

MARIANA DE MOURA E DIAS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MARCADORES DE  
OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATAS WISTAR ALIMENTADAS  
COM ÓLEO DE COCO VIRGEM (*Cocos nucifera* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

D541a  
2017  
Dias, Mariana de Moura e, 1992-  
Avaliação da microbiota intestinal e de marcadores de oxidação  
lipídica em ratas Wistar alimentadas com óleo de coco virgem (*Cocos  
nucifera* L.) / Mariana de Moura e Dias. - VIÇOSA, MG, 2017.  
xx, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Óleo de coco. 2. Lipídios - Metabolismo. 3. Digestão -  
Bactérias. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição  
e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

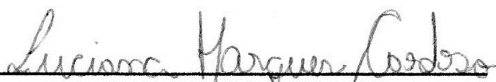
CDD 22 ed. 665.355

MARIANA DE MOURA E DIAS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MARCADORES DE  
OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATAS WISTAR ALIMENTADAS  
COM ÓLEO DE COCO VIRGEM (*Cocos nucifera* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**APROVADA:** 16 de fevereiro de 2017.



Luciana Marques Cardoso



Leandro Licursi de Oliveira  
(Coorientador)



Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação a Deus, a meus pais e a todos que, de alguma forma, colaboraram para que este trabalho fosse concluído.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades a mim concedidas ao longo da vida e por me permitir alcançar mais um objetivo.

Aos meus pais Alexandre e Leci, pelo amor, pelo apoio constante e por serem os melhores exemplos que eu poderia ter.

Às minhas tias Angélica, Beatriz, Clara, Lélia e Ruth, pela torcida e pelas orações para que esta etapa fosse concluída.

Ao Mateus, pela alegria, pelo companheirismo e por acreditar em mim e me estimular a ser sempre uma pessoa melhor.

À minha orientadora Professora Maria do Carmo, por acreditar em meu potencial e pelos conhecimentos a mim transmitidos.

À Nathane, pela amizade, pela disponibilidade e por, gentilmente, dividir este projeto de mestrado comigo.

À Lisiane, pela amizade, pela disponibilidade e por todos os conselhos e ensinamentos.

À Sandra, pela disponibilidade e pelos momentos de descontração e risadas.

Aos “labinenses”, com quem tive o prazer de conviver desde a época da graduação, pela boa convivência durante todos esses anos – Cresci e aprendi muito com todos vocês.

Ao Seu Toninho, pela ajuda quando precisei e pelas risadas constantes no Labin.

Ao Professor Leandro, pela disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos Professores Carla, Manoela e Sérgio, pelos ensinamentos e pela atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas contribuições a esta pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, por permitirem a execução deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, pelo conhecimento transmitido e pelo apoio.

Aos funcionários e membros do Laboratório de Nutrição Experimental, do Laboratório de Análises Clínicas, do Laboratório de Imunologia e Virologia e do Núcleo de Microscopia e Microanálise, em especial ao Roberto e à Michele, pela disponibilidade, pelo apoio e pela paciência quando solicitados.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que conviveram comigo durante esses dois anos, desafiando-me e fazendo-me crescer como pessoa e como profissional – Muito obrigada, de coração! Sem vocês este trabalho não teria sido possível.

*A gratidão é a memória do coração.*

*Ditado francês*

## **BIOGRAFIA**

MARIANA DE MOURA E DIAS, filha de Alexandre de Freitas Dias e Leci Soares de Moura e Dias, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil, em 12 de fevereiro de 1992.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2015.

Em março de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência da Nutrição da UFV – área de concentração em Dietética e Qualidade de Alimentos –, submetendo-se à defesa da Dissertação em fevereiro de 2017.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xvi
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Ácidos graxos de cadeia média e benefícios de seu consumo .....	3
2.2. Óleo de coco: diferencial e ações sobre a saúde .....	5
2.3. Microbiota intestinal e óleo de coco .....	9
2.4. Oxidação lipídica e óleo de coco .....	11
3. OBJETIVOS .....	13
3.1. Geral.....	13
3.2. Específicos .....	13
4. METODOLOGIA .....	14
4.1. Aspectos éticos.....	14
4.2. Material de trabalho .....	14
4.3. Cálculo amostral.....	14

	Página
4.4. Desenho experimental.....	15
4.5. Eutanásia e coleta do material de trabalho.....	17
4.6. Óleos-teste.....	18
4.7. Caracterização da microbiota intestinal.....	19
4.8. Ácidos graxos de cadeia curta.....	23
4.9. Perfil lipídico das fezes.....	24
4.10. Expressão gênica dos marcadores de oxidação lipídica.....	26
4.11. Análises estatísticas.....	27
REFERÊNCIAS.....	29
5. RESULTADOS – Artigo original – Consumo de óleo de coco virgem modula a população bacteriana de <i>Clostridium histolyticum</i> , mas não altera a expressão de marcadores de oxidação lipídica em ratas <i>Wistar</i> .....	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
APÊNDICES.....	60
APÊNDICE A – Cálculo do tamanho amostral.....	61
APÊNDICE B – Cálculo do poder do estudo baseado nos dados encontrados.....	62
APÊNDICE C – Figura suplementar.....	63
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	64

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
Figura 1 – Número de publicações com a palavra-chave <i>coconut oil</i> nos últimos sete Anos .....	6
<b>METODOLOGIA</b>	
Figura 2 – Desenho experimental.....	15
Figura 3 – Exemplo de determinação do controle negativo na análise da caracterização da microbiota intestinal.....	21
Figura 4 – Exemplo de determinação da população bacteriana desejada .....	22
Figura 5 – Exemplo de confirmação da delimitação dos grupos bacterianos baseados na disposição característica de cada grupo.....	23
<b>RESULTADOS</b>	
<b>ARTIGO ORIGINAL</b> – Consumo de óleo de coco virgem modula a população bacteriana de <i>Clostridium histolyticum</i> , mas não altera a expressão de marcadores de oxidação lipídica em ratas Wistar .....	
Figura 1 – Percentual dos maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal de ratas <i>Wistar</i> alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.....	44

Figura 2 – Distribuição percentual dos maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal, de acordo com o consumo de diferentes concentrações de óleo de coco virgem.....	45
Figura 3 – Ácidos graxos de cadeia curta excretados por ratas <i>Wistar</i> alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem .....	46
Figura suplementar 1 – Composição quantitativa dos maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal de ratas <i>Wistar</i> alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.....	57
<b>APÊNDICE C – FIGURA SUPLEMENTAR</b>	
Figura suplementar 1 – Identificação dos componentes para determinação dos grupos bacterianos de interesse .....	63

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>METODOLOGIA</b>	
Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais utilizadas no estudo .....	16
Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos dos óleos-teste utilizados no estudo .....	19
Tabela 3 – Sequência das sondas utilizadas para determinação da microbiota intestinal .....	20
Tabela 4 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para expressão gênica de marcadores oxidativos em tecido hepático .....	27
<b>RESULTADOS</b>	
<b>ARTIGO ORIGINAL</b> – Consumo de óleo de coco virgem modula a população bacteriana de <i>Clostridium histolyticum</i> , mas não altera a expressão de marcadores de oxidação lipídica em ratas Wistar	
Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais utilizadas no estudo .....	39
Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos dos óleos-teste utilizados no estudo .....	40
Tabela 3 – Descrição das sondas utilizadas no estudo.....	41
Tabela 4 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para expressão gênica de marcadores oxidativos em tecido hepático .....	43

Tabela 5 – Perfil lipídico fecal de ratas <i>Wistar</i> alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.....	47
Tabela suplementar 1 – Distribuição do perfil lipídico fecal de ratas <i>Wistar</i> antes e depois do tratamento com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácidos Graxos

AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AGCL – Ácidos Graxos de Cadeia Longa

AGCM – Ácidos Graxos de Cadeia Média

AGI – Ácidos Graxos Insaturados

AGMI – Ácidos Graxos Monoinsaturados

AGPI – Ácidos Graxos Poli-insaturados

AGS – Ácidos Graxos Saturados

AIN – American Institute of Nutrition Rodent Diets

Bac – *Bacteroides-Prevotella*

Bif – *Bifidobacterium* genes

BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária

C8:0 – Ácido Caprílico

C10:0 – Ácido Cáprico

C12:0 – Ácido Láurico

C14:0 – Ácido Mirístico

C14:1 – Ácido Miristoleico

C15:0 – Ácido Pentadecanoico

C15:1 – Ácido Pentadecanoico *cis* 10

C16:0 – Ácido Palmítico

C16:1 – Ácido Palmitoleico

C17:0 – Ácido Pentadecanoico  
C18:0 – Ácido Esteárico  
C18:1 – Ácido Oleico  
C18:2 – Ácido Linoleico  
C18:3 – Ácido Linolênico  
C20:0 – Ácido Araquidônico  
C20:1n9 – Ácido Eicosenoico *cis* 11  
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior  
cDNA – DNA Complementar  
Clos – *Clostridium histolyticum*  
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
CPT-1 – Carnitina palmitoil-transferase 1A  
Cy5 – Carbocianina 5  
DNS – Departamento de Nutrição e Saúde  
EUA – Estados Unidos da América  
FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais  
FITC – Fluoresceína  
Flow-FISH – *Flow Cytometry – Fluorescent In Situ Hybridization*  
g – Gramas  
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
G1 – Grupo Controle – Consumo de 100% da fonte lipídica da dieta advinda de óleo de soja  
G2 – Grupo teste 1 – Consumo de 10,4% da fonte lipídica da dieta advinda de óleo de coco virgem  
G3 – Grupo teste 2 – Consumo de 50,0% da fonte lipídica da dieta advinda de óleo de coco virgem  
G4 – Grupo teste 3 – Consumo de 95,0% da fonte lipídica da dieta advinda de óleo de coco virgem  
HPLC – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência  
IMC – Índice de Massa Corporal  
Lac – *Lactobacillus-Enterococcus*  
LCAT – Lecitina Colesterol Acetiltransferase  
m – Metro  
mg – Miligrama

MG – Minas Gerais  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mRNA – RNA mensageiro  
N<sup>o</sup> – Número  
ng – Nanograma  
nm – Nanômetro  
nM – Nanomolar  
pH – Potencial de Hidrogênio  
PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato 10 mM  
PCR – Técnica em Cadeia da Polimerase  
PPAR- $\alpha$  – Receptor Alfa Ativado de Proliferador de Peroxissomo  
rpm – Rotações por Minuto  
SP – São Paulo  
SPSS – *Software Package Statistical System*  
TH – Temperatura de Hibridização  
UFV – Universidade Federal de Viçosa  
 $\mu$ l – Microlitro  
 $\mu$ m – Micrômetro  
 $\mu$ M – Micromolar

## LISTA DE SÍMBOLOS

® – Marca Registrada

°C – Graus Celsius

## RESUMO

DIAS, Mariana de Moura e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Avaliação da microbiota intestinal e de marcadores de oxidação lipídica em ratas *Wistar* alimentadas com óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.).** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Carla de Oliveira Barbosa Rosa, Leandro Licursi de Oliveira, Manoela Maciel dos Santos Dias e Sérgio Oliveira de Paula.

**Introdução:** O óleo de coco diferencia-se em relação aos demais óleos vegetais em função de suas possíveis propriedades de redução do LDL-colesterol e dos triglicérides, de aumento do HDL-colesterol e de atuação no emagrecimento. A microbiota intestinal, por sua vez, se destaca devido à sua possível participação na regulação do metabolismo corporal, sendo sua composição influenciada pela quantidade e pelo tipo de lipídeo consumido. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do consumo de três diferentes concentrações de óleo de coco virgem sobre a microbiota intestinal e sobre a expressão de marcadores de oxidação lipídica. **Metodologia:** Tratou-se de um estudo experimental controlado, com duração de 10 semanas, em que 32 ratas fêmeas *Wistar* foram divididas em quatro grupos, com oito animais em cada: Grupo controle (G1 – consumo de 100% da fonte lipídica da dieta proveniente de óleo de soja); Grupo teste 1 (G2 – consumo de 10,4% da fonte lipídica da dieta proveniente de óleo de coco virgem); Grupo teste 2 (G3 – consumo de 50% da fonte lipídica da dieta proveniente de óleo de coco virgem); e Grupo teste 3 (G4 – consumo de 95% da fonte lipídica da dieta proveniente de óleo de coco virgem). A

avaliação da caracterização da microbiota intestinal foi feita com o auxílio da metodologia de *Flow Cytometry-Fluorescent In Situ Hybridization*. Através de metodologias específicas, determinaram-se a excreção fecal de ácidos graxos de cadeia curta e o perfil lipídico fecal. Para avaliação da expressão gênica hepática dos marcadores de oxidação lipídica, utilizou-se a metodologia de *real time PCR*.

**Resultados:** O estudo apresentou um poder de 99,5%. Com relação à caracterização da microbiota intestinal, houve redução nas populações de *Clostridium histolyticum* e de bactérias totais no grupo G4 em relação ao G1 ( $p = 0,007$  e  $p = 0,018$ , respectivamente para *Clostridium histolyticum* e bactérias totais) e no grupo G4 em relação ao G2 ( $p = 0,001$  e  $p = 0,046$ , também para *Clostridium histolyticum* e bactérias totais, respectivamente). Diferentemente dos demais, o G4 diferiu-se em relação à distribuição dos grupos bacterianos, com redução na população de *Clostridium histolyticum* em relação à população de *Bacteroides-Prevotella* ( $p = 0,006$ ). Quanto à excreção de ácidos graxos de cadeia curta, observou-se redução na excreção de ácido acético, após o período experimental, em todos os grupos, bem como se verificou diferença na excreção de ácido butírico entre os grupos G3 e G4 ( $p = 0,0038$ ). Quanto ao perfil lipídico fecal, observaram-se maior excreção de ácido mirístico no G1 ( $p = 0,001$ ) e maior excreção de ácido miristoleico no G4 ( $p < 0,001$ ). Não foram encontradas diferenças significativas na expressão hepática dos genes PPAR- $\alpha$  e CPT-1, nos diferentes tratamentos.

**Conclusões:** Os resultados indicaram que o óleo de coco virgem tem potencial para modular positivamente a microbiota intestinal em relação ao filo Firmicutes, o que é interessante, uma vez que indivíduos obesos apresentam maior proporção desse filo. Contudo, não foi possível determinar qual a melhor concentração a ser consumida de óleo de coco virgem para obter benefícios relacionados à modulação da microbiota intestinal e do metabolismo lipídico.

## ABSTRACT

DIAS, Mariana de Moura e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Evaluation of intestinal microbiota and lipid oxidation markers in Wistar rats fed with virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.)**. Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Carla de Oliveira Barbosa Rosa, Leandro Licursi de Oliveira, Manoela Maciel dos Santos Dias and Sérgio Oliveira de Paula.

*Introduction:* Coconut oil stands out in relation to other vegetable oils due to its possible properties of reducing LDL-cholesterol and triglycerides, increasing HDL-cholesterol and acting on weight loss. The intestinal microbiota, in turn, stands out due to its possible participation in the regulation of body metabolism, which is influenced by the amount and the type of lipid consumed. *Objective:* To evaluate the effects of the consumption of three (3) different concentrations of virgin coconut oil on the intestinal microbiota and on the expression of lipid oxidation markers. *Methodology:* This was a controlled experimental study lasting 10 weeks. In this study, 32 female *Wistar* rats were divided into four (4) groups, with eight (8) animals each: Control group (G1 – consumption of 100% of the lipid source of the soybean oil diet); Test group 1 (G2 – consumption of 10.4% of the dietary lipid source from virgin coconut oil); Test Group 2 (G3 – consumption of 50% of the lipid source of the diet derived from virgin coconut oil) and Test Group 3 (G4 – consumption of 95% of the dietary lipid source from virgin coconut oil). The evaluation of the characterization of the intestinal microbiota was done using the methodology of Flow

Cytometry-Fluorescent in Situ Hybridization. Through specific methodologies, fecal excretion of short chain fatty acids and fecal lipid profile were determined. For the evaluation of the hepatic gene expression of lipid oxidation markers, the real time PCR methodology was used. *Results:* The study presented a power of 99.5%. Regarding the characterization of the intestinal microbiota there was a decrease in *Clostridium histolyticum* and total bacterial populations between groups G1 and G4 ( $p = 0.007$  and  $p = 0.018$ , for *Clostridium histolyticum* and total bacteria respectively) and between G2 and G4 groups ( $p = 0.001$  and  $p = 0.046$ , also for *Clostridium histolyticum* and total bacteria respectively). Differently from the others, G4 differed in relation to the distribution of bacterial groups, with a decrease in the population of *Clostridium histolyticum* in relation to the population of *Bacteroides-Prevotella* ( $p = 0.006$ ). As for the excretion of short-chain fatty acids, there was a drop in acetic acid excretion after the experimental period for all groups, as well as a difference in the excretion of butyric acid between groups G3 and G4 ( $p = 0.0038$ ). As for the fecal lipid profile, it was observed a higher excretion of myristic acid in G1 ( $p = 0.001$ ) and greater excretion of myristolic acid in G4 ( $p < 0.001$ ). No significant differences were found in the expression of the PPAR- $\alpha$  and CPT-1 genes among the different treatments. *Conclusions:* The results indicate that virgen coconut oil has the potential to positively modulate the intestinal microbiota in relation to the Firmicutes filo. This is interesting since obese individuals have a higher proportion of this filo. However, it was not possible to determine the best concentration of virgen coconut oil to be consumed in order to obtain benefits related to modulation of intestinal microbiota and lipid metabolism.

## 1. INTRODUÇÃO

O óleo de coco é um óleo vegetal que se diferencia dos demais devido ao seu alto teor de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), que correspondem a aproximadamente 60% de sua composição (MARINA et al., 2009).

