra	50,000
Minerais	35,000
Vitaminas	10,000
L-cistina	3,000
Colina	2,500
TBH <sup>2</sup>	0,014

Legenda: <sup>1</sup>: g/kg dieta; <sup>2</sup>: Tetra butil hidroquinona.

**Quadro 2** - Composição das rações dos grupos experimentais na fase de intervenção e realimentação com óleo de coco ou cártamo. Florianópolis, 2014.

Ingredientes <sup>1</sup>	GRUPOS EXPERIMENTAIS												
	C	C*	S	S*	Co1	Co1*	Co2	Co2*	Ca1	Ca1*	Ca2	Ca1*	
<b>Caseína</b>	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000
<b>Amido</b>	397,486	397,486	397,486	0	397,486	0	397,486	0	397,486	0	397,486	0	0
<b>Amido dex.<sup>2</sup></b>	132,000	132,000	132,000	0	132,000	0	132,000	0	132,000	0	132,000	0	0
<b>Sacarose</b>	100,000	100,000	100,000	0	100,000	0	100,000	0	100,000	0	100,000	0	0
<b>Frutose</b>	0	0	0	630,000	0	630,000	0	630,000	0	630,000	0	630,000	630,000
<b>Fibra</b>	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000
<b>Minerais</b>	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
<b>Vitaminas</b>	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
<b>L-cistina</b>	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
<b>Óleo de Soja</b>	70,000	70,000	70,000	70,000	0	70,000	0	0	0	70,000	0	0	0
<b>Coco<sup>3</sup></b>	0	0	0	0	70,000	0	70,000	70,000	0	0	0	0	0
<b>Cártamo<sup>4</sup></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	70,000	0	70,000	70,000	70,000
<b>Colina</b>	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500
<b>BHT</b>	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014

Legenda: C – Controle; S – Soja; Co1 – Óleo de coco 1; Co2 – Óleo de coco 2; Ca1 – Óleo de cártamo 1; Ca2 – Óleo de cártamo 2. \*fase de realimentação; <sup>1</sup>g/kg dieta; <sup>2</sup>amido dextrinizado; <sup>3</sup>Óleo de coco; <sup>4</sup>Óleo de cártamo.

**Tabela 1** – Substituições dietéticas nos diferentes períodos e grupos experimentais. Florianópolis, 2014.

GRUPOS	INTERVENÇÃO		REALIMENTAÇÃO	
	Carboidrato	Lipídeo	Carboidrato	Lipídeo
<b>C</b>	Sacarose+amidos	Óleo de soja	Sacarose+amidos	Óleo de soja
<b>S</b>	Sacarose+amidos	Óleo de soja	Frutose	Óleo de soja
<b>Co1</b>	Sacarose+amidos	Óleo de coco	Frutose	Óleo de soja
<b>Co2</b>	Sacarose+amidos	Óleo de coco	Frutose	Óleo de coco
<b>Ca1</b>	Sacarose+amidos	Óleo de cártamo	Frutose	Óleo de soja
<b>Ca2</b>	Sacarose+amidos	Óleo de cártamo	Frutose	Óleo de cártamo

Legenda: C – Controle; S – Soja; Co1 – Óleo de coco 1; Co2 – Óleo de coco 2; Ca1 – Óleo de cártamo 1; Ca2 – Óleo de cártamo 2.

#### 4.3.3 Eutanásia e coleta de amostras dos animais experimentais

Ao final dos 17 dias de experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato Cetamina 10% associado a cloridrato Xilazina 2% (2,5 mL/kg, cada). Foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca para a realização de determinações bioquímicas. O sangue foi acondicionado em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O plasma obtido pela centrifugação foi armazenado em microtubos do tipo Eppendorf e mantido em freezer com temperatura -80°C para futuras análises.

Posteriormente, foi realizada a abertura da cavidade abdominal e o tecido adiposo (retroperitoneal), o rim direito, o fígado e o coração foram dissecados cuidadosamente, lavados em solução salina gelada, secados em papel filtro e pesados em balança de precisão semi-analítica. Os tecidos hepático e cardíaco foram fracionados em alíquotas e congelados a -80°C para posterior determinação lipídica. O tecido adiposo e o rim foram removidos para pesagem e comparação entre os grupos.

#### 4.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

As análises foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose/UFSC.

As determinações plasmáticas de colesterol, HDL-c, triglicerídeos e glicemia foram realizadas por meio de *kits* comerciais da marca Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). O preparo das amostras seguiu as recomendações fornecidas pelo fabricante do *kit*, segundo a metodologia proposta para cada parâmetro. As concentrações foram obtidas por meio de espectrofotometria em analisador bioquímico semi-automático Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems, Inc.) e expressas em mg/dL.

A concentração de Não HDL-c plasmático foi estimada pela diferença entre o colesterol e a fração HDL-colesterol.

#### 4.5 DETERMINAÇÕES HEPÁTICAS E CARDÍACAS

##### 4.5.1 Preparo de homogenato tecidual

Utilizou-se 450 mg de tecido para homogeneização em 2,0 mL de PBS (Tampão Salino Fosfato, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 contendo anticoagulante EDTA 1 mM e 20 µL de BHT 10 mM (preparado em metanol), com o auxílio de homogeneizador com pistilo de teflon (Tecnal-Campinas, SP) até completa mistura do conteúdo. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 1500 rcf por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para quantificar o conteúdo de lipídeos e de proteínas.

##### 4.5.2 Extração e determinação de lipídeos teciduais

O lipídeo tecidual foi extraído conforme método descrito por Bligh e Dyer (1959) com modificações. Misturou-se 100 µL do homogenato tecidual com 5,0 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) contendo 50 µL de BHT 10 mM (preparado em metanol). Em seguida, a mistura foi homogeneizada em agitador tipo “vórtex” por 1 minuto, filtrada em papel de filtro (lavado com clorofórmio:metanol) e colocada em um evaporador rotativo para completa evaporação do solvente. O resíduo foi ressuspensionado – em 100 µL de solução fisiológica contendo dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl*

*sulfate*) 1% e 300  $\mu$ L de solução fisiológica pura – e então transferido a um microtubo tipo Eppendorf para a posterior análise.

As concentrações teciduais de colesterol, HDL-c e triglicerídeos foram determinadas por meio de *kits* comerciais da marca Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) por espectrofotometria em analisador bioquímico semi-automático Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems, Inc.). Os resultados foram expressos em  $\mu$ g lipídeo/mg proteínas totais, demandando uma normatização para posterior comparação.

A concentração de Não HDL-c tecidual foi estimada pela diferença entre o colesterol e a fração HDL-colesterol.

#### **4.5.3 Determinação e normatização por proteínas teciduais**

A determinação das proteínas teciduais foi realizada com base no método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*), da marca Sigma-Aldrich®, como padrão. Aliquotas de amostras teciduais foram misturadas com o reagente de trabalho Azul de Coomassie (CCB, do inglês *Coomassie Blue*) e mantidas em ambiente escuro por cinco minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm em espectrofotômetro (Spectrum UV-VIS, SpectroPhoto METER, SP- 2000 UV).

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software GraphPad Instat 3.0. Para verificar a homogeneidade dos dados e o tipo de distribuição foram utilizados o Teste de Bartlett's e o Teste de Kolmogorov e Smirnov, respectivamente. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA one-way), complementada com o teste de Tukey, ou por meio do teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 ARTIGO ORIGINAL

O artigo original procedente desta dissertação de mestrado será submetido ao periódico *Digestive and Liver Disease* (Fator de impacto: 3.162 Qualis/CAPES: A2), cujas normas para publicação estão apresentadas no ANEXO A.