Esses ácidos graxos estão relacionados ao aumento da saciedade e à redução do consumo de energia (COLEMAN et al., 2016), bem como à ação antibacteriana contra bactérias patogênicas da microbiota intestinal (HANCZAKOWSKA et al., 2016; HANCZAKOWSKA et al., 2011). Logo, o alto teor de AGCM presente no óleo de coco pode justificar alguns dos benefícios advindos do seu consumo, como redução do perímetro da cintura e do índice de massa corporal (IMC) em mulheres obesas, com 20 a 40 anos de idade, que consumiram 30 mL desse óleo, diariamente, durante 12 semanas (ASSUNÇÃO et al., 2009).

O óleo de coco também apresenta rápido processo oxidativo, constatado em estudo com ratos que consumiram 8% da fonte calórica da dieta advinda desse óleo, durante 45 dias, e obtiveram maiores taxas de  $\beta$ -oxidação mitocondrial. Isso se deve ao fato de os AGCM serem rapidamente absorvidos e metabolizados, bem como transportados diretamente, pela veia porta, até o fígado (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014), o que também pode explicar a redução dos parâmetros relacionados à obesidade (FERREIRA et al., 2014).

Ainda quanto à composição, o óleo de coco apresenta elevado percentual de ácidos graxos saturados (AGS) com aproximadamente 45% de ácido láurico (C12:0), 17% de ácido mirístico (C14:0) e 8% de ácido palmítico (C16:0) (COX et al., 1995).

Contudo, apesar desse elevado conteúdo de AGS, observou-se aumento do HDL colesterol em mulheres obesas que consumiram 30 mL desse produto, durante 12 semanas (ASSUNÇÃO et al., 2009), bem como não foi verificada alteração do perfil lipídico sanguíneo relacionado a risco cardiovascular em pacientes cardíacos estáveis, com consumo de 15% do valor calórico total advindo do óleo de coco, durante um período de dois anos (VIJAYAKUMAR et al., 2016). Provavelmente, tais achados são devidos ao fato de o óleo de coco também possuir componentes antioxidantes em sua composição, como os polifenóis, o  $\beta$ -caroteno e os tocoferóis, que compensam a maior concentração de AGS (JAARIN et al., 2014).

Apesar do potencial promissor, o óleo de coco também apresenta características controversas. Em estudo *crossover*, com homens com sobrepeso que consumiram 10 g de AGCM, o consumo foi considerado seguro (ST-ONGE et al., 2014). Contudo, em estudo com mulheres obesas que consumiram 30 mL de óleo de coco, durante 12 semanas, acredita-se que o aumento da resistência periférica à insulina seja devido ao consumo desse óleo (ASSUNÇÃO et al., 2009).

Amaral e colaboradores (2016) também não observaram diferenças no consumo alimentar de ratos alimentados com dieta cetogênica à base de óleo de coco ou óleo de soja durante oito semanas. No trabalho desses mesmos autores, constatou-se maior perda de peso no grupo que consumiu óleo de soja, o que ressalta os resultados controversos encontrados em estudos com óleo de coco (AMARAL et al., 2016).

Há trabalhos avaliando o consumo de óleo de coco tanto em estudos observacionais quanto experimentais, em diferentes concentrações, verificando-se, em sua maioria, diferenciais positivos desse óleo. Contudo, em meu conhecimento, não existe consenso quanto a uma quantidade padrão a ser ofertada, como também não existem estudos avaliando o papel de diferentes concentrações de óleo de coco virgem sobre a modulação da microbiota intestinal e dos marcadores do processo oxidativo, o que justificou o interesse pela execução desta dissertação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ácidos graxos de cadeia média e benefícios de seu consumo

Denominam-se ácidos graxos de cadeia média (AGCM) aqueles ácidos que contêm de 6 a 12 átomos de carbono (BHATNAGAR et al., 2009; DAYRIT, 2014; ZENTEK et al., 2011). Na década de 1980, apenas ácidos com 8 a 10 átomos de carbono eram considerados como AGCM. Contudo, observou-se que aqueles com 6 a 12 átomos reuniam metabolismo hepático e funções metabólicas e fisiológicas em comum (DAYRIT, 2014), o que justificou a inserção deles nesse grupo.

O consumo dos AGCM pode resultar em diversos benefícios, como redução de parâmetros relacionados à obesidade (ZHANG et al., 2015), aumento da saciedade (ST-ONGE et al., 2014), ação antibacteriana (KIM; RHEE, 2016; ZENTEK et al., 2011), melhora da saúde intestinal (HANCZAKOWSKA et al., 2011; ROSSI et al., 2010) e rápido processo oxidativo (DAYRIT, 2014; ZENTEK et al., 2011).

No que diz respeito à perda de peso, em estudo com camundongos que desenvolveram obesidade com o consumo de dieta *high fat*, por exemplo, observou-se que os animais alimentados com dieta com 2% de AGCM obtiveram menor peso corporal, menor ganho de peso e menor quantidade de tecido adiposo branco, em comparação com os animais que consumiram a mesma concentração de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (ZHANG et al., 2015). Além disso, os animais que consumiram AGCM tiveram maior ativação do tecido adiposo marrom, tanto em

número de células quanto na expressão de genes, o que pode explicar o aumento na termogênese e, por consequência, a redução dos estoques lipídicos e da obesidade (ZHANG et al., 2015).

Em outro estudo, avaliando a redução do apetite mediante o consumo de AGCM, observou-se que homens obesos com consumo de 10 g de AGCM, uma hora antes do almoço, consumiram menos alimento do que aqueles que ingeriram a mesma quantidade de AGCL. Contudo, futuros estudos são necessários para entender como os AGCM conseguem desempenhar tal função (ST-ONGE et al., 2014).

Além dos parâmetros relacionados à perda de peso e ao consumo alimentar, observou-se que os AGCM também apresentam ação antibacteriana. Em estudo que avaliou esse potencial, verificou-se redução no número de *Escherichia coli* O157:H7, tanto na presença de meio de cultura com AGCM isolados, como também em meio com a combinação desses ácidos com outros óleos essenciais, mostrando o potencial e a eficiência dos AGCM para essa função (KIM; RHEE, 2016).

Em estudo com leitões, com sistema imune ainda não completamente formado, observou-se que o consumo de AGCM resultou em ação antibacteriana, bem como permitiu que os animais tivessem maior ganho de peso, o que é indicativo de desenvolvimento para esses animais (HANCZAKOWSKA et al., 2011).

Em relação ao ganho de peso, acredita-se que esse processo não necessariamente se deve ao conteúdo energético dos ácidos graxos e, sim, aos compostos bioativos nele presentes. Afinal, esses compostos permitem melhora intestinal através do crescimento da altura das vilosidades e do aumento da profundidade das criptas, com consequente melhor e maior absorção dos nutrientes (HANCZAKOWSKA et al., 2011).

Similarmente, em estudo com porcos recém-desmamados que consumiram AGCM juntamente com probióticos, durante seis semanas, observaram-se melhor crescimento e aumento na capacidade de digerir nutrientes nos grupos suplementados, em comparação com o controle. Logo, o uso de AGCM e probióticos pode ser uma possível alternativa à utilização de antibióticos para o crescimento dos animais (DEVI; KIM, 2014). Além disso, em Revisão de Literatura, verificou-se que, no caso de porcos, o consumo de AGCM, além do ganho de peso, resulta em ação antimicrobiana (ZENTEK et al., 2011) e preservação da mucosa intestinal (ROSSI et al., 2010), acreditando que essas características são devidas ao metabolismo dos AGCM.

Quanto ao metabolismo, uma das razões para os AGCM apresentarem hidrólise mais rápida é a posição estrutural das cadeias carbônicas, com destaque para a posição 1-3, que permite maior interação entre o ácido graxo e as enzimas lipolíticas (DAYRIT, 2014).

Os AGCM também apresentam maior solubilidade, o que permite que sejam transportados diretamente pela veia porta até o fígado, não sendo necessária a atuação dos sais biliares ou a formação de quilomícrons. Além disso, com destaque para o ácido láurico, observa-se que os AGCM não necessitam de transportadores específicos para serem transportados e oxidados na mitocôndria via  $\beta$ -oxidação. Logo, devido a esse rápido processo oxidativo é que os AGCM são absorvidos e metabolizados mais rapidamente que os AGCL (DAYRIT, 2014; ZENTEK et al., 2011).

Diante do exposto, observa-se que o consumo de AGCM tem interessante potencial em razão, principalmente, do seu metabolismo único e de sua ação antimicrobiana. Logo, o estudo do consumo de fontes de AGCM, como o óleo de coco, é válido para que se avaliem e aproveitem os benefícios desse composto.

## **2.2. Óleo de coco: diferencial e ações sobre a saúde**

Apesar de o consumo de determinado tipo de óleo sofrer influência da tradição, da disponibilidade e de fatores socioeconômicos (VIJAYAKUMAR et al., 2016), observou-se crescente interesse pelo consumo do óleo de coco, haja vista o aumento do número de publicações científicas com essa temática (Figura 1).

Do ponto de vista comercial, bem como da literatura, é possível encontrar o óleo de coco em três formas: óleo de coco virgem, óleo de copra e óleo de coco refinado. O óleo de coco virgem é extraído do leite de coco, o que caracteriza a extração úmida, podendo (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006) ou não ser submetido a aquecimento após esse processo. Esse tipo de óleo não é submetido a processos de refinamento, branqueamento ou desodorização, o que faz que tenha características mais naturais (MARINA et al., 2009).

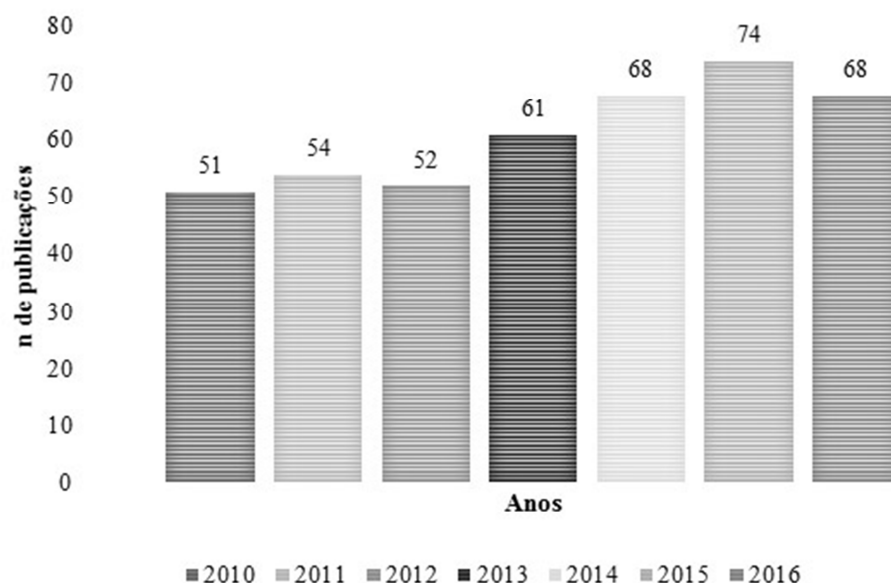


Figura 1 – Número de publicações com a palavra-chave *coconut oil* nos últimos sete anos.

Fonte: PubMed® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=coconut+oil>). Acesso em: 13 Jan. 2017.

O óleo de copra é extraído a partir do endosperma do coco seco, o que caracteriza a extração seca (BHATNAGAR et al., 2009; MARINA et al., 2009; NEVIN; RAJAMOHAN, 2006). Já o óleo de coco refinado, além do processo de extração seca, é submetido a temperaturas mais elevadas que o óleo de coco virgem, bem como passa pelas etapas de refinamento, branqueamento e desodorização. Apesar de essa técnica ser mais artificial, usualmente é a mais empregada (MARINA et al., 2009).

Quanto às características sensoriais, não se observaram grandes diferenças entre os óleos. O virgem apresenta coloração esbranquiçada, sabor doce e acastanhado e odor característico de coco; o de copra possui características semelhantes às do óleo virgem; e o refinado exibe coloração amarelada, gosto não natural e ausência de odor característico (BHATNAGAR et al., 2009; MARINA et al., 2009).

O óleo de coco pode ser classificado como saturado de cadeia média, haja vista sua composição aproximada de 90% de AGS, dos quais 65% são AGCM e apenas 7% de ácidos graxos insaturados (AGI), sendo 6% de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e 1% de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)

(BHATNAGAR et al., 2009; DAYRIT, 2014). Além disso, aproximadamente 50% desse óleo é composto por ácido láurico (DAYRIT, 2014), sendo essa constituição, como abordado no tópico anterior, responsável por algumas das propriedades do óleo de coco como o metabolismo e o transporte característicos.

Em estudo com ratos que consumiram 8% da dieta contendo óleo de coco virgem, observou-se aumento da capacidade antioxidante desses animais, em comparação com os que consumiram óleos de amendoim e de copra. Tal resultado é devido às características metabólicas do óleo de coco virgem, como rápida absorção, transporte e catabolismo, bem como à presença dos compostos antioxidantes (flavonoides e polifenóis) na constituição desse óleo (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006).

Em estudo avaliando diferentes fontes lipídicas, observou-se que o óleo de coco foi o que apresentou menor propensão à peroxidação lipídica, bem como foi capaz de promover estabilidade oxidativa. Ao adicionar óleo de coco ao óleo de arroz refinado e ao óleo de girassol, esses óleos passaram a produzir menos peróxidos do que quando avaliados isoladamente, acreditando-se que a maior estabilidade oxidativa encontrada foi devida às baixas concentrações de AGPI e AGMI e às altas concentrações de AGCM presentes no óleo de coco (BHATNAGAR et al., 2009).

Quanto ao perfil lipídico sanguíneo, em estudo com humanos que consumiram 13 mL de óleo de coco virgem, durante seis meses, observou-se aumento significativo nas concentrações séricas de HDL-colesterol quando comparado com o grupo controle. Esse resultado é devido tanto à presença de polifenóis e vitamina E no óleo de coco virgem quanto também ao aumento da atividade da enzima lecitina colesterol acetiltransferase (LCAT) (CARDOSO et al., 2015).

A LCAT é uma enzima que desempenha papel-chave no metabolismo do HDL colesterol, visto que participa do processo de esterificação do colesterol, permitindo a maturação da partícula de HDL (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2012). Em casos de deficiência da LCAT, o que se observa é o aumento do colesterol na corrente sanguínea, o que pode resultar no processo de aterosclerose (KUNNEN; VAN ECK, 2012). Logo, resultados como os encontrados por Cardoso e colaboradores (2015) reforçam o potencial promissor para o consumo do óleo de coco de forma segura.

Ainda quanto ao perfil lipídico, observou-se que ratos que consumiram dietas com 8% de óleo de coco virgem durante 45 dias obtiveram maiores concentrações séricas de HDL colesterol que os animais alimentados com dietas com a mesma proporção lipídica de óleo de amendoim e de óleo de coco refinado. Além disso, os animais que consumiram óleo de coco virgem apresentaram redução nos valores de triglicérides, colesterol total e LDL colesterol, em comparação com os demais grupos (NEVIN; RAJAMOHAN, 2004).

Neste estudo, acredita-se que o óleo de coco virgem novamente apresentou maior potencial antioxidante, auxiliando na prevenção da oxidação do LDL colesterol, através da inibição das espécies reativas de oxigênio, da ativação do transporte reverso de colesterol e da menor absorção de colesterol pelo intestino (NEVIN; RAJAMOHAN, 2004). Contudo, em estudo avaliando o consumo de óleo de coco e de óleo de soja em concentrações recomendadas e cetogênicas, observou-se que o efeito protetor nos parâmetros lipídicos estava mais relacionado à quantidade do que ao tipo do óleo consumido (AMARAL et al., 2016).

No que diz respeito a parâmetros relacionados à obesidade, em estudo com humanos com consumo de 13 mL de óleo de coco virgem diariamente se observou redução do peso, do IMC, do perímetro do pescoço e da pressão diastólica, após seis meses de tratamento. Acredita-se que os polifenóis presentes no óleo de coco virgem podem ter efeito protetor sobre a pressão sanguínea (CARDOSO et al., 2015). Além disso, para o perímetro da cintura, verificou-se redução significativa no grupo que consumiu o óleo de coco virgem, em comparação com o grupo controle, relacionando-se esse fato à composição rica em AGCM do óleo de coco, o que poderia resultar em menor acúmulo de gordura corporal (CARDOSO et al., 2015).

Em estudo simulando o consumo de uma dieta americana, observou-se que camundongos que consumiram uma dieta *high fat* com 40% de óleo de coco tiveram menor ganho de peso e menor acúmulo de gordura subcutânea e mesentérica do que os dos grupos que consumiram dietas com valores semelhantes de óleo de soja e de frutose (DEOL et al., 2015). Nesse mesmo estudo, positivamente constatou-se que o consumo de óleo de coco após 20 semanas não resultou em diabetes ou em intolerância à glicose, bem como houve redução de fatores pró-inflamatórios, indicando que esse óleo apresenta potencial anti-inflamatório (DEOL et al., 2015).

Esses resultados são interessantes, uma vez que indicaram que os alimentos comumente consumidos (o óleo de soja e a frutose) têm padrão obesogênico,

podendo alterar o metabolismo, bem como desmistificar o fato de o óleo de coco ter potencial maléfico devido à sua constituição rica em AGS (DEOL et al., 2015).

Além das propriedades discutidas, verificou-se que o óleo de coco também possui outras aplicações, como no tratamento da artrite reumatoide (VYSAKH et al., 2014), em biocombustíveis (DEBMANDAL; MANDAL, 2014; QIU et al., 2016), em repelentes e no tratamento de dermatites (DEBMANDAL; MANDAL, 2014).

Logo, o potencial uso seguro do óleo de coco, relacionado à obesidade, ao perfil lipídico e a outras funções, vem sendo consolidado pela literatura, tanto em estudos experimentais quanto observacionais. Apesar do aumento de publicações com essa temática, ainda há muito para ser descoberto, principalmente pelo fato de muitos estudos avaliarem os AGCM isoladamente e não o óleo de coco.

### **2.3. Microbiota intestinal e óleo de coco**

A microbiota intestinal é composta por aproximadamente 100 trilhões de Archaeas e bactérias, sendo a maior parte de bactérias dos filos Bacteroidetes e Firmicutes (TREMAROLI; BACKHED, 2012). O interesse em seu estudo vem aumentando em razão tanto das já conhecidas funções protetoras e estruturais que desempenha (MISHRA; DUBEY, 2016) quanto da consolidação de sua participação na regulação do metabolismo corporal (HEIMAN; GREENWAY, 2016).

A formação da microbiota intestinal inicia-se na vida intrauterina, com influência da microbiota da placenta materna. Posteriormente, o tipo de parto, o tipo de amamentação e a alimentação na primeira infância contribuem para a consolidação de sua constituição (AAGAARD et al., 2014; GUARALDI; SALVATORI, 2012), o que resulta em uma microbiota única para cada indivíduo (TREMAROLI; BACKHED, 2012).

Isso explica por que crianças que apresentam diversificado consumo alimentar possuem também maior diversidade microbiana que adultos (HEIMAN; GREENWAY, 2016).

Quanto ao consumo alimentar, observa-se que dietas *high fat* podem modificar a microbiota intestinal com estímulo ao aumento de bactérias Gram-negativas. Essas bactérias naturalmente possuem lipopolissacarídeo (LPS) (CANI et al., 2008), que é uma molécula proinflamatória que pode levar a quadros de obesidade e de resistência insulínica (CARVALHO et al., 2012; MEMBREZ et al.,

2008). Além disso, em estudo com ratos que desenvolveram obesidade após o consumo de dieta *high fat*, observou-se que a microbiota intestinal apresenta maior proporção do filo Bacteroidetes quando comparado com o filo Firmicutes (CARVALHO et al., 2012; MEMBREZ et al., 2008). Assim, acredita-se que a modulação da microbiota intestinal possa ser uma estratégia futura para o combate e, ou, tratamento da obesidade (CARVALHO et al., 2012; MEMBREZ et al., 2008).

Em estudo *in vitro*, observou-se que o óleo de coco virgem foi capaz de reduzir o crescimento de bactérias patogênicas causadoras de diarreia (*Clostridium difficile*), sendo o ácido láurico apontado como um dos principais responsáveis por esse resultado (SHILLING et al., 2013).

Possíveis mecanismos explicatórios incluem desde a inibição da lipase bacteriana, que inativaria bactérias patogênicas presentes no intestino, até a dissociação em prótons e ânions na membrana das células, o que reduziria o pH intestinal e, por consequência, inativaria as enzimas utilizadas pelas bactérias patogênicas (ZENTEK et al., 2011).

Os AGCM, devido ao seu número de carbonos, são rapidamente absorvidos, atuando principalmente no estômago e no duodeno (ZENTEK et al., 2011). Contudo, a participação dos lipídeos no metabolismo intestinal microbiano pode ser explicada pelo fato de se acreditar que o óleo de coco seja digerido por lipases no trato gastrointestinal e que, após esse processo digestivo, sejam liberados ácidos graxos livres, que podem atuar na inibição do crescimento de bactérias (SHILLING et al., 2013). Além disso, os AGCM são ricos em fitoquímicos, como os flavonoides, acreditando-se que esses compostos possam modular a microbiota intestinal (LI et al., 2009).

A partir de estudos *in vitro*, que avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo de coco e seu papel protetor na colonização bacteriana, estima-se que haja necessidade de consumo diário de 24 g de gordura que contenha ácido láurico, sendo o óleo de coco a principal fonte desse nutriente (SHILLING et al., 2013). Contudo, tal recomendação é baseada em estudo *in vitro*, destacando-se a importância de estudos como este, que avaliam esse possível papel benéfico do óleo de coco em modelo animal e em diferentes concentrações.

## 2.4. Oxidação lipídica e óleo de coco

O processo de acumulação lipídica é decorrente, entre outros, do desbalanço entre o consumo alimentar, a síntese endógena e o catabolismo via  $\beta$ -oxidação (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014). Logo, os próprios ácidos graxos podem participar da regulação do metabolismo lipídico, entre outros, através da modulação da expressão de genes relacionados à lipogênese e à oxidação (COCCIA et al., 2014; FIGUEIREDO-SILVA et al., 2012).

Ao contrário do que antes se imaginava, não apenas os AGPI e os AGMI, mas também os AGS, como os AGCM, apresentam a capacidade de participar do metabolismo lipídico (ŚWIĄTKIEWICZ et al., 2016; TOVAR et al., 2011). Afinal, os AGCM reúnem características metabólicas específicas, anteriormente apresentadas.

Em estudo com animais alimentados com 8% da dieta referente a óleo de coco virgem, por exemplo, observaram-se taxas de  $\beta$ -oxidação mitocondrial e do peroxissomo significativamente maiores nesse grupo, em comparação com outros óleos-teste (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014).

Nesse mesmo estudo, observou-se aumento na expressão gênica hepática de carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) no grupo alimentado com óleo de coco virgem, sendo esse aumento indicativo de aumento de  $\beta$ -oxidação (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014). Esse resultado pode estar relacionado a um aumento na expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa (PPAR- $\alpha$ ), que é um fator de transcrição que atua no controle da oxidação dos lipídeos (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014; TOVAR et al., 2011).

Em estudo de Kersten e colaboradores, também se verificou o papel do PPAR- $\alpha$  no controle do metabolismo lipídico. Camundongos modificados com ausência do gene PPAR- $\alpha$  tiveram aumento do depósito de gordura após o consumo de uma dieta *high-fat*, que continha óleo de coco (KERSTEN et al., 1999). Além disso, os animais com modificação genética tiveram 22% mais gordura acumulada no fígado do que os animais selvagens, o que indica que a ausência do PPAR- $\alpha$  alterou o metabolismo lipídico desses animais (KERSTEN et al., 1999).

O PPAR- $\alpha$  atua no fígado de forma a controlar o armazenamento e a liberação de triglicerídeos, estando a menor expressão desse gene relacionada a uma diminuição da  $\beta$ -oxidação (KERSTEN et al., 1999). De forma similar, os AGCM

também são metabolizados no fígado (FERREIRA et al., 2014). Logo, o papel do PPAR- $\alpha$  pode ser uma das explicações para o fato de o óleo de coco ser usado preferencialmente para produção de energia (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2012) em vez de se acumular na forma de estoque lipídico (FERREIRA et al., 2014; GELIEBTER et al., 1983).

Além de oxidação mais eficiente, o consumo de óleo de coco virgem resulta em menor lipogênese. Em estudo com ratos alimentados com 8% da dieta referente a óleo de coco virgem, observou-se que esses animais tiveram menor atividade de enzimas lipogênicas, em comparação com os animais que consumiram outras fontes lipídicas (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2012). Esse fato também auxilia no entendimento do porquê que o consumo de óleo de coco virgem não resulta em formação de estoques lipídicos.

Apesar de se saber que o óleo de coco virgem apresenta metabolismo oxidativo diferenciado devido à sua alta concentração de AGCM, são poucos os estudos avaliando-o em relação ao processo oxidativo, o que justifica a importância de estudos como esta dissertação.

## OBJETIVOS

### 3.1. Geral

- Avaliar os efeitos do consumo de três diferentes concentrações de óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) sobre a microbiota intestinal e sobre a expressão de marcadores de oxidação lipídica, em ratas *Wistar*.

### 3.2. Específicos

- Padronizar a metodologia de *Flow Cytometry-Fluorescent In Situ Hybridization* (Flow-FISH) para as amostras de fezes animais.
- Avaliar o efeito do consumo de óleo de coco virgem:
  - Na caracterização da microbiota intestinal quanto aos grupos de microrganismos: *Bacteroides-Prevotella*, *Bifidobacterim* genes, *Clostridium histolyticum* e *Lactobacillus-Enterococcus*.
  - Na quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico) das fezes dos animais.
  - No perfil lipídico total das fezes dos animais.
  - Na expressão gênica hepática de marcadores de oxidação dos ácidos graxos (PPAR- $\alpha$  e CPT-1).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Aspectos éticos**

Este projeto é parte integrante de um projeto guarda-chuva, intitulado “Avaliação dos efeitos metabólicos da substituição parcial da fonte lipídica da dieta por óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) em ratas *Wistar*”. O projeto foi previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) e aprovado no dia 17 de março de 2015, sob o número de Protocolo nº 99/2014 (ANEXO 1).

### **4.2. Material de trabalho**

Foram utilizados fezes e tecido hepático de 32 ratas fêmeas, adultas, da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil.

### **4.3. Cálculo amostral**

O tamanho amostral foi calculado como proposto por Mera et al. (1998). Adotou-se como critérios uma diferença de 20% no ganho de peso entre animais alimentados com AGCL e AGCM (GELIEBTER et al., 1983) e um poder estatístico de 98% ( $\alpha \leq 0,02$ ) (APÊNDICE A).

A variável ganho de peso foi escolhida por ser o principal resultado esperado na suplementação com óleo de coco. Os valores utilizados no cálculo foram os do estudo de Geliebter et al. (1983).

#### 4.4. Desenho experimental

Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais, com oito animais cada, que se diferiram de acordo com a dieta recebida (Figura 2).

A duração do experimento foi de 10 semanas, e nesse período os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente controlado com temperatura entre  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Água destilada e dieta foram ofertadas *ad libitum*.

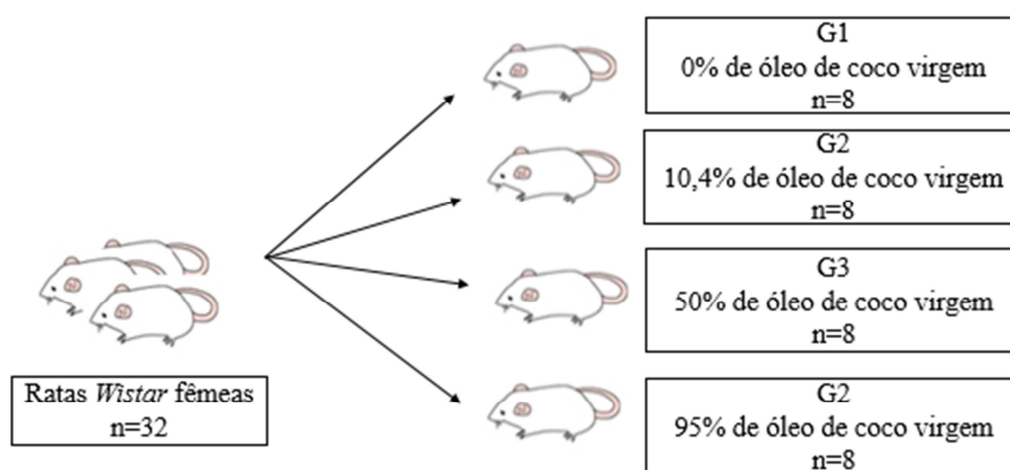


Figura 2 – Desenho experimental.

Todas as dietas ofertadas foram isocalóricas e atenderam à recomendação da AIN-93M (REEVES et al., 1993), diferindo-se apenas em relação às concentrações lipídicas (Tabela 1):

- Grupo Controle (G1): recebeu dieta controle AIN-93M (4,0 g de óleo de soja/100 g de dieta).

- Grupo Teste 1 (G2): recebeu dieta com 10,4% da fonte lipídica proveniente de óleo de coco virgem (0,42 g de óleo de coco virgem + 3,58 g de óleo de soja/100 g de dieta).
- Grupo Teste 2 (G3): recebeu dieta com 50,0% da fonte lipídica proveniente de óleo de coco virgem (2,71 g de óleo de coco virgem + 2,0 g de óleo de soja/100 g de dieta).
- Grupo Teste 3 (G4): recebeu dieta com 95,0% da fonte lipídica proveniente de óleo de coco virgem (4,12 g de óleo de coco virgem + 0,2 g de óleo de soja/100 g de dieta).

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais utilizadas no estudo

Ingrediente (g)*	Grupo			
	1	2	3	4
Amido de milho	46,57	46,57	46,57	46,57
Caseína**	14,00	14,00	14,00	14,00
Amido dextrinizado	15,50	15,50	15,50	15,50
Açúcar refinado	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	4,00	3,58	2,00	0,20
Óleo de coco virgem	0,00	0,42	2,17	4,12
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Mix mineral	3,50	3,50	3,50	3,50
Mix vitamínico	1,00	1,00	1,00	1,00
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Peso final	100,00	100,00	100,17	100,32
Quilocalorias (kcal) totais	37,66	37,66	37,66	37,66

Dietas baseadas na recomendação AIN-93. \*Dietas (g/100 g). \*\*A caseína continha acima de 85% de proteína. G = gramas.

Nos cálculos energéticos, levaram-se em consideração as diferenças entre os valores calóricos de cada óleo. Considerou-se que 1 mL de óleo fonte de AGCL (óleo de soja) forneceu 9,2 Kcal, e 1 mL de óleo fonte de AGCM (óleo de coco virgem) forneceu 8,3 Kcal (BACH et al., 1989; HOAGLAND; SNIDER, 1943).

O grupo 2 consumiu a recomendação do fabricante do óleo de coco virgem (Dr. Orgânico®, Brasil), que sugere para humanos o consumo diário de 25 mL. A conversão desse valor para roedores foi feita com base no percentual de calorias da

dieta provenientes de lipídeos, chegando-se ao valor de 0,42 mL de óleo de coco virgem, o que representa 10,4% do percentual de lipídeos que deve ser consumido por roedores.

O grupo 3 consumiu quantidade intermediária do óleo-teste, ou seja, 50% da fonte lipídica da dieta proveniente do óleo de coco virgem.

O grupo 4 consumiu a máxima quantidade recomendada para roedores, ou seja, 95% da fonte lipídica da dieta proveniente do óleo de coco virgem, visto que para a manutenção dos animais é necessária a oferta de ácidos graxos essenciais (REEVES et al., 1993).

As dietas foram confeccionadas na forma de *pellets* e armazenadas protegidas da luz, em temperatura de refrigeração (0 a 4 °C).

Todo o ensaio e a produção das dietas foram elaborados no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (DNS-UFV). O ensaio foi realizado de acordo com os princípios éticos para o manejo de animais de laboratório.

#### **4.5. Eutanásia e coleta do material de trabalho**

Quinzenalmente, as fezes foram coletadas em tubos estéreis, previamente identificados, e armazenadas a -20 °C, para análises futuras.

No final do experimento, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e anestesiados com isoflurano 3% (Isoflorine<sup>®</sup>, Cristália, Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro acoplado a um cilindro de oxigênio, e, então, sofreram eutanásia. Para isso, os animais foram acondicionados em caixas transparentes vedadas, para a saturação do anestésico e a consequente ampliação da sedação e da anestesia profunda.

Antes da exsanguinação total, os parâmetros fisiológicos e de reflexo foram averiguados para determinar o grau de sensibilidade à anestesia.

A eutanásia ocorreu no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS-UFV), em ambiente tranquilo e adequado, longe do alojamento e de outros animais. Um médico-veterinário estava presente, e a equipe de apoio havia sido previamente treinada. Todo o experimento foi realizado em consonância com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONSEA, 2008).

Similarmente, as fezes do ceco foram coletadas em tubos estéreis, previamente identificados, e armazenadas a -80 °C, para análises futuras.

O tecido hepático foi removido, lavado com solução salina tamponada com fosfato 10 mM (PBS) e armazenado envolto em papel-alumínio a -80 °C, para análises futuras.

#### **4.6. Óleos-teste**

O óleo de coco virgem utilizado para o preparo das dietas foi prensado a frio e adquirido, por doação, da empresa Dr. Orgânico (Porto Feliz, SP, Brasil). Contudo, esta pesquisa não apresenta qualquer conflito de interesse.

O óleo de soja (Soya, BUNGE®, Brasil) foi comprado no comércio local do município de Viçosa, MG, Brasil.

O perfil dos ácidos graxos dos óleos-teste (Tabela 2) foi determinado no Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS-UFV). Utilizou-se a metodologia de Hartman e Lago (HARTMAN; LAGO, 1973), para a saponificação e esterificação dos óleos. As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás (CG-17 Class, Shimadzu®, Japão) equipado com detector de ionização e coluna cromatográfica capilar de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane SP-2560), de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro (ROSA et al., 2012).

A temperatura inicial de leitura foi de 50 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C por minuto até atingir a temperatura de 150 °C. Em seguida, a taxa de aquecimento foi de 4 °C por minuto até atingir a temperatura de 250 °C. A temperatura do injetor foi mantida a 240 °C e a do detector, a 260 °C.

O gás de arraste foi o hidrogênio ultrapuro, razão split 5, e o fluxo da coluna foi de 1,6 mL/min.

A identificação e a quantificação dos ácidos graxos dos óleos-teste foram feitas mediante a comparação com o tempo de retenção do padrão de mistura de ácidos graxos (FAME – Supelco TM de C4:0 a C24:0, Sigma-Aldrich®, EUA).

Os resultados foram expressos em valores percentuais do ácido graxo desejado em relação ao total de ácidos graxos quantificados.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos dos óleos-teste utilizados no estudo

Ácido graxo	Óleo de coco virgem	Óleo de soja
C8:0	5,22	-
C10:0	5,41	-
C12:0	51,64	-
C14:0	19,86	0,04
C16:0	8,82	10,57
C18:0	3,04	4,90
C18:1	5,10	24,10
C18:2	0,70	52,0
C18:3	-	5,86
Total AGCM	62,27	-
Total AGCL	37,60	100
Total AG saturado	94,03	15,55
Total AG monoinsaturados	5,12	24,16
Total AG poli-insaturados	0,69	58,43

C8:0 = ácido caprílico; C10:0 = ácido cáprico; C12:0 = ácido láurico; C14:0 = ácido mirístico; C16:0 = ácido palmítico; C18:0 = ácido esteárico; C18:1 = ácido oleico; C18:2 = ácido linoleico; C18:3 = ácido linolênico; AGCM = ácidos graxos de cadeia média; AGCL = ácidos graxos de cadeia longa; e AG = ácidos graxos. Valores expressos em percentual (%).