### **EFEITO DOS ÓLEOS DE COCO E CÁRTAMO NA ADIPOSIDADE ABDOMINAL E PERFIL LIPÍDICO DE RATAS REALIMENTADAS COM FRUTOSE**

**Autores:**

**Amanda Della Giustina** - Nutricionista, aluna do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte** - Doutora, docente do Departamento de Nutrição e do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Gerson Luis Faccin** - Doutor, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Autor para correspondência:** Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Campus Universitário – Trindade – CEP: 88040-900 – Florianópolis-SC, Brasil. e-mail: [velutra@yahoo.com.br](mailto:velutra@yahoo.com.br) Fone: (48) 3721-5138 - Fax: (48) 3721-2784

**Apoio financeiro:** Programa de Bolsas Demanda Social/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

Este estudo objetivou investigar o efeito dos óleos de coco e de cártamo na adiposidade abdominal, na glicemia e em parâmetros lipídicos de ratas realimentadas com frutose após jejum. Foram utilizadas 48 ratas *Wistar* adultas, mantidas em gaiolas individuais e distribuídas em seis grupos de oito animais: Controle-C, Soja-F, Óleo de Coco 1-Co1, Óleo de Coco 2-Co2, Óleo de Cártamo 1-Ca1 e Óleo de Cártamo 2-Ca2. O experimento totalizou 17 dias. Após adaptados por sete dias, os grupos receberam por sete dias dieta com óleo teste como fonte lipídica, permaneceram em jejum durante 48 horas e foram realimentados com dieta contendo frutose por 24 horas. Os grupos Co2 e Ca2 receberam dieta com seu óleo teste na intervenção e realimentação. Usou-se dieta AIN-93G com modificações. Ao final, realizou-se a eutanásia e foram coletadas amostras de sangue e órgãos para as determinações bioquímicas. O fígado, coração, rim e tecido adiposo retroperitoneal foram pesados para comparação entre grupos. Foram realizados os homogenatos hepático e cardíaco para a determinar os parâmetros lipídicos. Os dados foram analisados no software *GraphPad Instat* 3.0, sendo significativo o valor de  $p < 0,05$ . Utilizou-se o ANOVA e pós-teste de Tukey ou Kruskal-wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos. Não houve alteração plasmática. No fígado, o óleo de coco aumentou as concentrações de triglicerídeos e reduziu colesterol e não HDL-c. No coração, o óleo de cártamo elevou as concentrações de triglicerídeos, colesterol e não HDL-c. Não houve alteração no peso de tecido adiposo e órgãos.

**Palavras-chave:** óleo de coco, óleo de cártamo, adiposidade abdominal, frutose.



## 1. INTRODUÇÃO

O excesso de gordura corporal, *per se*, é um preditor de doenças metabólicas relacionadas à obesidade, sendo que o tecido adiposo apresenta diferentes atividades metabólicas conforme a região onde está armazenado [1,2]. O tecido adiposo abdominal pode ser considerado como um órgão de função endócrina [3] e demonstra ser altamente ativo, já que diversas etapas do metabolismo lipídico são peculiares a ele, tais como a atividade lipolítica dependente de hormônios, a inibição da lipólise modulada pela ação da insulina, a expressão de enzimas lipolíticas, a síntese de triglicérides e a atividade da lipase lipoproteica [4,5]. Além disso, estes depósitos disponibilizam maior quantidade de ácidos graxos livres (AGL) diretamente ao sistema portal e ao fígado, independentemente do peso corporal total do indivíduo [2,6], e o excesso de AGL contribui para o desenvolvimento de resistência à ação da insulina [1,7].

Reduções no peso corporal e na adiposidade abdominal revelam-se positivas, sem dúvidas. Entretanto, emagrecer e manter-se saudável exigem comprometimento e mudanças permanentes de hábitos alimentares e estilo de vida, o que dificulta a adesão a programas de educação alimentar e práticas de exercício físico. Assim, a procura por métodos que facilitem o emagrecimento cresceu nos últimos anos, sendo os suplementos nutricionais uma alternativa de fácil acesso e baixo custo, quando comparada a procedimentos cirúrgicos e estéticos [8-10].

Dentre os diversos suplementos disponíveis no comércio, dois produtos em especial têm sido utilizados com este intuito: os óleos de coco e de cártamo. O óleo de coco é composto, predominantemente, por ácidos graxos de cadeia média (AGCM)[11]. Estes ácidos graxos não demandam transporte pelos quilomícrons para alcançarem os tecidos-alvo e independem da ação da carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1). Desta maneira, o óleo de coco seria prontamente oxidado nas mitocôndrias e forneceria energia, sem se depositar nos estoques corporais[11,12]. O óleo de cártamo é constituído principalmente por ácido linoleico (70-85%) e ácido oleico (16-20%) – dois ácidos graxos essenciais. Fatores como a estabilidade durante os processos de cocção, o elevado conteúdo de ácidos graxos essenciais e o papel benéfico de ácidos graxos poliinsaturados na prevenção e no tratamento de diversas comorbidades, como aterosclerose e dislipidemias, tornam favorável o consumo deste produto[13-16].

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do consumo de óleo de coco e de cártamo na adiposidade abdominal, perfil lipídico e glicemia de ratas realimentadas com dieta rica em frutose após jejum de 48 horas.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Animais

Foram utilizadas 56 ratas da linhagem Wistar, adultas, com peso médio de 155 gramas, as quais foram alojadas em gaiolas metabólicas, mantidas em ambiente climatizado ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e em ciclo claro-escuro constante (12 horas). O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolo PP00785) e seguiu os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

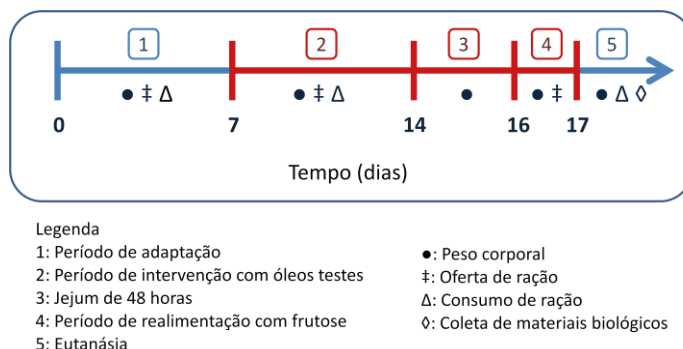
### 2.2. Protocolo Experimental

O protocolo experimental teve duração de 17 dias e seguiu a metodologia proposta por Castro et al. (2011) (Figura 1). Após uma semana de adaptação sob alimentação com dieta AIN-93G (dieta controle), as ratas foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos de oito animais cada: Controle (C) – alimentados com dieta controle por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta controle por 24 horas; Soja (S) – alimentados com dieta controle por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas; Óleo de Coco 1 (Co1) – alimentados com dieta com óleo de coco extravirgem por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas; Óleo de Coco 2 (Co2) – alimentados com dieta com óleo de coco extravirgem por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose e com óleo de coco extravirgem por 24 horas; Óleo de Cártamo 1 (Ca1) – alimentados com dieta com óleo de cártamo por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas; Óleo de Cártamo 2 (Ca2) – alimentados com dieta com óleo de cártamo por sete dias, mantidos em jejum de 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose e com óleo de cártamo por 24 horas.

Os animais receberam água e ração *ad libitum* (exceto na fase de jejum, na qual receberam somente água). As rações experimentais foram preparadas segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G[17], com alteração da fonte lipídica (substituindo o óleo de soja por óleo de coco extravirgem ou de cártamo) e de carboidrato (substituindo as fontes de amido e sacarose por frutose). As rações experimentais foram ofertadas na forma de pó e em comedouros de aço inox, sendo pesadas e repostas duas vezes na semana.