#### 4.7. Caracterização da microbiota intestinal

A análise da microbiota intestinal foi realizada pela técnica de *Flow-FISH*, adaptada de Grzekowiak et al. (2012) e Collado et al. (2008).

Alíquotas de 0,3 g de fezes do ceco, congeladas a -80 °C, foram diluídas em solução de FISH-PBS, na proporção de 1:9. Em seguida, foram homogeneizadas em vórtex (Wizard, VELP Scientifica®, Itália) com *beads* de vidro e centrifugadas (centrífuga Z216MK, Hermle/Labnet®, EUA) a 1.500 rotações por minuto (rpm), por 2 min, a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado, *overnight*, a 4 °C, em solução de paraformaldeído 4%.

Em seguida, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 13.000 rpm, por 5 min, a 4 °C, havendo a formação de um pelete. O sobrenadante foi então desprezado e o pelete, ressuspensionado em 1 mL de solução de FISH-PBS filtrada. Esse processo foi repetido três vezes. Na última etapa, o pelete foi ressuspensionado em 150 µl de etanol 96% e armazenado a 4 °C, por 4 h.

Em seguida, passou-se para a etapa de hibridização. Em banho seco (Thermo Mixer, KASVI®, Brasil) a 50 °C, as amostras foram incubadas, *overnight*, em 5 µl de

tampão de hibridização com as sondas específicas (Alpha DNA<sup>®</sup>, Canadá), para os quatro maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal e para as bactérias totais (Tabela 3). As sondas possuíam concentração de 50 ng/μl e eram marcadas com fluoróforo na terminação 5´.

Tabela 3 – Sequência das sondas utilizadas para determinação da microbiota intestinal

Sonda	Sequência	Corante	TH
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FITC	50 °C
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	Cy5	50 °C
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	Cy5	50 °C
His150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	Cy5	50 °C
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	Cy5	50 °C

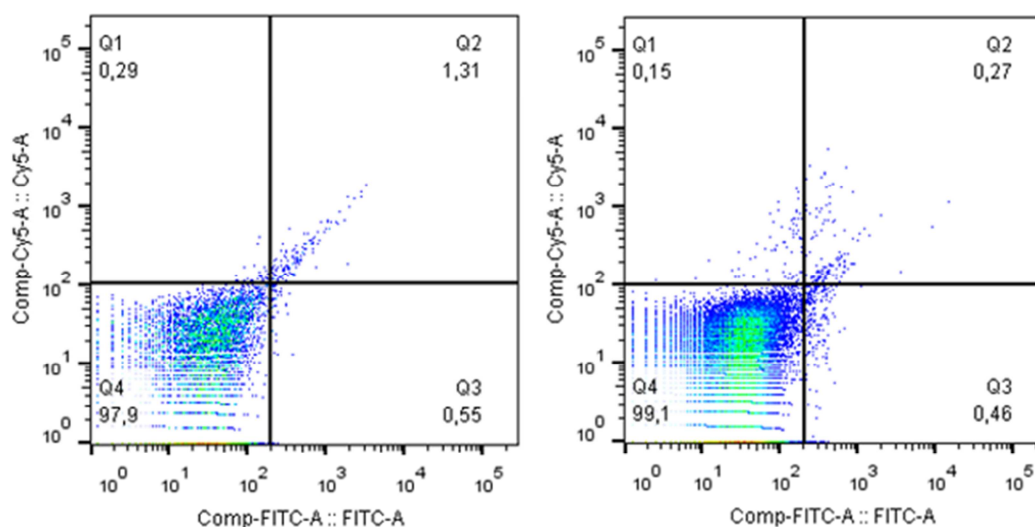
Eub338: sonda para determinação de bactérias totais; Bif164: sonda para determinação de *Bifidobacterium* genes; Bac303: sonda para determinação de *Bacteroides-Prevotella*; Chis150: sonda para determinação de *Clostridium histolyticum* e Lab158: sonda para determinação de *Lactobacillus-Enterococcus*; FITC: corante fluoresceína; Cy5: corante carbocianina 5; e TH: temperatura de hibridização.

Após *overnight*, adicionou-se 1 mL de tampão de hibridização a 50 °C, e mantiveram-se as amostras em banho-seco por mais 45 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.250 rpm, por 15 min, a 21 °C. Retiraram-se 800 μl do sobrenadante, e adicionaram-se 800 μl de tampão FISH-PBS. O processo de centrifugação e a retirada do sobrenadante foram repetidos e as amostras, ressuspendidas em 100 μl de solução de FISH-PBS. As amostras permaneceram em temperatura ambiente e foram protegidas da luz até a leitura dos resultados.

Cada amostra foi avaliada de acordo com o valor de bactérias totais, através da sonda Eub338, marcada com corante fluoresceína (FITC), e o grupo bacteriano desejado, marcado com o corante carbocianina 5 (Cy5), havendo, portanto, dupla marcação. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS-UFV).

A leitura dos resultados foi feita no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, em citômetro de fluxo (FACS Verse, BD<sup>®</sup>, Estados Unidos), com detecção de 50.000 eventos, em fluxo baixo.

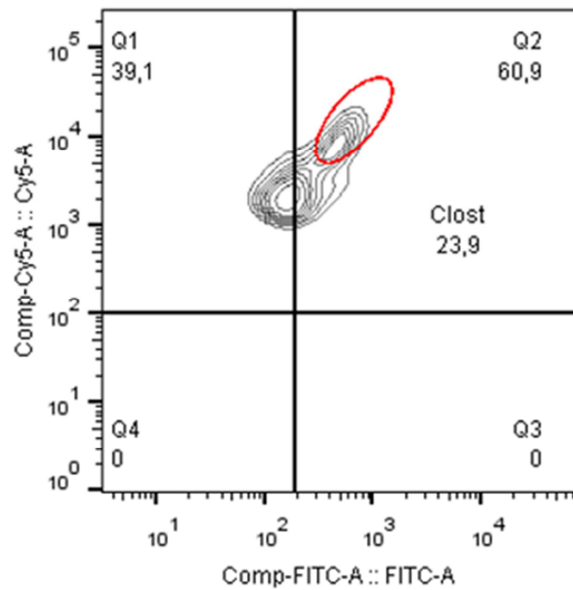
A análise dos dados foi feita com o auxílio do *software* FlowJo, versão vx 0.7 (FLOWJO, 2014). Primeiramente, com base na fluorescência emitida, determinou-se o controle negativo, ou seja, o que não era o grupo bacteriano de interesse (Figura 3).



Q1: primeiro quadrante; Q2: segundo quadrante; Q3: terceiro quadrante; e Q4: quarto quadrante. Com base no tamanho das células ( $<10^2 \mu\text{m}$ ), no Q4 não se encontram as células que compõem a microbiota intestinal, ou seja, o Q4 é o controle negativo da análise. Cada ponto no gráfico corresponde a uma célula.

Figur 3 – Exemplo de determinação do controle negativo na análise da caracterização da microbiota intestinal.

Em seguida, identificaram-se os grupos bacterianos duplamente marcados (Figura 4 e Figura Suplementar 1 – APÊNDICE C), ou seja, aqueles grupos que tinham o núcleo mais à direita do segundo quadrante.



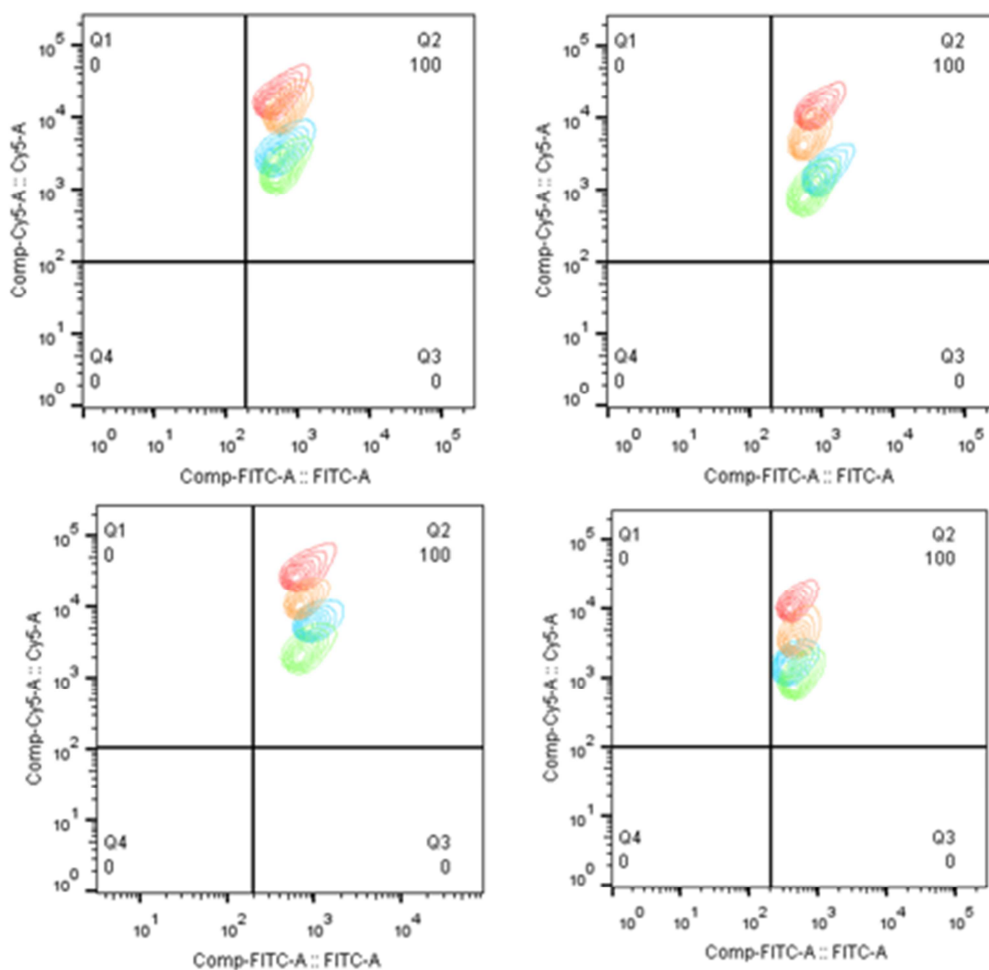
Q1: primeiro quadrante; Q2: segundo quadrante; Q3: terceiro quadrante; Q4: quarto quadrante; Cy5: corante carbocianina 5; FITC: corante fluoresceína; e Clost: *Clostridium histolyticum*. O segundo quadrante é aquele que apresentará a população de células marcada tanto com Cy5 (referente a bactérias totais) quanto com FITC (referente ao grupo bacteriano desejado, no caso Clost). Em vermelho se encontra uma *gate*, ou seja, uma delimitação de um grupo bacteriano baseado em um núcleo central mais à direita. Resultados expressos em percentual.

Figura 4 – Exemplo de determinação da população bacteriana desejada.

A disposição característica de cada grupo também foi respeitada (Figura 5), a fim de assegurar maior certeza em relação ao que estava sendo determinado. Assim, foram excluídos aqueles animais que não apresentaram essa característica.

A contagem dos grupos foi realizada com o auxílio de gráficos com eixos FITC e Cy5 e com a delimitação de *gates*.

Os resultados foram expressos em valores percentuais (qualitativos) e absolutos (quantitativos).



Vermelho: grupo *Bacteroides-Prevotella*; laranja: grupo *Clostridium histolyticum*; azul: grupo *Bifidobacterium* genes; e verde: grupo *Lactobacillus-Enterococcus*. Após a delimitação dos grupos bacterianos pelas *gates*, conferiu-se se a população havia sido corretamente marcada com base na disposição característica de cada grupo. Todos os animais, em todos os grupos, apresentaram essa disposição: 1º vermelho, 2º laranja, 3º azul e 4º verde.

Figura 5 – Exemplo de confirmação da delimitação dos grupos bacterianos, baseados na disposição característica de cada grupo.

#### 4.8. Ácidos graxos de cadeia curta

A extração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi realizada através de metodologia adaptada de Zhao et al. (2006). Para isso, foram homogeneizadas 500 mg de fezes com 5 mL de água Mili-Q, com o auxílio de macerador automático (T10 basic, IKA<sup>®</sup>, Alemanha), e foi adicionado ácido ortofosfórico grau HPLC (Fluka Analytical<sup>®</sup>, EUA) até atingir pH entre 4,5 e 5.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Heracus Megafuge 11R, Thermo Scientific<sup>®</sup>, EUA) a 4 °C, por 20 min, a 4.100 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril limpo e novamente centrifugado (centrífuga modelo Z216MK, Hermle/Labnet<sup>®</sup>, EUA) a 4 °C, por 30 min, a 13.500 rpm. O restante foi descartado.

O sobrenadante foi novamente retirado e filtrado com o auxílio de filtros, de 0,22 µm de porosidade, acoplados a seringas. Em seguida, foi novamente centrifugado (centrífuga Z216MK, Hermle/Labnet<sup>®</sup>, EUA) a 4 °C, por 50 min, a 13.500 rpm. O sobrenadante resultante foi armazenado em *vials*, à temperatura ambiente, até a leitura.

O procedimento de extração dos AGCC ocorreu no Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS-UFV) e a leitura, no Laboratório de Análises Clínicas (DNS-UFV).

Para determinação dos AGCC, as amostras foram aplicadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (SPD-20A VP, Shimadzu<sup>®</sup>, Japão), a 210 nm. O equipamento foi acoplado a um detector ultravioleta e possuía bomba (LC-20AT), forno (CTO 20A), autoinjeter (SIL-20A HT), detector de índice de refração (RID-10A) e desgaseificador (DGU-20A 5R). O módulo de comunicação foi o CBM 20A e o sistema de aquisição, o Lab Solution (Lab Solutions<sup>®</sup>, EUA).

Os ácidos acético, propiônico e butírico foram separados em coluna capilar (modelo VP-ODS/C8/Phenyl, Shimadzu<sup>®</sup>, Japão), com 150 mm por 4,6 mm. O volume injetado de amostra foi de 80 µl, o fluxo de 0,6 mL/minuto, a pressão de gás nitrogênio de 37 kgf, a temperatura do forno de 25 °C e a fase móvel de 1% de ácido ortofosfórico em água.

A identificação e a quantificação dos AGCC foram feitas mediante a comparação com o tempo de retenção dos padrões de ácidos acético, propiônico e butírico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de mg AGCC por mg de fezes.

#### **4.9. Perfil lipídico das fezes**

O perfil lipídico foi determinado a partir de 300 mg de fezes frescas através de protocolos adaptados de Folch et al. (1956), para a extração; e de Hartman e Lago (1973), para a saponificação e esterificação dos lipídeos.

Para a extração, as fezes foram homogeneizadas com macerador automático (T10 basic, IKA<sup>®</sup>, Alemanha), juntamente com 1 mL de solução de clorofórmio:metanol, na proporção de 1:2, com adição posterior de 0,9 mL de metanol puro (Vetec<sup>®</sup>, EUA).

Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3.000 rpm (Heracus Megafuge 11R, Thermo Scientific<sup>®</sup>, EUA), sendo acrescentado ao sobrenadante 0,8 mL de clorofórmio puro (Vetec<sup>®</sup>, EUA) e 0,64 mL de solução de NaCl 0,73%. Novamente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 0,9 mL de solução de Folch, permanecendo o material em estufa semiaberta a 37 °C, *overnight*.

A saponificação e a esterificação foram iniciadas com a adição de 2,4 mL de reagente de saponificação e 6 mL de reagente de esterificação, seguida de aquecimento a 80 °C, por 15 min. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de hexano puro (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) e 3 mL de NaCl 20%. O sobrenadante foi retirado e armazenado em *vials* a -20 °C.

Para a leitura do perfil lipídico, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de hexano e injetadas em sistema Split 10, em cromatógrafo a gás (CG-17 Class, Shimadzu<sup>®</sup>, Japão). Esse aparelho era acoplado a um microcomputador e equipado com detector de ionização e coluna cromatográfica capilar de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane SP-2560), de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro.

A temperatura inicial de leitura foi de 150 °C, com taxa de aquecimento de 4 °C por minuto até atingir a temperatura de 220 °C. A temperatura do injetor foi mantida a 200 °C e a do detector, a 240 °C.

O gás nitrogênio foi utilizado como carreador, com velocidade programada de 43,2 cm por segundo, e o fluxo de gás de arraste foi de 1,0 mL por minuto.

A identificação e a quantificação dos ácidos graxos do conteúdo fecal foram feitas mediante a comparação com o tempo de retenção do padrão de mistura de ácidos graxos (FAME – Supelco TM de C4:0 a C24:0, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA).

Os resultados foram avaliados nos tempos iniciais e finais de estudo, assim como se avaliou a diferença entre esses dois tempos. Os resultados foram expressos em valores percentuais do ácido graxo desejado em relação ao total de ácidos graxos quantificados.

Os procedimentos de extração, saponificação e esterificação foram realizados no Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS-UFV) e a leitura, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), em Viçosa, MG, Brasil.

#### **4.10. Expressão gênica dos marcadores de oxidação lipídica**

A expressão gênica dos marcadores de oxidação lipídica foi medida pela técnica da cadeia em polimerase (PCR), em tempo real.

Para essa análise, utilizou-se tecido hepático de seis animais de cada grupo, totalizando 24 animais, sendo cada animal avaliado em duplicata.

A extração do RNA mensageiro (mRNA) foi feita segundo as recomendações da bula do reagente Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), com posterior avaliação da concentração e da pureza em equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, EUA). Consideraram-se aptos para seguimento da análise aquelas extrações que obtiveram uma razão 260/280, indicativa de pureza acima de 1,8.

Para obtenção do DNA complementar (cDNA), seguiram-se as instruções do *kit* GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription System (A5000, Promega<sup>®</sup>, Brasil). Novamente, a pureza foi avaliada em equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, EUA), considerando-se aptos para seguimento da análise aqueles com razão 260/280 acima de 1,6.

As sequências dos *primers* utilizados neste estudo foram obtidas da literatura e checadas no programa BLAST Assembled Genomes (NCBI, Pubmed<sup>®</sup>, EUA). Os critérios de avaliação das sequências foram verificar se o *primer* era específico para *Rattus norvegicus*, se as sequências eram de mRNA e se apresentavam cobertura de 100% para o marcador desejado (Tabela 4).

Todos os *primers* (IDT<sup>®</sup>, Brasil) apresentavam concentração de 100 µM/mL e diferença máxima de 5 °C entre suas temperaturas de hibridização. Antes do uso, os *primers* foram avaliados quanto à sua especificidade pela curva de *Melting* e em gel de agarose 1,2%. Buscou-se um único pico na curva de *Melting*, o que era indicativo da não produção de dímeros, e também a formação de uma única banda em gel de agarose.

A programação das reações foi de 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 10 seg e 60 °C por 30 seg, 95 °C por 15 seg, 55 °C por 15 seg e 95 °C por 15 seg.

Tabela 4 – Sequência dos *primers* utilizados para expressão gênica de marcadores oxidativos em tecido hepático

Gene	Nº banco de acesso	Sequência
PPAR- $\alpha$	NM_013196.1	Forward: 5'-TCACACAATGCAATCCGTTT-3' Reverse: 5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'
CPT-1	NM_031559.2	Forward: 5'-GGAGACAGACACCATCCAACATA-3' Reverse: 5'-AGGTGATGGACTTGTCAAACC-3'
GAPDH	NM_017008.3	Forward: 5'-GTATCGGACGCCTGGTTAC-3' Reverse: 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'

Nº: número; PPAR- $\alpha$ : receptor alfa de proliferador de peroxissomo ativado; CPT-1: carnitina palmitoil-transferase 1A; e GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Cada reação foi preparada em um volume final de 20  $\mu$ L, contendo 10  $\mu$ L de iTaq universal SYBR Green supermix (Bio Rad<sup>®</sup>, EUA), 2  $\mu$ L de *primer* na concentração de 200 nM/ $\mu$ L e 1  $\mu$ L de cDNA na concentração de 500 ng/ $\mu$ L. O restante do volume foi preenchido com água de injeção.

As análises foram realizadas em termociclador Eco (Illumina<sup>®</sup>, EUA), e as quantidades relativas de mRNA foram avaliadas de acordo com o método  $\Delta\Delta$ ct. Os resultados foram expressos em relação ao gene endógeno (GAPDH) e ao grupo controle.

As etapas de extração do mRNA e de obtenção do cDNA foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS-UFV), enquanto as demais foram feitas no Laboratório de Imunologia e Virologia (Departamento de Biologia Geral-UFV).

#### 4.11. Análises estatísticas

Os dados foram analisados de acordo com a normalidade, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

A comparação entre os resultados pré e pós-tratamento, dentro de um mesmo grupo, foi realizada através do teste *t* pareado, para amostras com distribuição paramétrica, e do teste *t* de Wilcoxon, para amostras com distribuição não paramétrica. Havendo diferença, esta era calculada entre os tempos finais e iniciais.

Posteriormente, analisou-se se havia diferença entre os quatro grupos experimentais. Para isso, utilizou-se o teste de análise de variância (*one way*

ANOVA), seguido do teste complementar de comparações múltiplas de Tukey, para os dados com distribuição paramétrica; e o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste complementar de comparações múltiplas de Dunn's, para os dados com distribuição não paramétrica.

Valores *outliers* foram excluídos nas análises de perfil lipídico fecal e de extração de AGCC, chegando-se a um número amostral mínimo de seis animais por grupo. Contudo, ao considerar esse atual número amostral, calculou-se o poder do estudo (MERA et al., 1998), baseado na diferença entre os grupos bacterianos totais, sendo encontrado um poder de 99,5% (APÊNDICE B).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software Package Statistical System 20.0 for Windows Evaluation Version* (SPSS, 2010), assumindo-se um  $p < 0,05$ .

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão, para os dados com distribuição paramétrica, e em mediana  $\pm$  intervalo interquartilico, para os dados com distribuição não paramétrica.

## REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 65, n. 237, p. 1-11, 2014.

AMARAL, A. et al. Analysis of sub-chronic coconut oil consumption in rats meal with different lipid ratios in the diet. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 716-720, 2016.

ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Virgin coconut oil improves hepatic lipid metabolism in rats – compared with copra oil, olive oil and sunflower oil. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, p. 802-809, 2012.

ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Influence of virgin coconut oil-enriched diet on the transcriptional regulation of fatty acid synthesis and oxidation in rats - a comparative study. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1782-1790, 2014.

ASSUNÇÃO, M. L. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. **Lipids**, v. 44, p. 593-601, 2009.

BACH, A. C.; FREY, A.; LUTZ, O. Clinical and experimental effects of mediumchain-triglyceride-based fat emulsions – A Review. **Clinical Nutrition**, v. 8, p. 223-235, 1989.

BHATNAGAR, A. S. et al. Fatty acid composition, oxidative stability, and radical scavenging activity of vegetable oil blends with coconut oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 86, n. 10, p. 991-999, 2009.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic diet – Induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, 2008.

CARDOSO, D. A. et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutricion Hospitalária**, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, 2015.

CARVALHO, B. M. et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2823-2834, 2012.

COCCIA, E. et al. Fatty acid-specific alterations in leptin, PPAR $\alpha$ , and CPT-1 gene expression in the rainbow trout. **Lipids**, v. 49, n. 10, p. 1033-1046, 2014.

COLEMAN, H.; QUINN, P.; CLEGG, M. E. Medium-chain triglycerides and conjugated linoleic acids in beverage form increase satiety and reduce food intake in humans. **Nutrition Research**, p. 526-533, 2016.

COLLADO, M. C. et al. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 894-899, 2008.

CONSEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Lei no 11794**, de 8 de outubro de 2008. Brasília, Brasil.

COX, C. et al. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. **Journal of Lipid Research**, v. 36, p. 1787-1795, 1995.

DAYRIT, F. M. Lauric acid is a medium-chain fatty acid, coconut oil is a medium-chain triglyceride. **Philippine Journal of Science**, v. 143, n. 2, p. 157-166, 2014.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.

DEOL, P. et al. Soybean oil is more obesogenic and diabetogenic than coconut oil and fructose in mouse: Potential role for the liver. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-31, 2015.

DEVI, S. M.; KIM, I. H. Effect of medium chain fatty acids (MCFA) and probiotic (*Enterococcus faecium*) supplementation on the growth performance, digestibility and blood profiles in weanling pigs. **Veterinarni Medicina**, v. 59, n. 11, p. 527-535, 2014.

FERREIRA, L. et al. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, p. 1-8, 2014.

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.

- FLOWJO. **FlowJo, LLC Data Analysis Software**. Ashland, OR, USA, 2014.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, p. 497-509, 1956.
- GELIEBTER, A. et al. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 1-4, 1983.
- GRZEKOWIAK, Ł. et al. Distinct gut microbiota in southeastern african and northern european infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, p. 812-816, 2012.
- GUARALDI, F.; SALVATORI, G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-4, 2012.
- HANCZAKOWSKA, E. et al. Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets. **Livestock Science**, v. 192, p. 1-7, 2016.
- HANCZAKOWSKA, E.; SZEWCZYK, A.; OKON, K. Effects of dietary caprylic and capric acids on piglet performance and mucosal epithelium structure of the ileum. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 20, p. 545-554, 2011.
- HEIMAN, M. L.; GREENWAY, F. L. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 5, p. 317-320, 2016.
- HOAGLAND, R.; SNIDER, G. G. Digestability of certain higher saturated fatty acids and triglycerides. **Journal of Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 219-225, 1943.
- JAARIN, K. et al. Potential role of virgin coconut oil in reducing cardiovascular risk factors. **Experimental & Clinical cardiology**, v. 20, n. 8, p. 3399-3410, 2014.
- KERSTEN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates the adaptive response to fasting. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p. 1489-1498, 1999.
- KUNNEN, S.; VAN ECK, M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? **The Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1783-1799, 2012.
- LI, H. et al. Traditional chinese medicine: balancing the gut ecosystem. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1332-1335, 2009.
- MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 481-487, 2009.

MEMBREZ, M. et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 2416-2426, 2008.

MERA, R.; THOMPSON, H.; PRASAD, C. How to calculate sample size for an experiment: a case-based description. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 87-91, 1998.

MISHRA, A. K.; DUBEY, V. Obesity: An overview of possible role(s) of gut hormones, lipid sensing and gut microbiota. **Metabolism**, v. 65, p. 48-65, 2016.

NEVIN, K. G.; RAJAMOCHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 830-835, 2004.

NEVIN, K. G.; RAJAMOCHAN, T. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. **Food Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 260-266, 2006.

QIU, T. et al. The synthesis of biodiesel from coconut oil using novel Bronsted acidic ionic liquid as green catalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 296, p. 71-78, 2016.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. 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.

ROSA, D. D. et al. Fish oil improves the lipid profile and reduces inflammatory cytokines in Wistar rats with precancerous colon lesions. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 4, p. 569-579, 2012.

ROSSI, R. et al. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, n. 1-2, p. 1-11, 2010.

SHILLING, M. et al. Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 12, p. 1079-1085, 2013.

SPSS. **Software Package Statistical System, 20.0 for Windows Evaluation Version**. Chicago, Illinois, EUA, 2010.

ST-ONGE, M.-P. et al. Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 10, p. 1134-1140, 2014.

ŚWIĄTKIEWICZ, M. et al. The effect of dietary fatty acid composition on adipose tissue quality and expression of genes related to lipid metabolism in porcine livers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 204-215, 2016.

TOVAR, A. R. et al. Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 6, p. 540-553, 2011.

TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, p. 242-249, 2012.

VIJAYAKUMAR, M. et al. A randomized study of coconut oil versus sunflower oil on cardiovascular risk factors in patients with stable coronary heart disease. **Indian Heart Journal**, v. 68, p. 498-506, 2016.

VYSAKH, A. et al. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **International Immunopharmacology**, v. 20, p. 124-130, 2014.

ZENTEK, J. et al. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 83-93, 2011.

ZHANG, Y. et al. Original article medium-chain triglyceride activated brown adipose tissue and induced reduction of fat mass in c57bl/6j mice fed high-fat diet. **Biomed Environ Sci.**, v. 28, n. 2, p. 97-104, 2015.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JONSSON, J. A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 674-682, 2006.

## 5. RESULTADOS

### ARTIGO ORIGINAL – Consumo de óleo de coco virgem modula a população bacteriana de *Clostridium histolyticum*, mas não altera a expressão de marcadores de oxidação lipídica em ratas *Wistar*

#### Resumo

**Introdução:** Com composição rica em ácidos graxos de cadeia média e ácidos graxos saturados, o óleo de coco apresenta potencial para redução de peso corporal devido ao seu metabolismo lipídico característico. Além disso, o consumo de diferentes concentrações e fontes lipídicas pode levar à modulação da microbiota intestinal e, desse modo, influenciar um quadro de manutenção da eutrofia ou de ganho de peso. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do consumo de diferentes concentrações de óleo de coco virgem sobre a microbiota intestinal e o metabolismo lipídico. **Metodologia:** Ratas fêmeas *Wistar* foram divididas em quatro grupos (n = 8) e alimentadas com três diferentes concentrações de óleo de coco (10,4%, 50% e 95% da fonte lipídica da dieta) e com óleo de soja, durante 10 semanas. A microbiota intestinal foi avaliada em relação aos grupos bacterianos *Bacteroides-Prevotella*, *Bifidobacterium* genes, *Clostridium histolyticum* e *Lactobacillus-Enterococcus*. A excreção de ácidos graxos de cadeia curta e o perfil lipídico fecal foram quantificados, e a expressão gênica dos marcadores de oxidação lipídica PPAR e CPT-1 foi determinada. **Resultados:** Observou-se redução na população de *Clostridium histolyticum* e de bactérias totais no grupo G4 em relação ao G1 (p = 0,007 e p = 0,018, para as populações de *Clostridium histolyticum* e de bactérias

totais, respectivamente) e no grupo G4 em relação ao G2 ( $p = 0,001$  e  $p = 0,046$ , para as populações de *Clostridium histolyticum* e de bactérias totais, respectivamente). Diferentemente dos demais, o G4 se diferiu em relação à distribuição dos grupos bacterianos, com redução na população de *Clostridium histolyticum* em relação à de *Bacteroides-Prevotella* ( $p = 0,006$ ). Quanto à excreção de AGCC, observou-se menor excreção de ácido butírico no grupo G4 em relação ao G3 ( $p = 0,0038$ ) e, quanto ao perfil lipídico fecal, notou-se menor excreção de C14:0 no grupo G4 em relação aos demais ( $p = 0,001$ ). Não foram encontradas diferenças na excreção de ácidos graxos saturados e na expressão dos genes PPAR- $\alpha$  e CPT-1 entre os diferentes tratamentos. **Conclusão:** Os resultados apontaram para um possível efeito modulador benéfico do óleo de coco virgem sobre a microbiota intestinal. Contudo, não foi possível identificar qual é a concentração de óleo de coco virgem ideal de ser consumida, considerando os benefícios relacionados à modulação da microbiota intestinal e ao metabolismo lipídico.

**Palavras-chave:** Óleo de coco virgem, *Cocos nucifera* L., ácidos graxos de cadeia média, microbiota intestinal, metabolismo lipídico.

## Abstract

**Introduction:** With a composition rich in medium chain fatty acids and saturated fatty acids, coconut oil has potential to reduce body weight due to its lipid characteristic. In addition, the consumption of different concentrations an lipid sources may lead to modulation of the intestinal microbiota, and thereby influence a maintenance of eutrophic or weight gain. **Objective:** To evaluate the effects of the consumption of different concentrations of virgin coconut oil in the intestinal microbiota and lipid metabolism. **Methods:** Female *Wistar* rats were divided into 4 groups (n = 8) and fed with three different concentrations of coconut oil (10.4%, 50% and 95% of the dietary lipid source) and soybean oil, for 10 weeks. The intestinal microbiota was evaluated in relation to the bacterial groups *Bacteroides-Prevotella*, *Bifidobacterium* genes, *Clostridium histolyticum* and *Lactobacillus-Enterococcus*. The excretion of short chain fatty acids and the fecal lipid profile were quantified, and the gene expression of lipid oxidation markers PPAR and CPT-1 were evaluated. **Results:** The study presented a power of 99.5%. It was observed a decrease in the population of *Clostridium histolyticum* and total bacteria among G1 and G4 (p=0.007 and p=0.018, respectively to *Clostridium histolyticum* and total bacteria ) and among G2 and G4 (p=0.001 and p=0.046, respectively to *Clostridium histolyticum* and total bacteria). Differently from the others, G4 differed in relation to the distribution of bacterial groups, with a decrease in the population of *Clostridium histolyticum* in relation to the population of *Bacteroides-Prevotella* (p = 0.006). As for the excretion of AGCC, there was lower excretion of butyric acid in the G4 group compared to G3 (p = 0.0038) and, in relation to the fecal lipid profile, there was lower excretion of C14: 0 in the G4 group in relation to (P = 0.001). . No significant

differences were found in the excretion of saturated fatty acids and in the expression of the PPAR- $\alpha$  and CPT-1 genes among the different treatments. **Conclusion:** The results showed that virgin coconut oil may have possible positive modulating effect on the intestinal microbiota. However it is not possible to identify the ideal concentration of coconut oil to be consumed, for benefits related to modulation of the intestinal microbiota and lipid metabolism.

**Keywords:** Virgin coconut oil, *Cocos nucifera* L., medium chain fatty acid, intestinal microbiota, lipid metabolism.

## **Introdução**

Diferentemente dos demais óleos vegetais, o óleo de coco apresenta elevada concentração de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e de ácidos graxos saturados (AGS) (ASSUNÇÃO et al., 2009; MARINA et al., 2009). Contudo, apesar de sua composição, estudos relatam que o consumo desse óleo pode resultar em melhora de parâmetros relacionados à obesidade, como na redução de colesterol total e de triglicerídeos (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2012; ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014; COX et al., 1995; NEVIN; RAJAMOHAN, 2004), no aumento do HDL-colesterol (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2012; ASSUNÇÃO et al., 2009; FERANIL et al., 2011), na prevenção da resistência insulínica e da hiperglicemia (NARAYANANKUTTY et al., 2016) e na perda de peso (ASSUNÇÃO et al., 2009; COLEMAN et al., 2016; ST-ONGE et al., 2014).

A obesidade é considerada uma doença multifatorial (ABESO, 2016), e já se sabe que indivíduos obesos apresentam microbiota intestinal característica (CARVALHO et al., 2012; MEMBREZ et al., 2008), o que indica uma associação entre ambos (FERNANDES et al., 2014). Assim, as funções do intestino não se resumem aos processos de digestão, absorção e excreção. Além de ser importante órgão imunológico, ele abriga a microbiota intestinal, que vem sendo considerada fator-chave para um metabolismo saudável (RIAL et al., 2016; VIANA et al., 2016).

A microbiota pode ser alterada pela fonte (CAO et al., 2014; HIDALGO et al., 2014) e pela quantidade de lipídeo consumida (CAO et al., 2014), ou seja, os

lipídeos podem atuar como possível modulador da microbiota intestinal (HEIMAN; GREENWAY, 2016; VIANA et al., 2016).

Especificamente, quanto ao óleo de coco, sua capacidade modulatória pode estar relacionada à sua composição rica em AGCM, que apresenta metabolismo mais rápido que os demais ácidos graxos (FERREIRA et al., 2014; COCCIA et al., 2014; ZENTEK et al., 2011). Contudo, segundo meu conhecimento, não existem estudos avaliando o potencial modulatório do óleo de coco sobre a microbiota intestinal, bem como não se sabe se o consumo de diferentes concentrações desse óleo apresenta características similares ou não.

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar se o consumo de três diferentes concentrações de óleo de coco virgem modula a microbiota intestinal e modifica a expressão de marcadores de oxidação lipídica.