Os óleos de coco extravirgem e de cártamo foram adquiridos comercialmente em lojas especializadas na cidade de Florianópolis-SC e selecionados conforme a forma de apresentação (líquidos) e a disponibilidade no mercado local.

**Figura 1 – Protocolo experimental**



### 2.3. Eutanásia

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% (2,5 mL/kg, cada) para a coleta dos materiais biológicos. Foi realizada a abertura da cavidade abdominal e o tecido adiposo retroperitoneal, o rim direito, o fígado e o coração foram dissecados, lavados em solução salina gelada, secados em papel filtro e pesados em balança de precisão semi-analítica. Os tecidos hepático e cardíaco foram fracionados em alíquotas e congelados a -80°C para posterior determinação lipídica.

### 2.4. Homogenato tecidual e extração lipídica

Os tecidos hepáticos e cardíacos foram homogeneizados da seguinte maneira: Pesou-se 450 mg de tecido e adicionou-se a um tubo de ensaio com 2,0 mL de solução Tampão Salino Fosfato (pH 7,4) contendo anticoagulante EDTA 1 mM e 20 µL de BHT 10 mM (preparado em metanol). O conteúdo foi homogeneizado com o auxílio de homogeneizador com pistilo de teflon (Tecnal-Campinas, SP), até completa mistura, e centrifugado a 1500 rcf por 5 minutos a 4°C. A partir do sobrenadante do homogenato foram realizadas as determinações lipídicas (triglicerídeos, colesterol total e HDL-c) de acordo com a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959)[18] e a quantificação proteica (BRADFORD, 1976)[19] para normatização dos resultados.

### 2.5. Determinações plasmáticas e teciduais

O sangue obtido por punção cardíaca foi acondicionado em tubo de ensaio contendo anticoagulante EDTA e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma. Foram realizadas as determinações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol, HDL-c e glicose.

As determinações plasmáticas e teciduais foram realizadas por meio de kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), utilizando-se um analisador bioquímico semi-automático Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems, Inc.) para a análise e leitura em espectrofotometria. As concentrações de Não HDL-c plasmático e teciduais foram estimadas pela diferença entre o colesterol e a fração HDL-c. Os resultados foram expressos em mg/dL (plasma) ou µg lipídeo/mg proteína (tecidos).

## 2.6. Consumo alimentar e variação de peso corporal

O consumo alimentar foi obtido pela diferença de peso entre a dieta oferecida e as sobras. O peso corporal foi mensurado no início de cada fase do período experimental e no dia da eutanásia. A variação de peso corporal foi calculada segundo a fórmula: peso final – peso inicial.

## 2.7. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Instat 3.0*. Os resultados foram expressos como média±desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil. Para verificação de diferenças das variáveis entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, ou o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Peso corporal e consumo alimentar

Não houve variação significativa sobre o peso corporal ( $p=0,760$ ) e sobre o consumo alimentar, tanto no período de intervenção ( $p=0,968$ ), quanto no período de realimentação ( $p=0,236$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Efeito dos óleos de coco e cártamo sobre a variação de peso corporal (g) e o consumo alimentar (g) de ratas *Wistar* realimentadas após jejum. Florianópolis, 2014.

	Peso corporal‡	Consumo‡	
		Intervenção	Realimentação
<i>p</i> *	0,760	0,968	0,236
<b>C</b>	19,15±11,74	15,52±1,74	14,88±1,28
<b>S</b>	14,16±4,51	15,25±1,29	12,50±2,74
<b>Co1</b>	18,59±4,74	15,63±0,79	12,04±1,39
<b>Co2</b>	15,56±8,99	15,12±2,35	14,75±2,84
<b>Ca1</b>	17,80±15,16	15,26±2,37	12,84±2,32
<b>Ca2</b>	13,16±8,49	14,90±1,43	14,81±5,36

Legenda: C: Controle; S: Soja; Co1: Óleo de Coco 1; Co2: Óleo de Coco 2; Ca1: Óleo de Cártamo 1; Ca2: Óleo de Cártamo 2. Resultados apresentados como média±desvio-padrão. ‡n=8. \*ANOVA, pós-teste de Tukey.

### 3.2. Parâmetros plasmáticos

A Tabela 2 mostra os parâmetros plasmáticos dos animais alimentados com óleo de coco e cártamo. O tratamento não ocasionou alterações significativas sobre os parâmetros avaliados. No entanto, observou-se que a frutose elevou as concentrações de triglicerídeos e que o óleo de cártamo utilizado na realimentação foi capaz de reduzir tal parâmetro, efeitos estes, porém, sem significância estatística.

**Tabela 2** – Efeito dos óleos testes sobre os parâmetros plasmáticos de ratas *Wistar* realimentadas após jejum. Florianópolis, 2014.

	C	S‡	Co1	Co2	Ca1	Ca2	p*
<b>Plasma†</b>							
Triglicerídeos**	56,00±13,23	81,71±22,26	85,43±21,79	85,86±34,52	87,00±20,74	70,71±28,61	0,147
Colesterol	78,00±22,51	75,57±18,54	86,63±12,26	83,75±20,13	78,38±17,10	81,38±18,66	0,861
HDL-c	34,63±13,24	25,87±7,48	28,50±8,86	33,00±12,55	28,38±7,03	32,63±12,36	0,519
Não HDL-c	43,38±12,34	50,29±18,80	58,13±13,95	50,75±18,90	50,00±16,01	48,75±16,02	0,634
Glicose	168,13±21,58	165,57±35,68	162,50±14,62	163,50±13,35	164,50±25,34	153,65±10,84	0,829

Legenda: C: Controle; S: Soja; Co1: Óleo de Coco 1; Co2: Óleo de Coco 2; Ca1: Óleo de Cártamo 1; Ca2: Óleo de Cártamo 2. Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05). \*ANOVA, pós-teste de Tukey. †Resultados expressos como mg/dL. ‡Determinações plasmáticas GS (n=7). \*\*Triglicerídeo plasmático n=7.

### 3.3. Parâmetros hepáticos

Os parâmetros hepáticos dos animais experimentais são apresentados na Tabela 3. Foi possível notar o reflexo significativo da frutose em elevar as concentrações de triglicerídeos, papel este evidenciado nos grupos tratados com óleo de coco e minimizado nos animais que receberam óleo de cártamo. Observou-se também gradativo decréscimo significativo nas concentrações hepáticas de colesterol (p<0,001) e fração Não HDL-c (p=0,016).

**Tabela 3** – Efeito dos óleos teste sobre os parâmetros hepáticos de ratas *Wistar* realimentadas após jejum. Florianópolis, 2014.

	C	S‡	Co1	Co2	Ca1	Ca2	p*
<b>Fígado†</b>							
Triglicerídeos	13,55±4,37 <sup>b</sup>	16,57±4,43 <sup>b</sup>	22,65±1,86 <sup>a</sup>	18,14±3,19 <sup>ab</sup>	15,89±2,76 <sup>b</sup>	13,99±3,67 <sup>b</sup>	<0,001
Colesterol‡	3,85[3,21;4,74] <sup>ab</sup>	3,76[3,35;4,01] <sup>ab</sup>	3,77[3,62;3,89] <sup>a</sup>	2,94[2,79;3,07] <sup>ab</sup>	2,56[2,30;2,96] <sup>b</sup>	2,46[2,17;2,98] <sup>b</sup>	<0,001
HDL-c	1,21±0,61	1,24±0,43	1,34±0,20	0,88±0,41	0,93±0,48	1,19±0,45	0,266
Não HDL-c‡	2,63[1,45;3,68] <sup>ab</sup>	2,24[2,10;3,40] <sup>ab</sup>	2,35[2,30;2,47] <sup>a</sup>	1,94[1,69;2,15] <sup>ab</sup>	1,75[1,51;1,87] <sup>ab</sup>	1,27[0,98;1,44] <sup>b</sup>	0,016

Legenda: C: Controle; S: Soja; Co1: Óleo de Coco 1; Co2: Óleo de Coco 2; Ca1: Óleo de Cártamo 1; Ca2: Óleo de Cártamo 2. Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05). \*ANOVA, pós-teste de Tukey. ‡Resultados apresentados como mediana[intervalo interquartil]. †Resultados expressos como µg lipídeo/mg proteína.