## **Metodologia**

### **Aspectos éticos e desenho experimental**

O projeto deste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, sob o número de Protocolo nº 99/2014. Tratou-se de um estudo experimental com 32 ratas fêmeas, da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV.

Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos experimentais, com oito ratas cada, que se diferiram de acordo com a dieta consumida (Tabela 1): Grupo 1 (G1): consumo de dieta controle AIN-93M (REEVES et al., 1993); Grupo 2 (G2): consumo de 10,4% da fonte lipídica da dieta proveniente de óleo de coco; Grupo 3 (G3): consumo de 50% da fonte lipídica da dieta proveniente do óleo de coco; e Grupo 4 (G4): consumo de 95% da fonte lipídica da dieta proveniente do óleo de coco.

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais utilizadas no estudo

Ingredientes (g)*	Grupos			
	1	2	3	4
Amido de milho	46,57	46,57	46,57	46,57
Caseína**	14,00	14,00	14,00	14,00
Amido dextrinizado	15,50	15,50	15,50	15,50
Açúcar refinado	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	4,00	3,58	2,00	0,20
Óleo de coco	0,00	0,42	2,17	4,12
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Mix mineral	3,50	3,50	3,50	3,50
Mix vitamínico	1,00	1,00	1,00	1,00
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Peso final	100,00	100,00	100,17	100,32
Kilocalorias totais	37,66	37,66	37,66	37,66

Dietas baseadas na recomendação AIN-93. \*Dietas (g/100 g). \*\*A caseína continha acima de 85% de proteína. g: gramas.

A duração do experimento foi de 10 semanas, e nesse período os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura entre 21 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Água destilada e dieta foram ofertadas *ad libitum*. Após esse período, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, anestesiados com isoflurano 3% (Isoflorine<sup>®</sup>, Cristália, Brasil), utilizando-se circuito simples com fluxômetro acoplado a um cilindro de oxigênio, e, então, sofreram eutanásia. O processo foi realizado em consonância com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONSEA, 2008). Coletaram-se fezes e conteúdo cecal, armazenados a -20 °C e -80 °C, respectivamente; e tecido hepático, lavado com solução salina tamponada com fosfato 10 mM (PBS) e armazenado envolto em papel-alumínio, a -80 °C.

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

### Origem e composição dos óleos-teste

O óleo de coco prensado a frio foi adquirido, por doação, da empresa Dr. Orgânico (Porto Feliz, SP, Brasil), e o óleo de soja (Soya, BUNGE<sup>®</sup>, Brasil) foi comprado no comércio local (Viçosa, MG, Brasil).

A composição dos óleos (Tabela 2) foi determinada no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, por meio de metodologia previamente padronizada (ROSA et al., 2012).

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos dos óleos-teste utilizados no estudo

Ácido graxo	Óleo de coco	Óleo de soja
C8:0	5,22	-
C10:0	5,41	-
C12:0	51,64	-
C14:0	19,86	0,04
C16:0	8,82	10,57
C18:0	3,04	4,90
C18:1	5,10	24,10
C18:2	0,70	52,0
C18:3	-	5,86
Total AGCM	62,27	-
Total AGCL	37,60	100
Total AG saturado	94,03	15,55
Total AG monoinsaturados	5,12	24,16
Total AG poli-insaturados	0,69	58,43

C8:0 = ácido caprílico; C10:0 = ácido cáprico; C12:0 = ácido láurico; C14:0 = ácido mirístico; C16:0 = ácido palmítico; C18:0 = ácido esteárico; C18:1 = ácido oleico; C18:2 = ácido linoleico; C18:3 = ácido linolênico; AGCM = ácidos graxos de cadeia média; AGCL = ácidos graxos de cadeia longa; e AG = ácidos graxos. Valores expressos em percentual (%).

### Caracterização da microbiota intestinal

A caracterização da microbiota intestinal foi realizada pela técnica de *Flow Cytometry-Fluorescent In Situ Hybridization* (Flow-FISH), adaptada de Collado et al. (2008) e Grzekowiak et al. (2012).

Sondas (Alpha DNA<sup>®</sup>, Canadá) (Tabela 3) foram utilizadas para hibridizar os grupos bacterianos desejados.

Tabela 3 – Descrição das sondas utilizadas no estudo

<b>Grupo bacteriano</b>	<b>Identificação sonda</b>	<b>Sequência</b>	<b>Corante</b>
Bactérias totais	Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FITC
<i>Bifidobacterium</i> genes	Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	Cy5
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	Cy5
<i>Clostridium histolyticum</i>	Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	Cy5
<i>Lactobacillus-Enterococcus</i>	Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	Cy5

FITC: fluoresceína; e Cy5: carbocianina 5.

Todas as amostras foram duplamente marcadas, objetivando identificar tanto bactérias totais quanto o grupo bacteriano de interesse. As sondas apresentavam concentração de 50 ng/μL e marcação com fluoróforo na terminação 5'. A temperatura de hibridização foi de 50 °C.

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo (BD FACS Verse, BD®, Estados Unidos), com detecção de 50 mil eventos por segundo, em fluxo baixo, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

A análise dos dados foi feita com o auxílio do *software* FlowJo, versão vx 0.7 (FLOWJO, 2014), analisando-se os dados tanto em valores percentuais (análise qualitativa) quanto em valores absolutos (análise quantitativa).

### **Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo fecal**

A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi realizada com amostras do conteúdo fecal, através de metodologia adaptada de Zhao et al. (2006).

Para a leitura dos resultados, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (SPD-20A VP, Shimadzu®, Japão), a 210 nm. Os AGCC foram separados em coluna capilar (modelo VP-ODS/C8/Phenyl, Shimadzu®, Japão), com 150 por 4,6 mm. O volume injetado de amostra foi de 80 μl, o fluxo de 0,6 mL/minuto, a pressão de gás nitrogênio de 37 kgf, a temperatura do forno de 25 °C e a fase móvel de 1% de ácido ortofosfórico em água. Esse processo foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

A identificação e quantificação dos AGCC foram feitas mediante comparação com o tempo de retenção dos padrões de ácidos acético, propiônico e butírico (Sigma-Aldrich®, EUA).

## Determinação do perfil lipídico fecal

O perfil lipídico fecal foi determinado através de metodologias adaptadas (ROSA et al., 2012) de Folch et al. (1956), para a extração; e de Hartman e Lago (1973), para saponificação e esterificação dos lipídeos.

A leitura foi realizada em cromatógrafo a gás (CG-17 Class, Shimadzu®, Japão), com coluna cromatográfica capilar de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane SP-2560), de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Viçosa, MG, Brasil.

A temperatura inicial de leitura foi de 150 °C, com taxa de aquecimento de 4 °C por minuto até atingir a temperatura de 220 °C. A temperatura do injetor foi mantida a 200 °C e a do detector, a 240 °C.

A identificação e quantificação dos ácidos graxos foram feitas através de comparação com o tempo de retenção do padrão de mistura de ácidos graxos (FAME – Supelco TM de C4:0 a C24:0, Sigma-Aldrich®, EUA).

## Expressão de marcadores de oxidação lipídica

A expressão gênica hepática dos marcadores de oxidação lipídica foi determinada pela técnica da cadeia em polimerase (PCR) em tempo real, em seis animais de cada grupo, em duplicata.

A extração do RNA mensageiro (mRNA) foi feita segundo as recomendações da bula do reagente Trizol (Invitrogen®, EUA) e a obtenção do DNA complementar, através de instruções do “kit” GoScript™ Reverse Transcription System (A5000, Promega®, Brasil). Os *primers* (IDT®, Brasil) visaram determinar a expressão gênica dos marcadores PPAR- $\alpha$ , CPT-1 e GAPDH (Tabela 4).

Cada reação teve um volume final de 20  $\mu$ L, contendo 10  $\mu$ L de iTaq universal SYBR Green supermix (Bio Rad®, EUA), 2  $\mu$ L de *primer* na concentração de 200 nM/ $\mu$ L e 1  $\mu$ L de cDNA na concentração de 500 ng/ $\mu$ L. O restante do volume foi preenchido com água estéril.

A programação das reações foi de 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 10 seg e 60 °C por 30 seg, 95 °C por 15 seg, 55 °C por 15 seg e 95 °C por 15 seg, sendo a fluorescência detectada após o último ciclo.

Tabela 4 – Sequência dos *primers* utilizados para expressão gênica de marcadores oxidativos em tecido hepático

Gene	Nº banco de acesso	Sequência
PPAR- $\alpha$	NM_013196.1	Forward: 5'-TCACACAATGCAATCCGTTT-3' Reverse: 5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'
CPT-1	NM_031559.2	Forward: 5'-GGAGACAGACACCATCCAACATA -3' Reverse: 5'-AGGTGATGGACTTGTCAAACC-3'
GAPDH	NM_017008.3	Forward: 5'-GTATCGGACGCCTGGTTAC-3' Reverse: 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'

Nº: número; PPAR- $\alpha$ : receptor alfa de proliferador de peroxissomo ativado; CPT-1: carnitina palmitoil-transferase 1A; e GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

As análises foram realizadas em termociclador Eco (Illumina<sup>®</sup>, EUA), no Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral da UFV. As quantidades relativas de mRNA foram avaliadas de acordo com o método  $\Delta\Delta$ ct.

### Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os que apresentaram distribuição paramétrica, a comparação entre os quatro grupos experimentais foi realizada pelo teste de análise de variância (*one way* ANOVA), seguido do teste complementar de comparações múltiplas de Tukey; e, para os dados com distribuição não paramétrica, o teste realizado foi de Kruskal Wallis, seguido do teste complementar de comparações múltiplas de Dunn's.

Para comparação entre os tempos iniciais e finais de intervenção, foram realizados o teste *t* pareado, para amostras com distribuição paramétrica; e o teste *t* de Wilcoxon, para amostras com distribuição não paramétrica.

Valores *outliers* foram excluídos nas análises de perfil lipídico fecal e de quantificação de ácidos AGCC, chegando-se a um número amostral mínimo de seis animais por grupo. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software Package Statistical System 20.0 for Windows Evaluation Version* (SPSS, 2010), assumindo-se um  $p < 0,05$ .

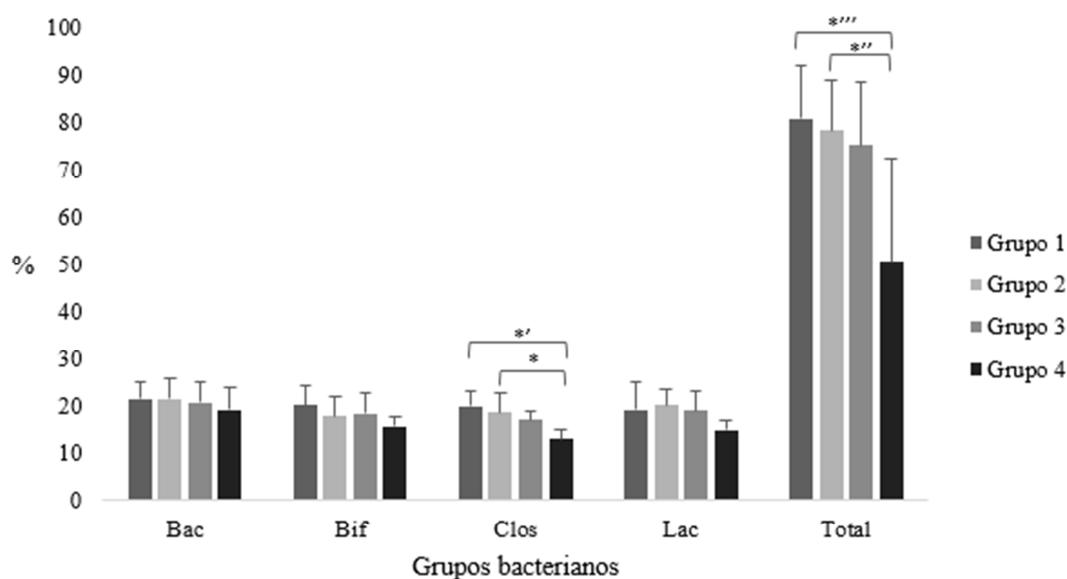
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão, para os dados com distribuição paramétrica; e em mediana  $\pm$  intervalo interquartilico, para os dados com distribuição não paramétrica.

## Resultados

Este estudo apresentou poder de 99,5%. Para isso, consideraram-se o número amostral de seis animais por grupo e a diferença significativa entre o G1 e o G4, para bactérias totais, na análise da caracterização da microbiota intestinal.

### Microbiota intestinal

Houve diminuição qualitativa na população de *Clostridium histolyticum* no G4 em relação ao G1 ( $p = 0,007$ ) e no G4 em relação ao G2 ( $p = 0,001$ ). Redução similar também foi observada na população de bactérias totais no G4 em relação ao G1 ( $p = 0,018$ ) e no G4 em relação ao G2 ( $p = 0,046$ ) (Figura 1).

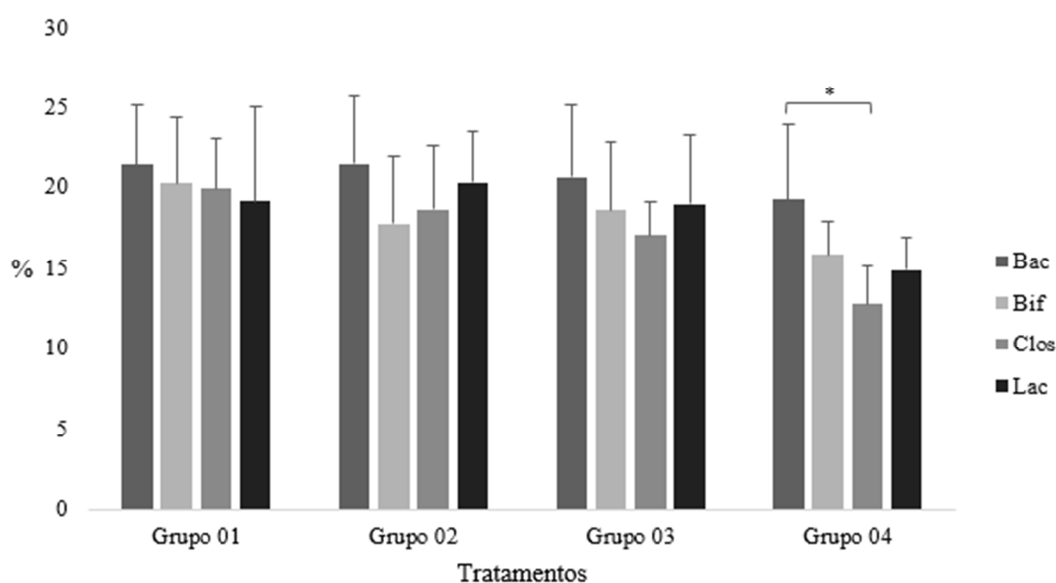


Grupo 1: grupo controle ( $n = 8$ ); Grupo 2: consumo de 10,4% de óleo de coco ( $n = 8$ ); Grupo 3: consumo de 50% de óleo de coco ( $n = 8$ ); Grupo 4: consumo de 95% de óleo de coco ( $n = 7$  para Bac; e  $n = 6$  para os demais grupos bacterianos); foram considerados *outliers* valores referentes à mediana  $\pm 1,5$  intervalo interquartilico; Bac: *Bacteroides-Prevotella*; Bif: *Bifidobacterium* genes; Clos: *Clostridium histolyticum*; Lac: *Lactobacillus-Enterococcus*; Total: somatório de Bac, Bif, Clos e Lac. Valores percentuais expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. ANOVA *one way* seguida de teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas (\*:  $p = 0,001$ ; \*\*:  $p = 0,007$ ; \*\*\*:  $p = 0,046$ ; e \*\*\*\*:  $p = 0,018$ ).

Figura 1 – Percentual dos maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal de ratas *Wistar* alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.

Quantitativamente, também houve diferenças no grupo *Clostridium histolyticum* entre o G2 e o G3 ( $p = 0,013$ ) e entre o G2 e o G4 ( $p = 0,027$ ), sendo observada redução na população microbiana à medida que se consumiu maior quantidade de óleo de coco virgem (Figura Suplementar 1).

Ao analisar os grupos-teste isoladamente, observou-se que no G1, G2 e G3 não houve diferença significativa em relação à distribuição dos quatro grupos bacterianos avaliados. Contudo, no grupo G4 notou-se redução na população de *Clostridium histolyticum* em relação à população de *Bacteroides-Prevotella* ( $p = 0,006$ ) (Figura 2).

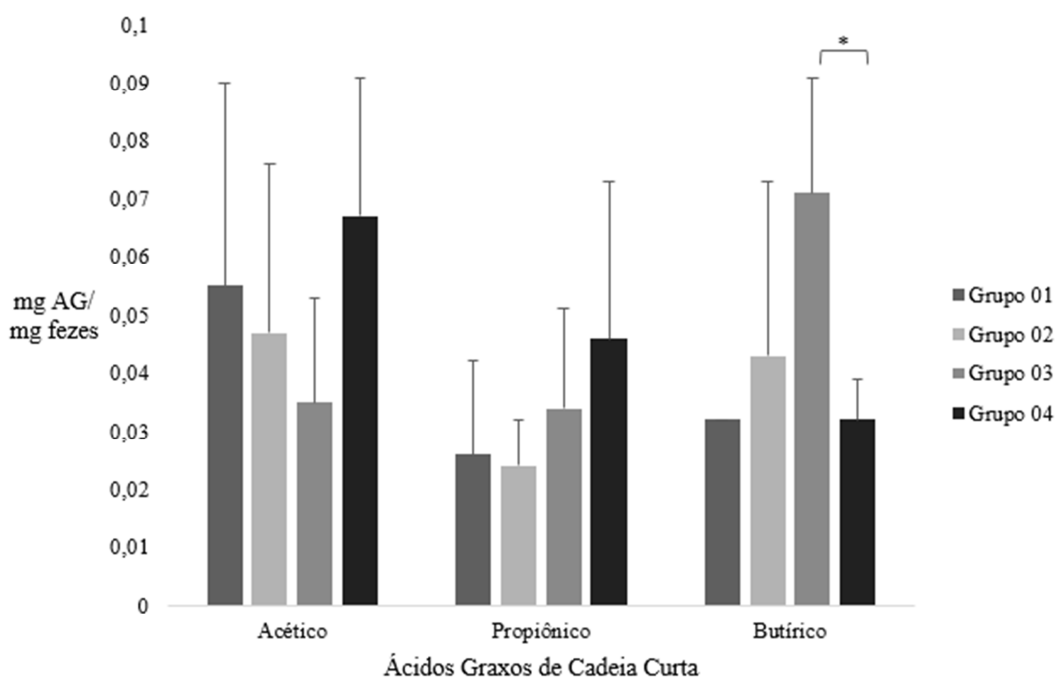


Grupo 1: grupo controle ( $n = 8$ ); Grupo 2: consumo de 10,4% de óleo de coco ( $n = 8$ ); Grupo 3: consumo de 50% de óleo de coco ( $n = 8$ ); Grupo 4: consumo de 95% de óleo de coco ( $n = 7$  para Bac;  $n = 6$  para os demais grupos bacterianos); foram considerados *outliers* valores referentes à mediana  $\pm 1,5$  intervalo interquartil; Bac: *Bacteroides-Prevotella*; Bif: *Bifidobacterium* genes; Clos: *Clostridium histolyticum*; e Lac: *Lactobacillus-Enterococcus*. Valores percentuais expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. ANOVA *one way* seguida de teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas (\*:  $p = 0,006$ ).

Figura 2 – Distribuição percentual dos maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal, de acordo com o consumo de diferentes concentrações de óleo de coco virgem.

## Produção dos ácidos AGCC do conteúdo cecal

Após o período experimental, houve menor excreção de ácido acético nos grupos G1 ( $p = 0,009$ ), G2 ( $p = 0,008$ ), G3 ( $p = 0,029$ ) e G4 ( $p = 0,001$ ) e de ácido propiônico nos grupos G2 ( $p < 0,001$ ) e G4 ( $0,006$ ). Contudo, diferenças entre os grupos foram observadas apenas no ácido butírico (Figura 3), entre o G3 e o G4 ( $p = 0,0038$ ).



Grupo 1: consumo de óleo de soja como fonte lipídica ( $n = 8$ ); grupo G2: consumo de 10,4% de óleo de coco ( $n = 7$  para propiônico e  $n = 8$  para acético e butírico); Grupo G3: consumo de 50% de óleo de coco ( $n = 7$  para propiônico e  $n = 8$  para acético e butírico); e Grupo G4: consumo de 95% de óleo de coco ( $n = 7$  para butírico e  $n = 8$  para acético e propiônico). Módulo da diferença entre os valores iniciais e finais, expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Teste ANOVA *one way* seguido do teste *post hoc* Tukey. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas (\*:  $p = 0,0038$ ).

Figura 3 – Ácidos graxos de cadeia curta excretados por ratas *Wistar* alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.

## Perfil lipídico fecal

Após o período experimental, observaram-se diferenças no perfil lipídico fecal mediante o consumo tanto de óleo de soja quanto das diferentes concentrações de óleo de coco (Tabela Suplementar 1). Além disso, avaliando comparativamente o

consumo dos óleos para os AGS, observou-se diferença significativa quanto ao ácido mirístico (C14:0), com o grupo que consumiu óleo de soja apresentando maior excreção desse ácido que os demais grupos ( $p = 0,001$ ).

Para os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), a excreção de ácido miristoleico (C14:1) e de ácido eicosenoico cis (C20:1n9) ( $p < 0,0001$ ) se diferiu, com aumento da excreção de C14:1 no grupo que consumiu 95% de óleo de coco ( $p < 0,001$ ). Para os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), houve diferença na excreção de ácido linoleico (C18:2) entre os grupos G2 e G4 ( $p = 0,010$ ), com aumento da excreção no grupo que consumiu maior quantidade de óleo de coco (Tabela 5).

Tabela 5 – Perfil lipídico fecal de ratas *Wistar* alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem

Perfil lipídico	Tecido fecal				p
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
C14:0	0,73±0,38 <sup>a</sup>	0,36±0,14 <sup>b</sup>	0,31±0,22 <sup>b</sup>	0,17±0,18 <sup>b</sup>	0,001
C15:0	2,95±1,46	2,98±0,56	3,21±0,79	2,83±1,01	0,900
C16:0	3,54±15,04	3,78±5,02	4,51±1,91	2,27±2,71	0,157*
C17:0	1,71±0,71	1,18±0,48	1,54±0,55	1,05±0,51	0,106
C18:0	7,03±6,59	5,90±6,96	8,06±5,43	2,68±2,53	0,324
C20:0	0,49±0,96	0,91±0,37	0,46±0,38	0,31±0,36	0,071*
<b>AGS</b>	5,42±30,63	4,77±12,42	7,08±25,60	0,80±2,60	0,080*
C14:1	1,31±0,67 <sup>a</sup>	1,06±0,56 <sup>a</sup>	1,97±0,72 <sup>a</sup>	3,25±1,41 <sup>b</sup>	<0,001
C15:1	6,57±3,20	5,65±1,60	6,26±1,58	5,60±3,08	0,831
C16:1	1,19±0,91	0,83±0,41	1,69±0,67	1,70±0,94	0,087
C18:1	15,47±8,19	17,57±1,55	15,23±7,25	15,04±7,20	0,880
C20:1n9	0,24±0,30 <sup>a</sup>	1,79±0,63 <sup>bc</sup>	0,95±0,63 <sup>ac</sup>	1,41±0,75 <sup>c</sup>	<0,001
<b>AGMI</b>	6,31±23,55	8,91±5,31	11,05±12,38	6,48±5,58	0,220*
C18:2	14,95±2,52 <sup>abc</sup>	13,24±4,27 <sup>b</sup>	17,22±1,82 <sup>abc</sup>	18,29±2,38 <sup>c</sup>	0,010
C18:3	1,12±0,51	2,47±11,97	2,41±3,39	1,83±2,36	0,264*
C20:2	1,95±1,88	1,31±1,03	0,90±1,01	0,69±1,39	0,117*
<b>AGPI</b>	12,93±4,98	12,56±9,33	18,94±5,70	14,76±3,63	0,062

Grupo 1: consumo de óleo de soja como fonte lipídica (n = 8, exceto para C18:2, C18:3 e C20:1n9, em que n = 7); Grupo G2: consumo de 10,4% de óleo de coco (n = 8, exceto para C18:1, em que n = 7); Grupo G3: consumo de 50% de óleo de coco (n = 8, exceto para C16:0, C17:0, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1n9 e C20:2, em que n = 7); Grupo G4: consumo de 95% de óleo de coco (n = 8, exceto para C14:0, C16:0, C18:0, C18:3, C20:0, AGS, em que n = 7); AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; C14:0: ácido mirístico; C14:1: ácido miristoleico; C15:0: ácido pentadecanoico; C15:1: ácido pentadecanoico cis 10; C16:0: ácido palmítico; C16:1: ácido palmitoleico; C17:0: ácido pentadecanoico; C18:0: ácido esteárico; C18:1: ácido oleico; C18:2: ácido linoleico; C18:3: ácido linolênico; C20:0: ácido araquidônico; e C20:1n9: ácido eicosenoico cis 11. Valores expressos em média ± desvio-padrão ou mediana ± intervalo interquartil. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os grupos ( $p' < 0,05$ ; Teste ANOVA seguido do Tukey e do \* teste Kruskal Wallis).

## Expressão de marcadores de oxidação lipídica

Não se observaram diferenças significativas na expressão dos genes PPAR- $\alpha$  e CPT-1 entre os quatro grupos-teste avaliados.

## Discussão

A ausência de diferenças entre três dos quatro grupos bacterianos da microbiota intestinal pode ser explicada pelo fato de a composição da microbiota intestinal ser mais influenciada pelos carboidratos, que foram fornecidos igualmente a todos os grupos-teste. Afinal, os carboidratos têm o potencial de promoverem a fermentação microbiana e, com isso, modificarem parte da microbiota intestinal (BAUER et al., 2006). Contudo, para o grupo bacteriano *Clostridium histolyticum*, observou-se redução no G4 em relação aos demais grupos-teste. Similarmente, ao se analisar o grupo G4 separadamente, também se observou menor população de *Clostridium histolyticum* em relação ao grupo *Bacteroides-Prevotella*.

Resultado semelhante foi encontrado por Hanczakowska e colaboradores, que observaram redução significativa na população de *Clostridium perfringens*, no conteúdo cecal de porcos recém-desmamados que consumiram ácido caprílico (C8:0), um AGCM presente no óleo de coco (HANCZAKOWSKA et al., 2016).

O grupo *Clostridium histolyticum*, juntamente com o grupo *Lactobacillus-Enterococcus*, faz parte do filo Firmiculis, e, em estudos avaliando a microbiota intestinal, através de técnicas de metagenômica, foi observado que os obesos apresentaram maior população desse filo que os eutróficos (LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006). Desse modo, entende-se que o consumo de 95% de óleo de coco virgem modulou positivamente a microbiota intestinal, devido à diminuição da população de um grupo bacteriano do filo Firmiculis.

Esse resultado corrobora estudos anteriores, em que o óleo de coco resultou em melhora de parâmetros relacionados à obesidade, como redução do perímetro da cintura e aumento do HDL colesterol (ASSUNÇÃO et al., 2009; CARDOSO et al., 2015). Contudo, neste estudo também se avaliou o grupo *Lactobacillus-Enterococcus*, não tendo sido observadas diferenças significativas em relação a esse grupo. Assim, seria interessante também realizar a avaliação de espécies bacterianas

de ambos os grupos, a fim de identificar espécies patogênicas e obter um resultado mais completo em relação a essa temática.

O metabolismo dos AGCM presentes no óleo de coco virgem também poderia ser considerado fator positivo para indivíduos obesos. Segundo a literatura, o óleo de coco é rapidamente metabolizado e apresenta maior taxa de catabolismo do que de esterificação, ou seja, o óleo de coco apresenta menor propensão de se armazenar no tecido adiposo (BAUER et al., 2006; FERREIRA et al., 2014; RIAL et al., 2016). O óleo de coco virgem utilizado neste estudo apresenta aproximadamente 19% de ácido mirístico, com a ressalva de que positivamente se observou menor excreção de C14:0 nos grupos alimentados com óleo de coco virgem, o que sugere que os animais alimentados com esse óleo tiveram uma oxidação mais eficiente desse ácido graxo. Contudo, não foram observadas diferenças significativas ao se compararem a expressão gênica hepática de marcadores de oxidação lipídica, ou seja, o óleo de coco virgem, independentemente de sua concentração, não foi metabolizado mais rapidamente que o óleo de soja.

Resultado similar foi obtido por Clevenger e colaboradores, que não encontraram diferenças no efeito térmico da refeição e na oxidação dos substratos energéticos, em um estudo do tipo *crossover*, com mulheres obesas, na pré-menopausa, que consumiram refeições *high fat* ricas em AGS, AGMI e AGPI. Apesar de neste estudo o óleo de coco ter sido um dos constituintes da refeição rica em AGS, ele não se diferiu dos demais óleos quanto ao metabolismo pós-prandial (CLEVENGER et al., 2015).

Os AGCM apresentam potencial antimicrobiano (PENG; LONG, 2014; RIAL et al., 2016), devido à sua capacidade de causar lise e desestabilização da membrana celular (BAUER et al., 2006). Contudo, neste estudo não foram avaliadas espécies bacterianas patogênicas, não se podendo afirmar que o consumo de óleo de coco virgem foi positivo em relação a essa característica.

O que se observou foi que, apesar de ausência de diferenças estatísticas nos grupos *Bacteroides-Prevotella*, *Bifidobacterium* genes e *Lactobacillus-Enterococcus*, houve redução no percentual microbiano de bactérias totais, à medida que se aumentou o consumo de óleo de coco virgem, o que pode ser indicativo da capacidade antimicrobiana dos AGCM desse óleo.

Esse resultado também pode ser indicativo de uma modulação negativa, com perda de diversidade microbiana causada pelo consumo de 95% da fonte lipídica da

dieta advinda de óleo de coco virgem. Logo, uma vez que a diversidade da microbiota intestinal é determinada pela diversidade alimentar e indivíduos saudáveis possuem maior diversidade microbiana (BAUER et al., 2006; HEIMAN; GREENWAY, 2016), o uso de diferentes fontes lipídicas é mais interessante que a restrição a uma única fonte.

Um dos indicativos de uma microbiota intestinal saudável é a produção de AGCC, uma vez que estes atuam como combustível para os colonócitos, mantendo a barreira gastrointestinal seletiva e íntegra (RIAL et al., 2016).

Neste estudo, observou-se redução na produção de AGCC após o consumo de diferentes concentrações de óleo de coco virgem, o que é negativo, visto que os AGCC são importantes metabólitos participantes de processos fisiológicos em diferentes órgãos corporais (McFARLANE; McFARLANE, 2011). Contudo, os resultados são controversos, já que o grupo controle, com consumo de óleo de soja, também teve redução na excreção de ácido acético.

Em estudo com indivíduos obesos e eutróficos, observou-se que os primeiros apresentaram maior excreção de AGCC, o que indica que a menor excreção encontrada neste estudo possa ser positiva (FERNANDES et al., 2014). Possíveis explicações para esse fato são a composição da microbiota intestinal, que em indivíduos obesos apresenta maior proporção do filo Firmicutes; a baixa capacidade de absorver e utilizar os AGCC como fonte de energia em indivíduos obesos; e as próprias características da dieta consumida (FERNANDES et al., 2014).

Acredita-se que, devido à maior produção de AGCC, possa também haver maior fermentação microbiana e a energia advinda desse processo fermentativo possa contribuir para o maior ganho de peso em indivíduos obesos (TURNBAUGH et al., 2006). Logo, neste estudo, entende-se que a menor excreção de ácido butírico no grupo que consumiu 95% de óleo de coco virgem se deva à redução da população de *Clostridium histolyticum*.

Hanczakowska et al. (2016) também não encontraram diferenças na excreção de AGCC após o consumo de AGCM, justificando-se tal fato devido à rápida absorção dos AGCM, o que não resultou em alterações no pH intestinal.

Em casos de eutrofia, acredita-se que mudanças na composição dietética podem levar a resultados mais rápidos e claros quanto aos parâmetros de obesidade, uma vez que indivíduos eutróficos não apresentam comorbidades relacionadas à obesidade (CLEVINGER et al., 2015). Esse fato justifica o porquê de se explicar o

potencial do óleo de coco virgem na obesidade neste estudo, realizado com ratos saudáveis.

Segundo meu conhecimento, positivamente esse é o primeiro estudo a avaliar, comparativamente, o consumo de diferentes concentrações de óleo de coco virgem como possível modulador da microbiota intestinal, bem como é o primeiro a encontrar resultados modulatórios em nível de grupos bacterianos.

Como perspectivas futuras, seria interessante analisar a permeabilidade intestinal, visto que o óleo de coco virgem, utilizado neste estudo, é composto majoritariamente por AGS, destacando-se o ácido láurico (C12:0). Acredita-se que esse tipo de ácido pode agir semelhantemente ao lipopolissacarídeo (LPS), que é um constituinte das bactérias Gram-negativas, levando a um quadro de inflamação por ativação do *toll like receptor 4* (TLR-4) (ROCHA et al., 2016). Nesse sentido, os AGS podem ter papel modulador maléfico sobre a microbiota intestinal, sendo interessante futuros estudos nessa temática.

## **Conclusão**

Os resultados apontaram que o óleo de coco virgem pode ter algum efeito modulador sobre o filo Firmicutes, podendo ser seu consumo benéfico para indivíduos obesos. Porém, não há evidências que justifiquem o consumo de determinada concentração de óleo de coco em detrimento de outra. Assim, mais estudos são necessários para avaliar o diferencial metabólico desse óleo em relação aos demais AGCM, bem como o papel do consumo desse óleo como agente antimicrobiano e modulatório da microbiota intestinal.

Sugerem-se, portanto, estudos futuros complementares aos resultados encontrados que comparem o óleo de coco virgem com os AGCM, bem como a análise de espécies bacterianas patogênicas ao se avaliar a microbiota intestinal.

## **Agradecimentos**

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, pela disponibilidade de suas instalações para a leitura dos resultados de determinação dos ácidos graxos de cadeia curta.

Ao Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral da UFV, pela disponibilidade de suas instalações para as análises de *real time* PCR.

Ao Laboratório de Nutrição Experimental do DNS/UFV, pela disponibilidade de suas instalações para realização do experimento.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela disponibilidade de suas instalações para realização das análises de microbiota intestinal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado para MMD e, juntamente com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento desta pesquisa.

## Referências

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade**. 4. ed. São Paulo, Brasil: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2016.

ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Virgin coconut oil improves hepatic lipid metabolism in rats – Compared with copra oil, olive oil and sunflower oil. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, p. 802-809, 2012.

ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Influence of virgin coconut oil-enriched diet on the transcriptional regulation of fatty acid synthesis and oxidation in rats – A comparative study. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1782-1790, 2014.

ASSUNÇÃO, M. L. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. **Lipids**, v. 44, p. 593-601, 2009.

BAUER, E. et al. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. **Nutrition Research Review**, v. 19, n. 1, p. 63-78, 2006.

CAO, Z. J. et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on gut microbiota and endotoxin levels in portal vein of rats fed with high-fat diet. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. **Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 36, n. 4, p. 496-500, 2014.

CARDOSO, D. A. et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutricion Hospitalária**, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, 2015.

CARVALHO, B. M. et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2823-2834, 2012.

CLEVENGER, H. C.; STEVENSON, J. L.; COOPER, J. A. Metabolic responses to dietary fatty acids in obese women. **Physiology & Behavior**, v. 139, p. 73-9, 2015.