### 3.4. Parâmetros cardíacos

A Tabela 4 apresenta os parâmetros cardíacos dos grupos experimentais. Observou-se que o grupo Soja (S) e os animais tratados com óleo de cártamo (Ca1 e Ca2) apresentaram as maiores concentrações de triglicerídeos cardíacos, e esta elevação foi significativa quando comparada ao grupo Controle (C). Foi possível notar que a realimentação com óleo de cártamo (Ca2) também elevou de forma significativa as concentrações de colesterol e da fração Não HDL-c.

**Tabela 4** – Efeito dos óleos testes sobre os parâmetros cardíacos de ratas *Wistar* realimentadas após jejum. Florianópolis, 2014.

	C	S†	Co1	Co2	Ca1	Ca2	p*
<b>Coração†</b>							
Triglicerídeos	4,14±0,87 <sup>ac</sup>	8,62±1,63 <sup>b</sup>	4,45±2,78 <sup>c</sup>	5,46±3,50 <sup>abc</sup>	8,53±4,14 <sup>bc</sup>	9,51±2,21 <sup>b</sup>	<0,001
Colesterol	1,06±0,51 <sup>a</sup>	2,13±0,27 <sup>b</sup>	0,86±0,50 <sup>a</sup>	1,55±1,03 <sup>ab</sup>	1,56±0,78 <sup>ab</sup>	2,37±0,69 <sup>b</sup>	<0,001
HDL-c	0,46±0,35	0,34±0,31	0,18±0,25	0,36±0,35	0,13±0,24	0,12±0,22	0,114
Não HDL-c	0,59±0,53 <sup>b</sup>	1,80±0,51 <sup>c</sup>	0,67±0,45 <sup>b</sup>	1,18±0,77 <sup>bc</sup>	1,43±0,85 <sup>abc</sup>	2,25±0,64 <sup>ac</sup>	<0,001

Legenda: C: Controle; S: Soja; Co1: Óleo de Coco 1; Co2: Óleo de Coco 2; Ca1: Óleo de Cártamo 1; Ca2: Óleo de Cártamo 2. Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05). \*ANOVA, pós-teste de Tukey. †Resultados expressos como µg lipídeo/mg proteína.

### 3.5. Peso do tecido adiposo e de órgãos

Na Tabela 5 constam os dados referentes ao peso de tecido adiposo e órgãos. A análise dos dados demonstrou que o consumo de óleo de coco ou cártamo não promoveu alteração significativa no peso de tecido adiposo e de fígado dos animais experimentais, mantido após a normalização para o peso corporal. O peso de coração e de rim também não apresentaram alteração significativa.

**Tabela 5** – Efeito dos óleos testes no peso absoluto (g) do tecido adiposo, fígado, coração e rim de ratas *Wistar* realimentadas após jejum. Florianópolis, 2014.

	C	S†	Co1	Co2	Ca1	Ca2	p*
Tec. Adiposo	6,18±2,84	5,36±1,48	7,32±2,27	5,13±1,48	6,39±3,13	5,62±2,08	0,442
Gordura/corporal**	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,323
Fígado	8,95±1,21	8,89±0,99	8,84±0,77	9,40±0,74	10,20±1,27	9,03±1,58	0,158
Fígado/corporal**	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,06±0,01	0,05±0,01	0,130
Coração	0,68±0,08	0,63±0,03	0,65±0,04	0,64±0,08	0,65±0,08	0,69±0,09	0,510
Rim	0,69±0,07	0,73±0,05	0,72±0,05	0,71±0,09	0,75±0,08	0,75±0,08	0,506

Legenda: C: Controle; S: Soja; Co1: Óleo de Coco 1; Co2: Óleo de Coco 2; Ca1: Óleo de Cártamo 1; Ca2: Óleo de Cártamo 2. Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05). \*ANOVA, pós-teste de Tukey. \*\*Normalização do peso do tecido adiposo ou fígado em relação ao peso corporal.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, os óleos de coco e cártamo não interferiram no consumo alimentar e na variação de peso corporal. Estudos anteriores avaliando o efeito de ácidos graxos de cadeia média e longa encontraram redução no consumo alimentar [20,21] e no peso corporal [22] nos animais alimentados com ácidos graxos de cadeia média (AGCM). Os mecanismos fisiológicos relacionados a este efeito ainda são controversos. Inicialmente, observou-se que o uso de agentes inibidores da oxidação de ácidos graxos poderia estimular o comportamento alimentar de ratos [64]; a partir deste achado, especulou-se que os efeitos encontrados com o uso de AGCM na redução do consumo alimentar deviam-se à sua rápida absorção e oxidação [23].

É importante salientar que a capacidade de uma gordura em promover saciedade dependerá de suas propriedades físicoquímicas, como a saturação e comprimento de sua cadeia de carbonos, as quais podem influenciar a liberação de peptídeos gastrointestinais reguladores do apetite [24]. Ressalta-se, também, que a pesquisa atual utilizou uma dieta normolipídica e por curto período de tempo, enquanto os demais estudos utilizaram dietas hiperlipídicas ou a ingestão de ácidos graxos via gavagem, o que pode ter influenciado nos resultados encontrados.

Em virtude da influência no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, obesidade abdominal e resistência à ação da insulina, tem-se evidenciado a importância de priorizar a qualidade nutricional das fontes lipídicas dietéticas, com foco em seus perfis de ácidos graxos [25]. Neste contexto, os óleos testados nesta pesquisa exerceram a mesma resposta glicêmica, independentemente do consumo de frutose, corroborando os achados da literatura [26-28]. Notou-se que os óleos de coco e cártamo não influenciaram as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, considerando que os Grupos Co1/Co2 e Ca1/Ca2 apresentaram valores próximos e sem diferença estatística entre eles. Cabe ressaltar que o Grupo S apresentou acréscimo nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos mesmo recebendo óleo de soja, demonstrando a ação da frutose – e não dos óleos – na alteração deste parâmetro. A rápida absorção hepática da frutose gera excessiva quantidade de glicerol-3-fosfato; este substrato energético favorece a esterificação de AGL para a formação de triglicerídeos. Ademais, a hipertrigliceridemia induzida por carboidratos parece resultar de uma produção excessiva aliada a um clearance prejudicado [29-31].

Em relação aos demais parâmetros lipídicos plasmáticos, observou-se que os grupos tratados com óleo de cártamo e óleo de soja apresentaram valores próximos, mesmo sem significância estatística. Este comportamento pode ser atribuído ao semelhante perfil de ácidos graxos de ambos os óleos [32]. Já o ácido láurico, principal componente do óleo de coco, favorece o aumento nas concentrações de HDL-c e, conseqüentemente, promove um acréscimo sobre os valores de colesterol total [33] – efeito observado no estudo atual e em coelhos [43].

O consumo de carboidratos simples de forma excessiva também promove importantes alterações no metabolismo lipídico e no funcionamento hepático. A frutose fornece substrato energético ininterruptamente à via glicolítica, facilitando a produção hepática de VLDL, a elongação de ácidos graxos e formação de triglicerídeos na lipogênese *de novo*. Como resultado, a oferta excessiva de frutose pode contribuir para o desenvolvimento de resistência à ação da insulina, dislipidemia e esteatose hepática [34,35].

Situações em que há restrição alimentar e realimentação demandam adaptações orgânicas, a fim de possibilitar o equilíbrio metabólico e a manutenção da vida. No jejum prolongado, o acúmulo hepático de lipídeos pode dever-se à oferta excessiva de AGLs disponibilizados a partir da lipólise, bem como à incapacidade de metabolizar tais ácidos graxos e exportá-los por meio de lipoproteínas [36]. Já em estados de excessiva oferta energética, a oxidação lipídica é inibida e a síntese de ácidos graxos é estimulada para que ocorra o armazenamento do substrato excedente no tecido adiposo. Processos que alterem o metabolismo lipídico, em especial a homeostase da oxidação e síntese lipídica, favorecem o desenvolvimento de obesidade, resistência à ação da insulina, dislipidemias e esteatose hepática [37].

A restrição alimentar seguida de sobrecarga de frutose se mostrou efetiva em promover o acúmulo hepático de triglicerídeos e causar alterações no metabolismo lipídico. Os valores médios do Grupo S, em comparação ao grupo C, demonstram tal efeito, o qual corrobora com a literatura [38,39]. Quando considerados apenas os óleos testes, os animais tratados com óleo de coco apresentaram as maiores concentrações hepáticas de triglicerídeos, colesterol e fração Não HDL-c, o que também foi encontrado em pesquisas anteriores [40,41]. Ácidos graxos de cadeia média, os quais compõem em maior parte o óleo de coco, são rapidamente transportados até o fígado e oxidados. A acelerada oxidação mitocondrial destes AG produz excessivas quantidades de acetil-CoA – substrato para a via da lipogênese *de novo* [40,42].

Observou-se que os animais tratados com óleo de cártamo apresentaram maiores concentrações de triglicerídeos no coração, se comparados aos grupos alimentados com óleo de coco. Este comportamento pode ser reflexo da metabolização predominantemente hepática sofrida pelos ácidos graxos presentes no óleo de coco, haja vista que as concentrações hepáticas de triglicerídeos nos Grupos Co1/Co2 foram superiores aos valores apresentados pelos Grupos Ca1/Ca2.

Todos os grupos experimentais apresentaram pesos médios semelhantes de tecido adiposo e órgãos. A normalização para o peso corporal demonstrou que as discretas alterações deveram-se ao crescimento e desenvolvimento normal dos animais. Embora não tenham sido significativos, é importante destacar que a realimentação com óleo de coco reduziu o peso de tecido adiposo, enquanto elevou o peso do fígado; o óleo de cártamo usado na realimentação, contudo, reduziu o peso do fígado e do tecido adiposo. Noguchi et al. (2002) [44] visualizaram redução do peso de tecido adiposo em ratos alimentados com triglicerídeos de cadeia média, em comparação ao uso de óleo de soja. Chen et al. (2010) [45] também encontraram redução do peso de gordura ao comparar ratos tratados com dieta controle com óleo de milho e dieta rica em frutose e óleo de coco.

Os achados desta pesquisa demonstraram que a frutose promoveu alterações nos parâmetros hepáticos e cardíacos, principalmente elevando as concentrações de triglicerídeos e reduzindo as concentrações de colesterol e HDL-c. Em relação ao fígado, o óleo de coco promoveu um maior aumento nas concentrações de triglicerídeos, ao passo que os grupos tratados com óleo de cártamo apresentaram valores semelhantes aos do grupo Controle. As concentrações de colesterol e suas frações (HDL-c e Não HDL-c) reduziram em todos os grupos, se comparados ao Controle. Em relação ao coração, os grupos Soja (S) e aqueles tratados com óleo de cártamo (Ca1 e Ca2) apresentaram concentrações de triglicerídeos semelhantes, enquanto os animais tratados com óleo de coco apresentaram concentrações semelhantes aos animais do grupo Controle (C). A realimentação com os óleos testes elevou as concentrações dos demais parâmetros lipídicos, exceto o HDL-c. Em relação ao peso de tecido adiposo e órgãos, não houve alteração significativa. É importante destacar a curta duração do estudo, o que pode ter influenciado na resposta metabólica dos animais aos tratamentos experimentais. Não obstante, o modelo adotado permite concluir que o consumo agudo de frutose promove alterações significativas em parâmetros lipídicos hepáticos e cardíacos, apesar de tal efeito não ser visualizado por meio de avaliação plasmática.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Prof<sup>o</sup> Dr. Edson Luiz da Silva pelo suporte técnico e auxílio nas análises, aos voluntários pelo auxílio na coleta de dados, ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN/UFSC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

## **REFERÊNCIAS**

1. Lerario DDG, Gimeno SG, Franco LJ et al. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. *Rev Saúde Pública* 2002;36:4-11.
2. Shadid S, Koutsari C, Jensen MD. Direct free fatty acid uptake into human adipocytes in vivo: relation to body fat distribution. *Diabetes* 2007;56:1369-75.
3. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:39-48.
4. Barroso SG, Abreu VG de, Francischetti EA. A participação do tecido adiposo visceral na gênese da hipertensão e doença cardiovascular aterogênica: um conceito emergente. *Arq Bras Cardiol* 2002;78:618-30.
5. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG et al. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50:230-38.
6. Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest* 2004;113:1530-32.

7. Dekker MJ, Su Q, Baker C et al. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E685–E94.
8. Blanck HM, Serdula MK, Gillespie C et al. Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. *J Am Diet Assoc* 2007;107:441-47.
9. Rogovik AL, Goldman RD. Should weight-loss supplements be used for pediatric obesity? *Can Fam Physician* 2009;55:257-59.
10. Poddar K, Sanjivani K, Bezman L et al. Nutraceutical supplements for weight loss: a systematic review. *Nutr Clin Pract* 2011;26:539-52.
11. Figueiredo-Silva AC, Kaushik S, Terrier F et al. Link between lipid metabolism and voluntary food intake in rainbow trout fed coconut oil rich in medium-chain TAG. *Br J Nutr* 2012;107:1714-25.
12. Gao S, Serra D, Keung W et al. Important role of ventromedial hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1a in the control of food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E336-47
13. Coşge B, Gürbüz B, Kiralan M. Oil content and fatty acid composition of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in spring and winter. *IJNES* 2007;1:11-5.
14. Gecgel U, Demirci M, Esendal E et al. Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Am. Oil Chem. Soc* 2007;84:47-54.
15. Han X, Cheng L, Zhang R et al. Extraction of safflower seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *J Food Eng* 2009;92:370-76.
16. Zhang Z, Li Q, Liu F et al. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPAR $\alpha$ , orexin, and ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010;42:202-8.
17. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition “Ad Hoc” writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.
18. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 1959;37:911-17.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
20. Jambor de Sousa UL, Arnold M, Langhans W, Geary N, Leonhardt M 2006 Caprylic acid infusion acts in the liver to decrease food intake in rats. *Physiol Behav* 2006;87:388-95.
21. Ooyama K, Kojima K, Aoyama T, et al. Decrease of food intake in rats after ingestion of medium-chain triacylglycerol. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009;55:423-27.
22. Takeuchi H, Noguchi O, Sekine S, et al. Lower weight gain and higher expression and blood levels of adiponectin in rats fed medium-chain TAG compared with long-chain TAG. *Lipids* 2006;41:207-12.
23. Friedman MI, Harris RB, Hong JI, Ramirez I, Tordoff MG. Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol* 1999;276:R1046–R53.
24. Leonhardt M, Langhans W. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol Behav* 2004;83:645-51.



25. Lemieux H, Bulteau AL, Friguet B et al. Dietary fatty acids and oxidative stress in the heart mitochondria. *Mitochondrion* 2011;11:97-103.
26. Gustavsson C, Parini P, Ostojic J et al. Cocoa butter and safflower oil elicit different effects on hepatic gene expression and lipid metabolism in rats. *Lipids* 2009;44:1011-27.
27. Chen CY, Crott J, Liu Z et al. Fructose and saturated fats predispose hyperinsulinemia in lean male rat offspring. *Eur J Nutr* 2010;49:337-43.
28. Higa R, White V, Martinez N et al. Safflower and olive oil dietary treatments rescue aberrant embryonic arachidonic acid and nitric oxide metabolism and prevent diabetic embryopathy in rats. *Mol Hum Reprod* 2010;16:286-95.
29. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2000;71:412-33.
30. Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2003;78:S873-S80.
31. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab* 2005; 2:5.
32. Misra A, Singhal N, Khurana L. Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. *J Am Coll Nutr* 2010;29:S289-S301.
33. Cunningham E. Is there science to support claims for coconut oil? *J Am Diet Assoc* 2011;111:786.
34. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 2005;63:133-57.
35. Yilmaz Y. Review article: fructose in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:1135-44.
36. Byrne CD. Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;82:265-71.
37. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1333-9.
38. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T et al. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR $\alpha$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E1180-E90.
39. Yadav H, Jain S, Yadav M et al. Epigenomic derangement of hepatic glucose metabolism by feeding of high fructose diet and its prevention by Rosiglitazone in rats. *Dig Liver Dis* 2009; 41:500-8.
40. Turner N, Hariharan K, Tidang J et al. Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species-dependent: potent tissue-specific effects of medium chain fatty acids. *Diabetes* 2009;58:2547-54.
41. Lecker J, Matthan N, Billheimer J et al. Impact of dietary fat type within the context of altered cholesterol homeostasis on cholesterol and lipoprotein metabolism in the F1B hamster. *Metabolism* 2010; 59:1491-1501.
42. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A et al. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:251-64.

43. Soni ND, Choudhary U, Sharma P et al. To study the effect of diet supplementation with coconut oil, mustard oil and sunflower oil on blood lipids in rabbit. *Ind J Clin Biochem* 2010;25:441–42.
44. Noguchi O, Takeuchi H, Kubota F et al. Larger diet-induced thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. *J Nutr Sci Vitaminol* 2002;48:524-29.
45. Chen CYO, Crott J, Zhenhua L et al. Fructose and saturated fats predispose hyperinsulinemia in lean male rat offspring. *Eur J Nutr* 2010;49:337-43.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de pesquisas que indiquem ou elucidem os mecanismos fisiopatológicos de doenças crônicas é imprescindível para nortear ações preventivas ou condutas clínicas capazes de reduzir a incidência destas condições metabólicas.

Os achados desta pesquisa demonstram que a frutose promoveu alterações nos parâmetros hepáticos e cardíacos, principalmente elevando as concentrações de triglicerídeos e reduzindo as concentrações de colesterol e HDL-c. Em relação ao fígado, o óleo de coco promoveu um maior aumento nas concentrações de triglicerídeos, se comparado ao óleo de cártamo. Em relação ao coração, os grupos tratados com óleo de cártamo (Ca1 e Ca2) apresentaram concentrações de triglicerídeos semelhantes aos animais do grupo Soja (S). Em relação ao peso de tecido adiposo e órgãos, não houve alteração significativa. Ressalta-se que a curta duração do período experimental permite avaliar o efeito agudo da intervenção experimental.

Conclui-se, assim, que ambos os óleos testados não exerceram ação sobre a adiposidade abdominal e alteraram de forma negativa os parâmetros lipídicos avaliados – seja elevando as concentrações de triglicerídeos, seja reduzindo as concentrações de colesterol e suas frações – no fígado ou no coração, não favorecendo a melhora de condições metabólicas decorrentes do aumento da adiposidade abdominal e dislipidemias.



## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S.; DUSEJA, A. K. Non-alcoholic fatty liver disease: east versus west. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 2, n. 2, p. 122-134, 2012.
- AHMED, M. H.; BYRNE, C. D. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 17-18, p. 740-747, 2007.
- AMRI, E. Z.; AILHAUD, G.; GRIMALDI, P. A. Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 5, p. 930-937, 1994.
- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 1, p. 1-16, 2006.
- APCC - ASIAN AND PACIFIC COCONUT COMMUNITY (Indonésia). **APCC STANDARDS FOR VIRGIN COCONUT OIL**. Jakarta, 2009. Disponível em: <<http://www.apccsec.org/document/VCO-STANDARDS.pdf>>. Acesso em: 03 jul. 2013.
- ARNER, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 471-482, 2005.
- BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.
- BARROSO, S. G.; ABREU, V. G. de; FRANCISCHETTI, E. A. A participação do tecido adiposo visceral na gênese da hipertensão e doença cardiovascular aterogênica: um conceito emergente. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, n. 6, p. 618-630, 2002.
- BARTELT, A. et al. Effects of adipocyte lipoprotein lipase on de novo lipogenesis and white adipose tissue browning. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, n. 5, p. 934-942, 2013.
- BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition and Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 5-19, 2005.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 716p.
- BECHMANN, L. P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, 2012.
- BENHAMED, F. et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2176-2194, 2012.
- BLANCK, H. M. et al. Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 107, n. 3, p. 441-447, 2007.
- BLIGH E. G.; DYER W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOTEZELLI, J. D. **Exercício Físico, Dieta Rica em Frutose e Marcadores da Síndrome Metabólica em Ratos**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Motricidade Humana, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BYRNE, C. D. et al. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Science**, v. 116, n. 7, p. 539–564, 2009.

CASTRO, G. S. F. et al. Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, supl. 2, p. 45-50, 2011.

COLEMAN, R. A.; MASHEK, D. G. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6359-6386, 2011.

aCOŞGE, B.; GÜRBÜZ, B.; KIRALAN, M. Oil content and fatty acid composition of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in spring and winter. **International Journal of Natural and Engineering Sciences**, v. 1, n. 3, p. 11-15, 2007.

bCOŞGE, B.; KAYA, D. Performance of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in late-autumn and late-spring. **Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, v. 12, n. 1 p. 13-18, 2008.

DEKKER, M. J. et al. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 299, p. E685–E694, 2010.

DENECHAUD, P. D. et al. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 68-73, 2008.

DENTIN, R. et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2159-2170, 2006.

DIAS, M. J. **Efeito do Exercício Físico Moderado nas Gorduras Perigonadal e Retroperitoneal Iniciado após o Desmame em Ratos Tratados com Glutamato Monossódico (Msg)**. 2009. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Curso de Licenciatura Plena em Educação Física, Departamento de Educação Física, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

DWYER, J. T.; ALLISON, D. B.; COATES, P. M. Dietary supplements in weight reduction. **Supplement to the Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 5, supl. 1, p. S80-S86, 2005.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, 2010.

FAN, J. G.; QIAO, L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 8, n. 3, p. 233-240, 2009.

FERANIL, A. B. et al. Coconut oil predicts a beneficial lipid profile in pre-menopausal women in the Philippines. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 190-195, 2011.

FIGUEIREDO-SILVA, A. C. et al. Link between lipid metabolism and voluntary food intake in rainbow trout fed coconut oil rich in medium-chain TAG. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 11, p. 1714-1725, 2012.

FOX, C. S. et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 116, n. 1, p. 39-48, 2007.

GABY, A. R. Adverse effects of dietary fructose. **Alternative Medicine Review**, v. 10, n. 4, p. 294-306, 2005.

GAO, S. et al. Important role of ventromedial hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1a in the control of food intake. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, Published online before print 2013 June 4, doi:10.1152/ajpendo.00168.2013.

- GECGEL, U. et al. Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 1, p. 47-54, jan. 2007.
- HAN, X.; CHENG, L.; ZHANG, R.; BI, J. Extraction of safflower seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 370-376, 2009.
- HERNAEZ, R. Genetics of non-alcoholic fatty liver disease and associated metabolic disorders. **Avances en Diabetologia**, v. 27, n. 6, p. 186-197, 2011.
- HIRATSUKA, S. et al. Effect of dietary docosahexaenoic acid connecting phospholipids on the lipid peroxidation of the brain in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 54, n. 6, p. 501-506, 2008.
- HSU, S. C.; HUANG, C. J. Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changes in expression of hepatic PPARalpha and adipose SREBP-1c-regulated genes. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 1779-1785, 2006.
- HSU, S. C.; HUANG, C. J. Changes in liver PPARalpha mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 86-96, 2007.
- IPPAGUNTA, S. et al. Dietary conjugated linoleic acid induces lipolysis in adipose tissue of coconut oil-fed mice but not soy oil-fed mice. **Lipids**, v. 46, n. 9, p. 821-830, 2011.
- KLEIN, S. The case of visceral fat: argument for the defense. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 11, p. 1530-1532, 2004.
- KOHAN, A. B. et al. Chylomicron remnants and nonesterified fatty acids differ in their ability to inhibit genes involved in lipogenesis in rats. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 2, p. 171-176, 2011.
- KOO, H. Y. et al. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 2, p. 285-289, 2009.
- KOTRONEN, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology**, v. 28, n. 1, p. 27-38, 2008.
- KRAWCZYK, M.; BONFRATE, L.; PORTINCASA, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 5, p. 695-708, 2010.
- LAVOIE, J. M.; GAUTHIER, M. S. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1393-1409, 2006.
- LEE, C.; OLSON, P.; EVANS, R. M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2201-2207, 2003.
- LERARIO, D. D. G. et al. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 4-11, 2002.
- LIANG, G. et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9520-9528, 2002.
- LIAU, K. M. et al. An open-label pilot study to assess the efficacy and safety of virgin coconut oil in reducing visceral adiposity. **ISRN Pharmacology**, v. 2011, ID 949686, 7 p.

- LIM, J. S. et al. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. **Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 251-264, 2010.
- MADSEN, L. et al. cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 11, p. 7196-7205, 2008.
- MANSOR, T. S. T. et al. Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, p. 837-845, 2012.
- MARINA, A. M. et al. Chemical properties of virgin coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 4, p. 301-307, 2009.
- MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.
- MASSIERA, F. et al. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 2, p. 271-279, 2003.
- MATTEONI, L. et al. Doença hepática gordurosa não-alcoólica: importância da ultra-sonografia abdominal no diagnóstico. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 81, n. 1, p. 7-9, 2011.
- MILLER, A.; ADELI, K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, p. 204-209, 2008.
- MIYAZAKI, M. et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25164-25171, 2004.
- MURRAY, R. et al. **HARPER: Bioquímica Ilustrada**. 26 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 692p.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 1, p. 1-26, 2009.
- NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 4, p. 446-452, 2013.
- NEVIN, K. G.; RAJAMOCHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 830-835, 2004.
- O'BRIEN, R. D. **Fat and oils: formulating and processing for applications**. 3. ed. Boca Raton: Crc Press, 2009. 766 p.
- OKUNO, M. et al. Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 9, p. 1752-1757, 1997.
- PODDAR, K. et al. Nutraceutical supplements for weight loss: a systematic review. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 26, n. 5, p. 539-552, 2011
- PRENTICE, A. M. The emerging epidemic of obesity in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, p. 93-99, 2006.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, 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**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- RIBEIRO FILHO, F. F. et al. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 230-238, 2006.



ROGOVIK, A. L.; GOLDMAN, R. D. Should weight-loss supplements be used for pediatric obesity? **Canadian Family Physician**, v. 55, n. 3, p. 257-259, 2009.

SHADID, S.; KOUTSARI, C.; JENSEN, M. D. Direct free fatty acid uptake into human adipocytes in vivo: relation to body fat distribution. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1369-1375, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, supl. 1, p. 2-19, 2007.

STANHOPE, K. L. et al. Consuming fructose-sweetened, not glucosesweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1322-1334, 2009.

PALOU, M. et al. Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. **European Journal of Physiology**, v. 456, n. 5, p. 825-836, 2008.

PHILIPPINES. Bureau Of Product Standards. Department Of Trade And Industry. **Philippine National Standards: Virgin coconut oil**. Makati City, 2004.

PODDAR, K. et al. Nutraceutical supplements for weight loss: a systematic review. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 26, n. 5, p. 539-552, 2011.

SHADID, S.; KOUTSARI, C.; JENSEN, M. D. Direct free fatty acid uptake into human adipocytes in vivo: relation to body fat distribution. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1369-1375, 2007.

STRABLE, M. S.; NTAMBI, J. M. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 3, p. 199-214, 2010.

TARANTINO, G. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 3, p. 293-303, 2007.

TESSARI, P. et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 19, n. 4, p. 291-302, 2009.

TONGUÇ, M. et al. Changes in seed reserve composition during germination and initial seedling development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Turkish Journal of Biology**, v. 36, n. 1, p. 107-112, 2012.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969.

VARELA-REY, M. et al. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 5, p. 969-976, 2009.

aVOSOUGHKIA, M. et al. Lipid composition and oxidative stability of oils in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed varieties grown in Iran. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 5, p. 897-902, 2011.

bVOSOUGHKIA, M. et al. Evaluation of oil content and fatty acid composition in seeds of different genotypes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **International Journal of Agricultural Science and Research**, v. 2, n. 1, p. 59-66, 2011.

YILMAZ, Y. Review article: fructose in non-alcoholic fatty liver disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 1135-1144, 2012.

ZAKARIA, Z. A. et al. Hepatoprotective activity of dried- and fermented-processed virgin coconut oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, ID 142739, 8 p.

ZHANG, Z. et al. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPAR $\alpha$ , orexin, and ghrelin gene expression of adipocytes in mice. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 3, p. 202-208, 2010.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; SANYAL, A. J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 2, p. 285-300, 2007.

WARNKE, I. et al. Dietary constituents reduce lipid accumulation in murine C3H10 T1/2 adipocytes: A novel fluorescent method to quantify fat droplets. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 30, 2011.

WORTMAN, P. et al. n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, n. 5, 2009.

## ANEXO A

### Normas para publicação – Digestive and Liver Disease

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Digestive and Liver Disease publishes papers reporting basic and clinical research in the field of Gastroenterology and Hepatology:

The Journal's format is in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) and the 2008 guidelines of the Council of Science Editors (CSE) to promote integrity in scientific publications. For details see: External link <http://www.icmje.org/> , External link <http://www.councilscienceeditors.org>

#### CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

##### Original Papers

The maximum length is 3,500 words, excluding the abstract, references, tables and figures. The abstract should be structured and not exceed 200 words.

Randomized clinical trials must be registered and the CONSORT checklist included with the submission.

#### SUBMISSION OF ARTICLES

**NOTE TO AUTHORS: SUBMISSIONS NOT MEETING THE FORMATTING GUIDELINES REQUIREMENTS WILL NOT BE PROCESSED, AND WILL BE SENT BACK TO THE CORRESPONDING AUTHOR FOR CORRECTIONS.**

Submission to Digestive and Liver Disease proceeds totally on-line at External link <http://ees.elsevier.com/dld> . You can track accepted articles at External link <http://www.elsevier.com/trackarticle> , and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more.

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration (in whole or in part) for publication elsewhere, that its publication is approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

##### Electronic format requirements for accepted articles

We accept most word-processing formats, but Word or WordPerfect is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Artwork Instructions.

#### ENGLISH LANGUAGE

Manuscripts must be written in good English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Manuscripts that do not conform to standard English style, usage or grammar will be returned to the Authors for modification prior to scientific review.

**PRESENTATION**

**OF**

**MANUSCRIPTS**

Manuscripts should have wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the Journal to become familiar with layout and conventions.

Values should be expressed in SI and metric system units of measurement. Statistical methods are to be described in detail. If the names of drugs or equipment are used, the name of the manufacturer, town and country should be given.

### **USE OF ABBREVIATIONS**

Title, Abstract, Table headers and Figure legends should not contain abbreviations.

Standard abbreviations may be used in the text; they are to be placed in parentheses after the full term is used for the first time.

All abbreviations contained in the Figures must be explained in the Figure legend, even if already explained in the text.

All abbreviations contained in the Tables must be explained in a footnote below each table, even if already explained in the text.

### **COVER LETTER**

A submission letter to the Editor should be typed in the "Cover Letter" section of the online submission system. It should contain a summary of the strengths of the study, and should state that:

The manuscript has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), and is not under consideration (in whole or in part) for publication elsewhere

The manuscript is approved by all Authors

in case of acceptance of the manuscript the copyright is transferred to Digestive and Liver Disease

### **Each manuscript should be organized in the following order:**

#### **1. Title page:**

Title (this should be clear, descriptive and not exceed 85 characters, including spaces)

Name(s) of Author(s) with their highest earned degrees. Authorship should only be assumed by those workers who have contributed materially to the work and its report. Authorship credit should be based on:

1. substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
3. final approval of the version to be published

Authors should meet conditions 1, 2, and 3. Colleagues who have otherwise assisted or collaborated should be recognized in the Acknowledgement section.

Complete postal address(es) of affiliations

Electronic word count (excluding abstract, references, tables, figures)

Full telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding Author

Present address(es) of Author(s) if applicable complete correspondence address (including postal zip code) and e-mail address to which the proofs should be sent

Source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of the above

#### **2. Abstract:**

This should contain no more than 200 words. For original articles, the abstract should be structured (i.e., divided into six sections Background, Aims, Methods, Results, and Conclusion). Abstracts should briefly describe the problem being addressed in the study, how the study was performed and which measurements were carried out, the most relevant results, and what the Authors conclude from the results.

An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential they must be cited in full without reference to the reference list.

Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

3. Key words: A list of 2-4 words or short phrases not already included in the title should be included after the abstract for indexing purposes.

4. Introduction:

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

5. Materials and Methods:

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Animal studies. Manuscripts reporting experiments using animals must include a statement giving assurance that all animals received humane care and that study protocols comply with the institution's guidelines and animal research laws.

Statistical methods. Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Indicate exact p values (avoid "p=ns"). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the computer software used.

6. Results:

These should be presented precisely, keeping discussion of their importance to a minimum. Do not duplicate information contained in tables and figures.

7. Discussion:

This should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic. Please include the conclusion in this section, unless it is a review article.

8. Appendices:

Identify appendices with capital letters: A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: (Eq. A.1), (Eq. A.2), etc.; in a subsequent appendix, (Eq. B.1) and so forth.

9. Acknowledgements:

This section should acknowledge colleagues who have assisted or collaborated in the study who did not meet full authorship criteria (see Title Page).

10. References:

References should be numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. The format of the references in the bibliography section should conform with the examples provided in *New Engl J Med* 1997;336:309-15.

References with four or more authors, the first three authors only must be listed, followed by et al. E

11. Tables:

Tables should be typed with double spacing each on a separate sheet, numbered consecutively with Arabic numerals, and contain only horizontal lines. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. The text should include references to all tables. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text. Each table should have a brief and self-explanatory title. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters, indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the Journal. Large tables should be avoided, reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

-Tables must be uploaded separately

-There must be no more than a total of 6 figures and tables

#### 12. Illustrations:

All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

Each illustration should have a legend. The legends to all illustrations should be typed on a separate sheet at the end of the manuscript.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the Author contributes the additional cost of reproduction: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

Advice on the preparation of electronic artwork can be found at the following URL: External link <http://elsevier.com/artworkinstructions>

There must be no more than a total of 6 figures and tables

#### 13. Figures and Photographs:

Figures and photographs of good quality should be submitted online as a separate file. Please use a lettering that remains clearly readable even after reduction to about 66%. For every figure or photograph a legend should be provided, legends should be typed double-spaced and numbered consecutively in the order of their citation using Arabic numerals. All Authors wishing to use illustrations already published must first obtain the permission of the Author and publisher and/or copyright holders and give precise reference to the original work. This permission must include the right to publish in electronic media.

#### 14. Footnotes:

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### 15. Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: External link <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

#### 16. Copyright

Authors, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that they are not infringing a copyright. Although in

general Authors may quote from other published works, they should obtain permission from the holder of the copyright if they wish to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the Author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the Author should also be sought. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

### **SUBMISSION CHECKLIST**

Cover Letter to the Editor

Consort Guideline Checklist and Flowchart for randomised controlled trials

Conflict of interest statement including manuscript title and list of coauthors

Check that your manuscript has a Title Page containing Title - Author(s) and Affiliation(s) - Electronic Word Count (excluding abstract and references) - Address, telephone and fax numbers and e-mail of corresponding author - Sources of funding, grant support - Financial Disclosure

Manuscript, proper (double-spaced) - Structured abstract of less than 200 words - Two to four key words - Manuscript length: check maximum word count for each article type - Introduction/Background/Aims - Materials and methods - Results - Discussion - Appendices - Acknowledgements - References - Figure legends

Tables to upload separately

Figures to upload separately (EPS, JPEG or TIFF files)

Permission to reproduce any previously published material and patient permission to publish photographs

### **REVIEW PROCESS**

Authors should be aware that manuscripts will be screened upon submission. Only manuscripts which fully comply with the submission requirements outlined and in which the level of English is of an acceptable standard will enter the peer review process.

First submission. Once successful submission of a manuscript has taken place, an acknowledgement will be sent by e-mail to the corresponding author. The number of the manuscript should be used by the authors in all communications with the Editorial Office. All the manuscripts will be reviewed by the Editors and, in most cases, by other expert reviewers. After review, the corresponding author will be notified by means of a letter of the decision to accept or reject the manuscript for publication. This letter may include reviewers' comments, and will be sent only via email.

Resubmission of manuscripts. Authors may be invited to submit a revised version of the manuscript for further review. This invitation does not imply, in any case, that the revised version will be accepted for publication. Revised manuscripts must be received by the Editorial Office within three months of the date of the first decision, otherwise they will be considered withdrawn. Instructions for resubmission of manuscripts are identical to those for the first submission, with the following additions:

the cover letter must state that the revised manuscript has been modified according to the comments made by the Editor and the Reviewers.

all changes made in the revised manuscript should be underlined or highlighted.

A point by point reply to the Editor's and/or reviewers' criticisms must be uploaded along with the new cover letter, revised manuscript, figures and tables.

### **PROOFS**

One set of proofs will be sent by e-mail to the corresponding Author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, relating to proofs, will be provided by the publisher.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication.

Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.