COCCIA, E. et al. Fatty acid-specific alterations in leptin, PPAR $\alpha$ , and CPT-1 gene expression in the rainbow trout. **Lipids**, v. 49, n. 10, p. 1033-1046, 2014.

COLEMAN, H.; QUINN, P.; CLEGG, M. E. Medium-chain triglycerides and conjugated linoleic acids in beverage form increase satiety and reduce food intake in humans. **Nutrition Research**, p. 526-533, 2016.

COLLADO, M. C. et al. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 894-899, 2008.

CONSEA – CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Lei no 11794**, de 8 de outubro de 2008. Brasília, Brasil, 2008.

COX, C. et al. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. **Journal of Lipid Research**, v. 59, p. 841-846, 1995.

FERANIL, A. B.; DUAZO, P. L.; KUZAWA, C. W.; ADAIR, L. S. 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.

FERNANDES, J. et al. Adiposity , gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. **Nutrition & Diabetes**, v. 4, p. e121, 2014.

FERREIRA, L. et al. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, p. 1-8, 2014.

FLOWJO. **FlowJo, LLC Data Analysis Software**. Ashland, OR, USA, 2014.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, p. 497-509, 1956.

GRZEKOWIAK, Ł. et al. Distinct gut microbiota in Southeastern African and Northern European Infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, p. 812-816, 2012.

HANCZAKOWSKA, E. et al. Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets. **Livestock Science**, v. 192, p. 1-7, 2016.

HARTMAN, I.; LAGO, R. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. **Londres Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HEIMAN, M. L.; GREENWAY, F. L. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity molecular metabolism. **Molecular Metabolism**, v. 5, p. 317-320, 2016.

HIDALGO, M. et al. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. **Food Research International**, v. 64, p. 553-559, 2014.

LEY, R. E. et al. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 481-487, 2009.

McFARLANE, G. T.; McFARLANE, S. Fermentation in the human large intestine its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, p. 120-127, 2011. Suppl.

MEMBREZ, M. et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 2416-2426, 2008.

NARAYANANKUTTY, A. et al. Virgin coconut oil maintains redox status and improves glycemic conditions in high fructose fed rats. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 895-901, 2016.

NEVIN, K. G.; RAJAMOCHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Nutrition**, v. 37, p. 830-835, 2004.

PENG, K. S.; LONG, K. The antimicrobial activity of enhanced virgin coconut oil (EVCO) on growth of mastitis pathogens. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112-118, 2014.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. 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.

RIAL, S. A. et al. Gut microbiota and metabolic health: the potential beneficial effects of a medium chain triglyceride diet in obese individuals. **Nutrients**, v. 8, n. 281, p. 1-19, 2016.

ROCHA, D. M. et al. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. **Atherosclerosis**, v. 244, p. 211-215, 2016.

ROSA, D. D. et al. Fish oil improves the lipid profile and reduces inflammatory cytokines in wistar rats with precancerous colon lesions. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 4, p. 569-579, 2012.

**SPSS. Software Package Statistical System, 20.0 for Windows Evaluation Version.** Chicago, Illinois, EUA, 2010.

ST-ONGE, M.-P. et al. Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 10, p. 1134-1140, 2014.

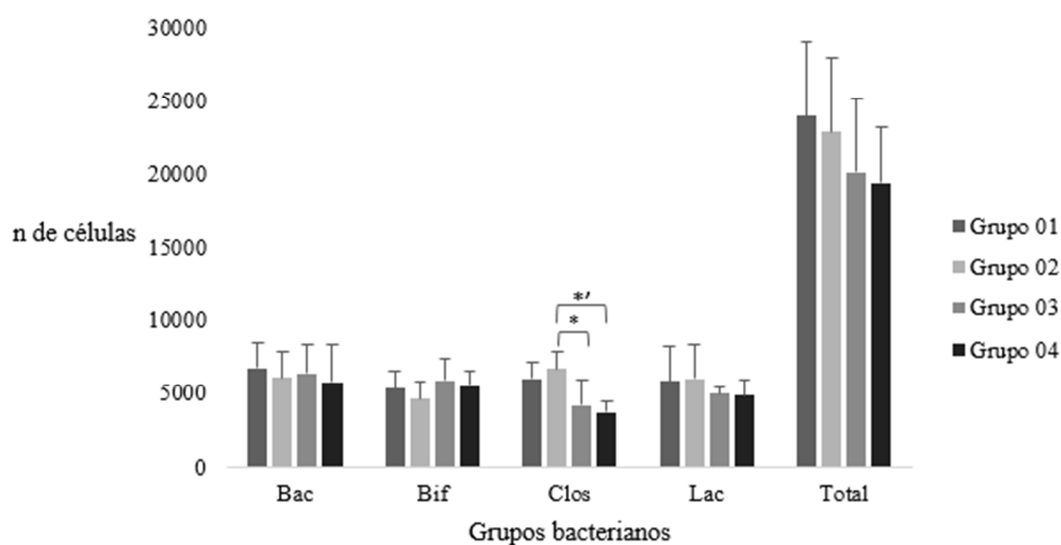
TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027-1031, 2006.

VIANA, M. L.; TOSTES, M. G. V.; MOREIRA, A. P. B. Compostos Funcionais e seus Efeitos na Saúde Intestinal. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais**. Componentes bioativos e efeitos fisiológicos. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2016.

ZENTEK, J. et al. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 83-93, 2011.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JONSSON, J. A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 674-682, 2006.

## Material Suplementar



Grupo 1: grupo controle (n = 8); Grupo 2: consumo de 10,4% de óleo de coco (n = 7 para Bif; n = 8 para os demais grupos bacterianos); Grupo 3: consumo de 50% de óleo de coco (n = 6 para Lac e n = 8 para os demais grupos bacterianos); Grupo 4: consumo de 95% de óleo de coco (n = 6 para Bif, Clos e Lac; n = 7 para os demais grupos bacterianos). Foram considerados *outliers* valores referentes à mediana  $\pm 1,5$  intervalo interquartilico; Bac: Bacteroidetes; Bif: *Bifidobacterium*; Clos: *Clostridium*; Lac: *Lactobacillus*; Total: somatório de Bac, Bif, Clos e Lac. Valores expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. ANOVA *one way* seguida de teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas (\*:  $p = 0,013$ ; e \*\*:  $p = 0,027$ ).

Figura Suplementar 1 – Composição quantitativa dos maiores grupos bacterianos da microbiota intestinal de ratas *Wistar* alimentadas com diferentes concentrações de óleo de coco virgem.

Tabela suplementar 1 – Distribuição do perfil lipídico fecal de ratas *Wistar* antes e depois do tratamento com diferentes concentrações de óleo de coco virgem

58

Perfil Lipídico	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
	Inicial	Final	<i>p</i>	Inicial	Final	<i>p</i>	Inicial	Final	<i>p</i>	Inicial	Final	<i>p</i>
C14:0	0,64±0,04	0,79±1,63	0,180	0,45±0,07	0,62±0,17	0,109	0,45±0,12	0,57±0,17	0,345	0,47±0,11	0,45±0,15	0,753
C15:0	1,15±0,83	4,60±1,00	0,001	1,46±0,51	4,45±0,58	<0,001	1,49±0,22	4,53±0,71	<0,001	1,17±0,57	4,48±0,31	<0,001
C16:0	20,29±2,02	18,09±0,46	0,254	20,55±2,01	16,20±1,96	0,003	20,49±0,42	16,17±1,42	0,001	20,08±0,10	18,87±1,92	0,272
C17:0	1,03±0,43	2,83±0,68	0,345	0,97±0,29	2,19±0,56	0,012	0,91±0,23	2,54±0,60	0,028	1,04±0,34	2,02±0,44	0,018
C18:0	14,61±3,94	13,64±2,64	0,911	16,03±6,06	10,39±1,53	0,062	16,22±6,44	9,36±0,28	0,93	11,90±1,72	11,70±1,31	0,993
C20:0	1,03±0,48	0,84±1,72	0,600	1,18±0,60	0,83±0,90	0,674	1,16±0,07	0,67±1,04	0,686	0,61±0,16	0,45±0,87	0,612
<b>AGS</b>	39,68±4,35	40,73±1,45	0,574	40,69±6,79	34,66±3,19	0,105	40,67±6,79	33,94±1,67	0,116	36,32±2,99	38,13±2,54	0,154
C14:1	1,54±0,54	2,79±0,48	0,021	1,65±0,53	2,62±0,42	0,007	1,54±0,34	3,19±0,47	0,003	1,36±0,15	4,62±1,31	<0,001
C15:1	3,87±1,16	11,61±2,24	0,001	3,65±0,53	9,63±1,61	<0,001	3,63±0,73	9,31±0,35	<0,001	3,54±0,62	9,02±2,90	0,005
C16:1	1,41±0,68	2,48±0,81	0,083	1,54±0,54	2,18±0,38	0,040	1,35±0,19	2,86±0,85	0,003	1,68±0,35	3,09±0,81	0,004
C18:1	23,97±2,85	7,51±2,22	0,068	23,63±2,38	5,83±0,98	0,028	25,85±0,96	6,23±0,93	0,068	23,94±3,77	5,85±4,66	0,018
C20:1n9	0,21±0,08	1,67±1,10	ND	0,33±0,12	2,05±0,71	0,001	0,39±0,23	1,38±0,55	0,010	0,35±0,10	1,93±0,53	0,007
<b>AGMI</b>	31,25±2,52	26,22±3,24	0,043	30,66±3,87	22,5±1,65	0,018	31,08±23,99	23,16±2,58	0,917	30,89±1,66	24,54±2,41	0,018
C18:2	17,72±2,11	3,68±0,63	<0,001	17,52±3,58	4,27±1,47	<0,001	18,90±1,94	2,00±1,90	<0,001	19,97±0,65	2,10±0,51	<0,001
C18:3	1,13±0,20	6,27±8,06	0,753	0,92±0,50	5,71±7,02	0,092	1,01±0,21	3,01±1,68	0,098	1,41±0,41	3,48±2,72	0,056
C20:2	0,62±0,18	2,90±1,16	0,068	1,03±0,14	2,13±0,87	0,068	0,86±0,33	1,75±0,00	0,285	1,00±0,24	1,66±0,41	0,068
<b>AGPI</b>	19,22±2,15	7,31±2,19	0,001	19,52±4,20	11,67±5,56	0,007	21,22±1,78	5,25±2,07	<0,001	22,26±1,62	6,75±2,49	<0,001

Grupo 1: consumo de óleo de soja como fonte lipídica; Grupo G2: consumo de 10,4% de óleo de coco; Grupo G3: consumo de 50% de óleo de coco; Grupo G4: consumo de 95% de óleo de coco; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; C14:0: ácido mirístico; C14:1: ácido miristoleico; C15:0: ácido pentadecanoico; C15:1: ácido pentadecanoico cis 10; C16:0: ácido palmítico; C16:1: ácido palmitoleico; C17:0: ácido pentadecanoico; C18:0: ácido esteárico; C18:1: ácido oleico; C18:2: ácido linoleico; C18:3: ácido linolênico; C20:0: ácido araquidônico; C20:1n9: ácido eicosenoico cis 11; ND: não determinado. Valores expressos em média ± desvio-padrão ou mediana ± intervalo interquartilico. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos, segundo teste t pareado e teste t de *Wilcoxon*

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos com óleo de coco virgem ainda são escassos. O que se encontra na literatura são muitas pesquisas com AGCM, cujos resultados acabam sendo extrapolados para o consumo de óleo de coco. Além disso, os estudos avaliam óleo de coco virgem, óleo de coco, óleo de coco refinado e óleo de copra, não havendo padronização do tipo de extração e processamento, o que dificulta um consenso com relação aos resultados.

No que diz respeito à capacidade de modular a microbiota intestinal, os resultados sugerem que o óleo de coco virgem tem potencial para modular positivamente o filo Firmicutes, o que é interessante, principalmente, para o tratamento da obesidade. E, quanto ao metabolismo, não se observou maior capacidade oxidativa para o óleo de coco virgem, indicando ausência de capacidade termogênica e, portanto, ausência de capacidade em melhorar parâmetros relacionados à obesidade, o que foi contra ao comumente discutido na literatura.

Por fim, não foi possível determinar qual a melhor concentração de óleo de coco virgem a consumir, a fim de obter melhores resultados quanto à modulação da microbiota intestinal e à capacidade oxidativa.

Logo, os resultados aqui encontrados indicam um potencial promissor para futuros estudos relacionando o óleo de coco virgem com a modulação da microbiota intestinal.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### Cálculo do tamanho amostral

Fórmula proposta por Mera et al. (1998):

$$N = \frac{2 \times (\alpha/2 \times DP)^2}{E^2}$$

em que:

$\alpha/2$  → valor da tabela de distribuição;

DP → desvio-padrão; e

E → diferença que se deseja detectar no estudo.

- Valores a serem utilizados para o cálculo

	<i>Baseline</i>		
	Média ± E grupo 01	Média ± E grupo 2	Média ± E para fórmula
Peso (g)	305 ± 9,4	304 ± 5,0	304,5 ± 7,2
N	9	7	8

E: diferença; e N: número amostral.

Fonte: GELIEBTER et al., 1983.

$\alpha/2$  → 2,998, considerando um poder estatístico de 98%;

DP → SE x  $\sqrt{n} = 7,2 \times \sqrt{8} = 20,4$  g;

E → 30 g, considerando uma diferença de 20% no ganho de peso entre animais que consomem AGCM *versus* AGCL (GELIEBTER et al., 1983).

Logo:

$$N = \frac{2 \times (2,998 \times 20,4)^2}{30^2} = 8,3 \rightarrow \text{oito animais por grupo}$$

## APÊNDICE B

Cálculo do poder do estudo baseado nos dados encontrados

Fórmula proposta por Mera et al. (1998):

$$N = \frac{2 \times (\alpha/2 \times DP)^2}{E^2}$$

em que:

$\alpha/2$  → valor da tabela de distribuição;

DP → desvio-padrão;

E → diferença que se deseja detectar no estudo; e

N → número amostral.

- Consideraram-se o número amostral de seis animais e a diferença qualitativa para os grupos bacterianos totais entre o G1 e o G4. Essa diferença foi significativa ( $p = 0,018$ ). Valores a serem utilizados para o cálculo:

DP G4 → 7,4852

E →  $80,638 - 61,417 = 19,221$

N → 6

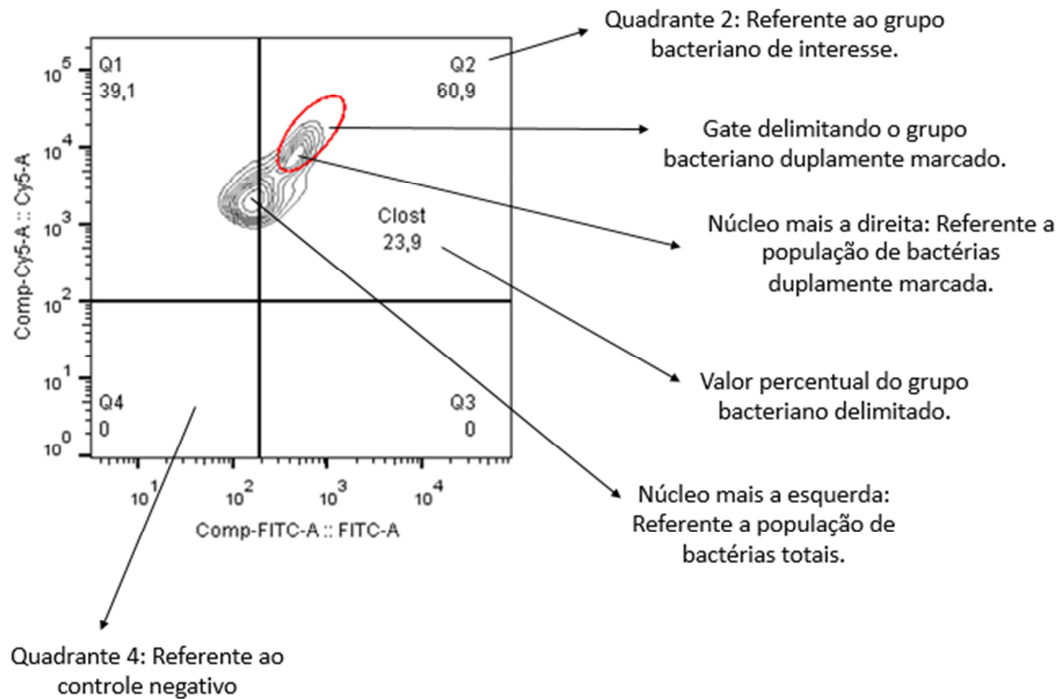
Logo:

$$6 = \frac{2 \times (\alpha/2 \times 7,4852)^2}{19,221^2} = 4,44$$

Para um grau de liberdade de 5 e um N de 6 →  $\alpha = 0,005$  → **99,5% de poder**

## APÊNDICE C

Figura suplementar:



Em que Q1: Primeiro quadrante; Q2: Segundo quadrante; Q3: Terceiro quadrante; Q4: Quarto quadrante; Cy5: corante carbocianina 5; FITC: corante fluoresceína; e Clost: *Clostridium histolyticum*.

Figura suplementar 1 – Identificação dos componentes para determinação dos grupos bacterianos de interesse.

## ANEXO A

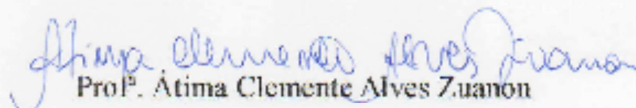
### Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal

#### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 99/2014, intitulado "Avaliação dos efeitos metabólicos da substituição parcial da fonte lipídica da dieta por óleo de coco extravirgem (cocos nucifera L.) em ratas adultas fêmeas", coordenado pela professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 17/03/2015 com validade de 12 meses.

#### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 99/2014, named "Evaluation of the metabolic effects of partial replacement of lipid for extra virgin coconut oil (cocos nucifera L.) in adult female rats", is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 17, 2015 valid for 12 months.

  
Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV