

Universidade Estadual Paulista
“Júlio De Mesquita Filho”
Instituto De Biociências

ADRIANA DEL BEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Coffea arabica* L., *Brassica campestris* L E DE
SUA ASSOCIAÇÃO NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA**

Botucatu

2014

ADRIANA DEL BEN

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Coffea arabica* L., *Brassica campestris* L E DE SUA ASSOCIAÇÃO NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Farmacologia, no Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE – CRB 8/5651

Del Ben, Adriana.

Avaliação dos efeitos de *Coffea arabica* L., *Brassica campestris* L. e de sua associação na obesidade induzida por dieta hipercalórica / Adriana Del Ben. – Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador : Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Obesidade – Tratamento. 2. Plantas medicinais. 3. Café – Uso terapêutico. 4. Canola – Uso terapêutico

Palavras-chave: *Brassica campestris*; *Coffea arabica*; Dieta enriquecida; Obesidade; Plantas medicinais.

ADRIANA DEL BEN

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Coffea arabica* L., *Brassica campestris* L E DE SUA ASSOCIAÇÃO NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Farmacologia, no Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi

Prof. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes

Dra. Maria Del Carmen Velazquez Pereda

Dedico este trabalho aos meus pais Marta e Antônio,
aos meus avós
e às minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

A todos do laboratório que participaram deste trabalho, especialmente à mestranda Juliana Rocha Ribeiro e à doutoranda Ana Elisa Valencise Quaglio.

À Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes pela coordenação dos experimentos de perfil lipídico em seu laboratório.

Aos professores e funcionários do departamento de Farmacologia.

Aos funcionários da seção de pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processos: 09/52471-1, 10/03824-6 e 10/03822-3).

À Chemyunion Química Ltda. pelo fornecimento dos produtos e apoio no desenvolvimento do projeto.

Agradeço de forma especial ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa para realização deste projeto, pela confiança e principalmente pelos ensinamentos.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

A obesidade, juntamente com o sobrepeso, tem sido considerada um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, especialmente por serem os principais fatores de risco para inúmeras doenças crônicas, como a doença coronariana, diabetes mellitus tipo II, hipertensão e alguns tipos de tumores, as quais estão associadas a altas taxas de mortalidade. Devido à gravidade da obesidade para a população mundial, a padronização de modelos experimentais é necessária para realização de estudos em busca de novos tratamentos. O uso de compostos vegetais com apelo de promoção da saúde tem crescido como mecanismo de prevenção, controle e tratamento de doenças crônicas como a obesidade. Vários estudos etnofarmacológicos indicam espécies vegetais para o tratamento de distúrbios relacionados à obesidade com um importante atrativo de que estes compostos podem reduzir os efeitos adversos provocados pelo tratamento com anorexígenos tradicionais. Considerando a necessidade de um bom modelo experimental e que tanto a ingesta de alimentos como o tratamento por via oral com diferentes compostos pode manter as funções vitais do organismo, o objetivo deste projeto foi padronizar o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hipercalórica em ratos e camundongos e avaliar os efeitos dos extratos padronizados de óleo de café verde (*Coffea arabica* L.), fitoesteróis de canola (*Brassica campestris* L.) e da associação dos dois extratos na obesidade induzida por dieta hipercalórica em roedores. Após indução da obesidade, os animais foram tratados por 21 dias com os extratos por via oral e sacrificados no 22º dia para avaliação dos efeitos destes produtos. Os experimentos mostraram que a indução da obesidade foi efetiva tanto em camundongos como em ratos, sendo que em camundongos foram necessárias apenas 8 semanas para se desenvolver obesidade severa. O óleo de café verde foi eficaz na redução do peso corporal, dos níveis de insulina, proteína C reativa e leptina dos animais obesos. Os fitoesteróis da canola foram hábeis em diminuir os níveis de proteína C reativa e colesterol. A associação dos dois produtos reduziu o colesterol, os triacilgliceróis e o VLDL-colesterol. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o modelo de indução em camundongos é mais adequado e o extrato mais eficaz é o de óleo de café verde.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Brassica campestris*. Obesidade, Dieta enriquecida. Plantas Mediciniais.

ABSTRACT

Obesity along with overweight has been considered one of the most serious public health problems in the world, especially because they are the main risk factors for many chronic diseases such as coronary heart disease, type II diabetes mellitus, hypertension and some types of tumors, which are associated with high mortality rates. Due to the severity of obesity in world population, standardization of experimental models is required for studies to search new treatments. The use of plants compounds to promote health has grown as a mechanism for prevention, control and treatment of chronic diseases such as obesity. Several ethnopharmacological studies indicate plants species for the treatment of disorders associated with obesity with a major attraction of these compounds may reduce adverse effects caused by current treatment with appetite suppressants. Considering the need of a good experimental model, and both food intake and the oral treatment with different compounds can maintain vital body functions, the aim of this project was to standardize the experimental model of diet-induced obesity in rats and mice and evaluate the effects of standardized extract of green coffee oil (*Coffea arabica* L.) phytosterols of canola (*Brassica campestris* L.) and their association in diet-induced obesity in rodents. After obesity induction, the animals were treated for 21 days with the extract orally and killed on day 22 to assess the effects of these products. The experiments showed that induction of obesity was effective both in mice and rats but in mice just 8 weeks were needed to develop severity obesity. The green coffee oil extract was effective in reducing body weight, levels of insulin, C-reactive protein and leptin in obese animals. The phytosterols of canola were able to reduce the levels of C-reactive protein and cholesterol. The combination of the two products reduced cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides. According to the results, we concluded that the induction model in mice is better and the more effective extract is the extract of green coffee oil.

Keywords: *Coffea arabica*. *Brassica campestris*. Enriched diet. Medicinal Plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Prevalência da obesidade em adultos (20 anos ou mais) Sexo masculino e feminino.....	17
Figura 2 - Prevalência do excesso de peso e obesidade na população brasileira, por sexo – período de 1974-1975, 1989 e 2008-2009.....	19
Figura 3 – A) rack ventilada com mini isoladores e B) estante vantilada	28
Figura 4 - Média de consumo dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante a indução da obesidade	37
Figura 5 - Média de peso dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante a indução de obesidade.....	38
Figura 6 - Média de consumo de ração por grupo	40
Figura 7 - Avaliação da evolução do peso corporal dos animais	40
Figura 8 - Avaliação dos níveis plasmáticos de leptina.....	43
Figura 9 - Avaliação dos níveis plasmáticos de insulina	44
Figura 10 - Avaliação dos níveis plasmáticos de proteína C reativa	46
Figura 11 - Avaliação dos níveis plasmáticos de adiponectina em ratos	47
Figura 12 - Avaliação dos níveis plasmáticos de β -endorfina em ratos	48
Figura 13 - Avaliação dos níveis plasmáticos do hormônio de crescimento em ratos	49
Figura 14 - Avaliação dos níveis plasmáticos de colesterol total em ratos.....	50
Figura 15 - Avaliação dos níveis plasmáticos de triglicérides em ratos	51
Figura 16 - Avaliação dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol em ratos.....	52
Figura 17 - Avaliação dos níveis plasmáticos de VLDL-colesterol em ratos	53
Figura 18 - Avaliação dos níveis plasmáticos de HDL-colesterol em ratos	54
Figura 19 - Avaliação dos níveis plasmáticos de glicose em ratos	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Macronutrientes e micronutrientes das rações (g/kg)	30
Tabela 2 - Perfil químico do óleo de café verde	32
Tabela 3 - Especificações do CardioAid™ Plant Sterols.....	33
Tabela 4 - Variação do peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais	39
Tabela 5 - Perfil dos animais após os diferentes tratamentos	41
Tabela 6 - Sumário dos resultados obtidos no experimento com camundongos	57
Tabela 7 - Sumário dos resultados obtidos no experimento com ratos.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	ANIMAIS.....	28
3.2	INDUÇÃO DE OBESIDADE.....	29
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.4	COMPOSTOS TESTE.....	32
3.4.1	Óleo de café verde (<i>Coffea arabica</i> L.).....	32
3.4.2	Fitoesteróis de <i>Brassica campestris</i> L.....	32
3.4.3	Associação do óleo de café e fitoesteróis de canola.....	33
3.5	OBTENÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISE.....	33
3.6	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MACROSCÓPICOS.....	34
3.7	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	34
3.7.1	Determinação da concentração de triacilgliceróis.....	34
3.7.2	Determinação da concentração de colesterol total.....	35
3.7.3	Determinação da concentração HDL-colesterol.....	35
3.7.4	Determinação da concentração de LDL-colesterol e VLDL-colesterol.....	35
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA INDUÇÃO DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS E RATOS.....	37
4.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A OBESIDADE.....	39
4.2.1	Avaliação dos parâmetros macroscópicos.....	39
4.2.3	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	42
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	57
	ANEXO A – Certificado do comitê de ética para realização dos experimentos com os camundongos.....	75
	ANEXO B – Certificado do comitê de ética para realização dos experimentos com ratos.....	77
	ANEXO C – Laudo das análises do extrato de óleo de café verde.....	79

Prólogo

Durante a realização deste projeto de pesquisa junto ao Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (*FitoFarmaTec*), Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e como aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, AC: FARMACOLOGIA da mesma instituição, pude, além da execução do projeto de pesquisa de minha dissertação, ampliar minha formação desenvolvendo as seguintes atividades:

Participação em cursos

2013 BD Experience – Simplificando a Citometria do princípio aos resultados. 01 de Outubro de 2013, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

2013 Análise genômica 2013. 08 a 11 de Julho de 2013, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

Participação em eventos

2013 20º Congreso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica. 21 a 25 de Outubro de 2013, Havana – Cuba.

2013 III Simpósio de Farmacologia. 22 a 23 de Junho de 2013, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

2013 XI Workshop da pós-graduação. 04 a 08 de Junho de 2013, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

2013 XIII Jornada de Nutrição da UNESP Botucatu. 23 a 25 de Maio de 2013, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

2012 XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 18 a 21 de Setembro de 2012, Bento Gonçalves – RS.

2012 II Simpósio de Farmacologia – SIMFAR. 22 a 23 de Junho de 2012, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

2012 XI Workshop da pós-graduação. 03 a 05 de Maio de 2012, na Universidade Estadual Paulista “Júlio e Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

Resumos em congressos

2013 *Nome do evento:* 20º Congresso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica. *Período:* 21 a 25 de Outubro de 2013. *Título:* Preliminary evaluation of *Brassica campestris* and *Coffea arabica* effects in obesity. *Autores:* Del Ben, A., Machado, L.O., Ribeiro, J.R., Masago, F., Quaglio, A.E.V., Checon, J., Diemant, G., Pereda, M.C.V., Di Stasi, L.C.

2013 *Nome do evento:* 20º Congresso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica. *Período:* 21 a 25 de Outubro de 2013. *Título:* The role of *Bidens pilosa* L. and *Physalis angulata* L. in obese mice. *Autores:* Ribeiro, J.R., Masago, F., Del Ben, A., Machado, L.O., Quaglio, A.E.V., Checon, J., Diemant, G., Pereda, M.C.V., Di Stasi, L.C.

2012 *Nome do evento:* XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Análise dos efeitos de *Brassica campestris* e *Coffea arabica* sobre a obesidade induzida. *Autores:* Del Ben, A., Machado, L.O., Ribeiro, J.R., Masago, F., Quaglio, A.E.V., Checon, J., Diemant, G., Pereda, M.C.V., Di Stasi, L.C.

2012 *Nome do evento:* XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Avaliação dos efeitos de *Bidens pilosa* L. e *Physalis angulata* L. sobre a obesidade. *Autores:* Ribeiro, J.R., Masago, F., Del Ben, A., Machado, L.O., Quaglio, A.E.V., Checon, J., Diemant, G., Pereda, M.C.V., Di Stasi, L.C.

Colaboração em outros projetos de pesquisa

1. Avaliação dos efeitos da *Bidens pilosa* L. associada à *Brassica campestris* e seus efeitos individuais sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica.
2. Caracterização da droga vegetal *Pfaffia paniculata* como adaptógena e anti-inflamatória intestinal.
3. Atividade anti-inflamatória intestinal da *Pfaffia glomerata* (Spreng. Pedersen).
4. Avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatório intestinal de *Baccharis dracunculifolia* DC.
5. Estudos de mecanismo de ação de *Bidens pilosa* L. e de seus efeitos sobre a atividade anti-inflamatória intestinal da sulfassalazina, prednisolona e azatioprina.
6. Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú).

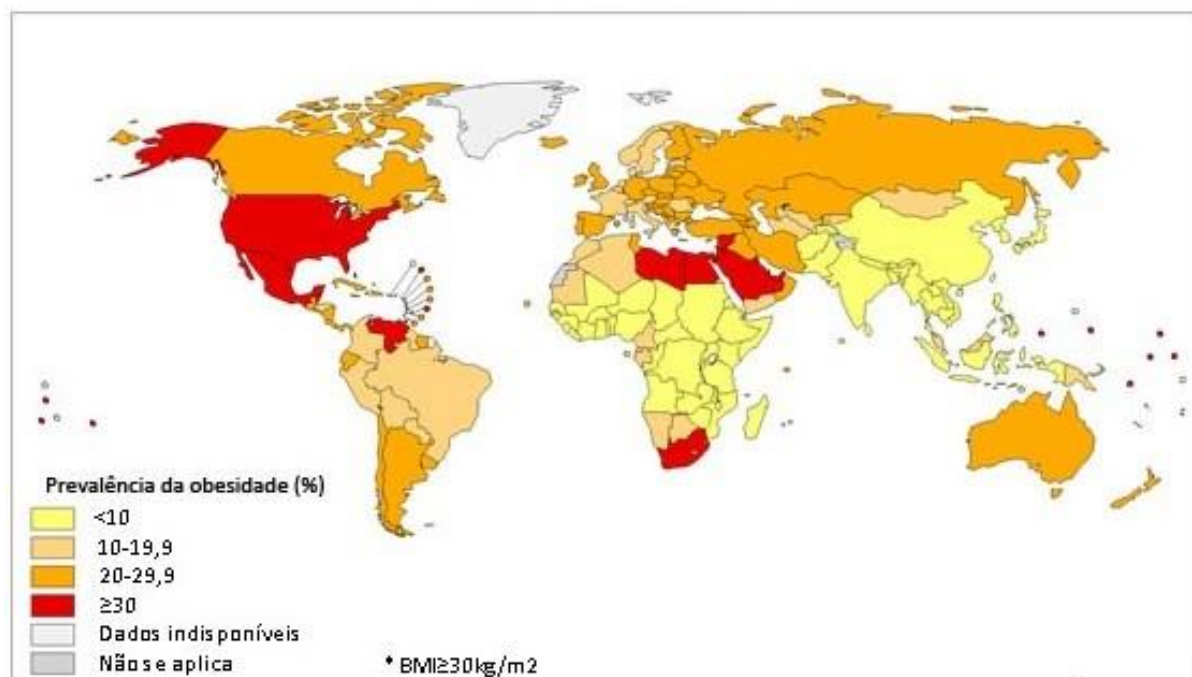
Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. Sua etiologia é multifatorial, envolvendo predisposição genética, os hormônios, o ambiente e a dieta (LEE; LEE; CHOU, 2013), sendo que, a causa principal é um desequilíbrio entre as calorias ingeridas e as calorias gastas. Mundialmente, houve um aumento no consumo de comida rica em gordura e diminuição na atividade física devido às formas de trabalho mais sedentárias, mudanças nos meios de transportes e aumento da urbanização, contribuindo, dessa forma, para o desequilíbrio calórico. A classificação de sobrepeso e obesidade em adultos é comumente realizada pelo Índice de Massa Corpórea (IMC), que é definido pelo peso da pessoa em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2), sendo que indivíduos com IMC entre 25 e 29.9 kg/m^2 são considerados com sobrepeso e com IMC acima de 30 kg/m^2 são consideradas obesos.

A incidência da obesidade no mundo tem tomado proporções alarmantes nas últimas décadas, sendo considerada uma epidemia global, inclusive nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como pode ser observado na figura 1

Figura 1. Prevalência da obesidade em adultos (20 anos ou mais) Sexo masculino e feminino.

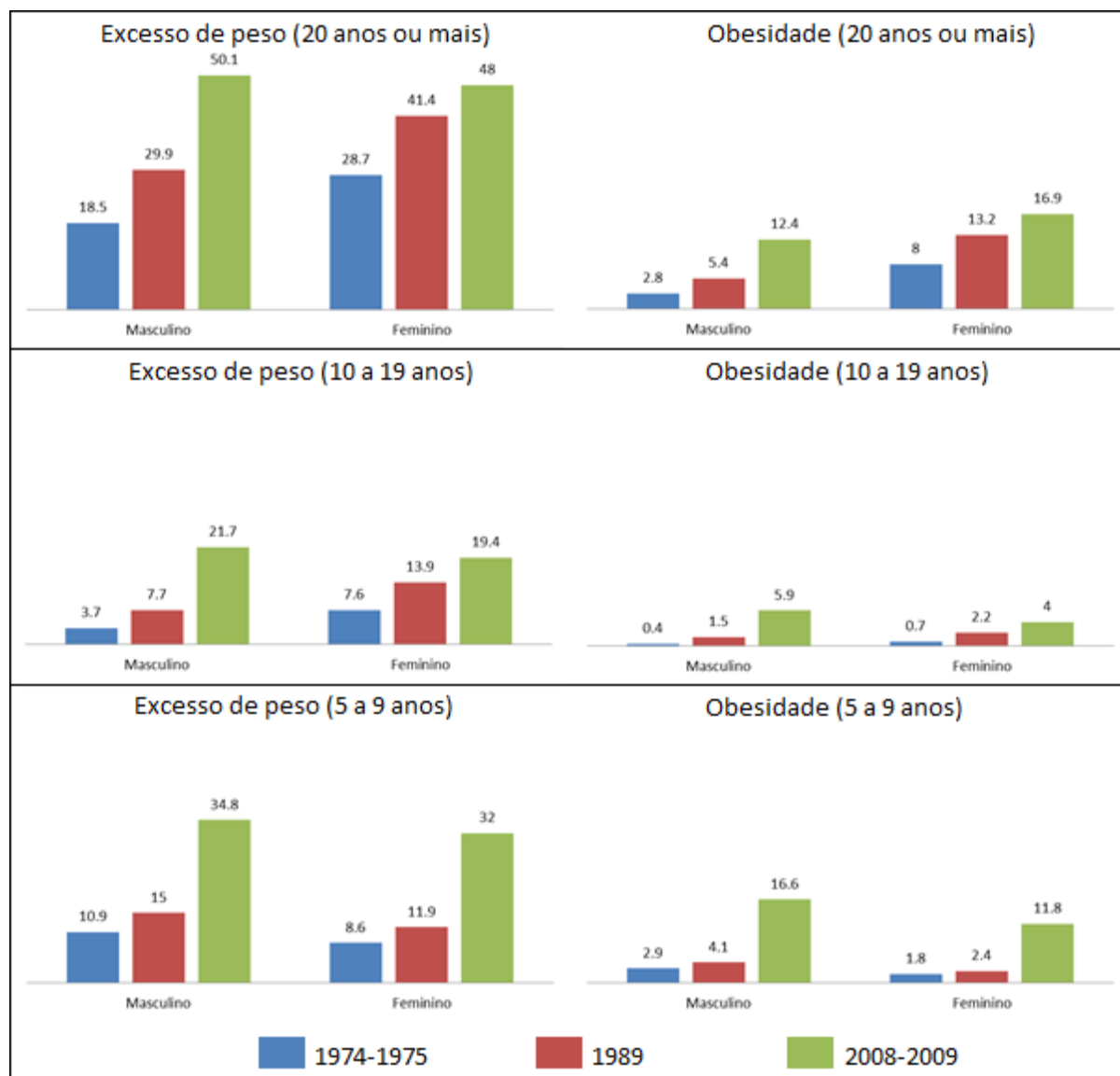


Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS)

(MOKDAD et al., 2001; O'BRIEN; DIXON, 2002; ECKEL; BARAUCH; ERSHOW, 2002; MATHEW et al., 2007; DIXIT et al., 2012). A obesidade é considerada pela OMS como um dos maiores desafios de saúde do século XXI, por ser o principal fator de risco para inúmeras doenças crônicas, como a doença coronariana, diabetes mellitus tipo II, hipertensão e alguns tipos de tumores (OMS, 2013), as quais estão associadas às altas taxas de mortalidade e à redução na expectativa de vida (FONTAINE et al., 2003). Em adição, tem sido descrito que o número de casos de obesidade quase dobrou entre 1980 e 2008, sendo estimado que 65% da população mundial habita em regiões do planeta onde o sobrepeso e a obesidade causam mais óbitos que a própria desnutrição (OMS, 2013).

. Em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos, acima de 20 anos, estavam com sobrepeso (35% da população), dos quais mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres foram considerados obesos, o que representa aproximadamente 11% da população (OMS, 2013). Diferentemente do que ocorre com outras doenças, dados epidemiológicos da obesidade em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, inclusive no Brasil, estão disponíveis. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2008 e 2009 diagnosticou o excesso de peso em cerca de metade dos homens e das mulheres brasileiras (50,1% e 48% respectivamente) (Figura 2), excedendo em 28 vezes a frequência do déficit de peso, no sexo masculino, e em 13 vezes, no sexo feminino (IBGE, 2010). Em adição, a prevalência da obesidade no Brasil era de 2,8% nos homens adultos e 8% entre as mulheres durante a metade da década de 70 e passou para 12,4% entre os homens e 16,9% entre as mulheres nos anos de 2008 e 2009 (FORD; MOKDAD, 2008; JAIME et al., 2013) (Figura 2). Índices de prevalência de obesidade entre crianças e adolescentes também têm crescido no Brasil, sendo que em 1975 este índice era de 4,9% entre as crianças e de 3,7% entre os adolescentes, e no levantamento de 2008-2009 subiram para 14,3% e 4,9%, respectivamente (WANG; MONTEIRO; POPKIN, 2002; IBGE, 2008).

Figura 2 - Prevalência do excesso de peso e obesidade na população brasileira, por sexo – período de 1974-1975, 1989 e 2008-2009.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)

Os custos diretos e indiretos da obesidade nos EUA foram estimados em mais de 147 bilhões de dólares no ano de 2008, ademais, demonstrou-se que em 2006 os gastos com pessoas obesas foram aproximadamente US\$1.429, valor 42% acima dos gastos com saúde de um indivíduo não obeso (FINDELSTEIN et al., 2009). No Canadá, os custos diretos de tratamento foram da ordem de 1,6 bilhões de dólares e os indiretos de 2,7 bilhões de dólares, representando aproximadamente 2,2% do total de gastos em saúde no país (KATZMARZYK; JANSSEN, 2004). Embora no Brasil os custos da obesidade não sejam conhecidos, estima-se que, anualmente, os gastos com todas as doenças relacionadas ao

sobrepeso e obesidade fiquem em torno de 2,1 bilhões de dólares, sendo que 68,4% desse total representam os gastos com hospitalização, que são maiores entre os homens do que as mulheres (47 milhões de dólares e 46 milhões de dólares, respectivamente) (BAHIA et al., 2012).

A obesidade é uma expansão do volume (hipertrofia) e também do número (hiperplasia) de adipócitos (SURMI; HASTY, 2008) associada com uma inflamação que pode possivelmente contribuir para o desenvolvimento de complicações à saúde como diabetes, esteatose hepática, câncer, resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão e estados pró-trombóticos (HOTAMISLIGIL, 2006; HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008). Com a expansão do tecido adiposo ocorre acúmulo de células imunes como macrófagos (CANCELLO et al., 2006), mastócitos (DIVOUX et al., 2012), neutrófilos (SHAH; LEIK; WALSH, 2010) e linfócitos T (WU et al., 2007) acompanhados por um desequilíbrio na secreção de diversos mediadores pelo tecido adiposo contribuindo para o processo inflamatório (PERMANA; MENGE; REAVEN, 2006; TILG; MOSCHEN, 2006). A relação entre obesidade e inflamação ainda não foi totalmente definida, porém, algumas hipóteses foram propostas. A primeira é que o excesso de nutrientes nos adipócitos induz um estresse intracelular, resultando na ativação da cascata inflamatória (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011); a segunda sugere que a sobrecarga de gordura nos adipócitos aumenta a infiltração de macrófagos, causando diferenciação e ativação das células T citotóxicas, que iniciam e propagam a inflamação (SURMI; HASTY, 2008); a terceira hipótese sugere que o crescimento do adipócito causa uma hipóxia e isso ativaria a resposta inflamatória (YE et al., 2007); e a última é de que níveis altos de ácidos graxos circulantes poderiam ativar a resposta inflamatória dos adipócitos (SHI; KOKOEVA; INOUE, 2006).

A regulação do balanço energético no organismo depende de um mecanismo para perceber o nível das reservas de energia na gordura corporal e transmitir a informação aos locais de controle no hipotálamo, onde ocorre a integração da informação e consequente controle da ingestão e gasto de energia. O tecido adiposo é responsável pela liberação de diversas substâncias como leptina, adiponectina, resistina, TNF- α e IL-6 (PERMANA; MENGE; REAVEN, 2006), as quais controlam a ingestão de alimentos, balanço energético, ação da insulina, metabolismo de glicose e lipídios, pressão sanguínea e coagulação, mantendo o

“status” nutricional do organismo (LEE; LEE; CHOUE, 2013; SETHI; VIDAL-PUIG, 2007).

Considerando-se que os estudos com seres humanos obesos apresentam limitações éticas, metodológicas e financeiras (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JR, 2003), alternativas de experimentação pré-clínica precisam ser desenvolvidas e validadas. Dentre os vários modelos experimentais disponíveis, tem sido considerado o mais apropriado aquele em que a obesidade resulta da utilização de dietas com alta densidade energética, gorduras ou carboidratos, pois possuem grande similaridade com o processo de desenvolvimento da obesidade em humanos à medida que promovem resistência à insulina, alterar níveis de leptina, colesterol e triglicérides e respondem aos tratamentos disponíveis (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JR, 2003; DIXIT et al., 2012).

Segundo Buettner, Schölmerich e Bollheimer (2007), o melhor método para induzir obesidade em animais é baseado em dietas com mais de 40% de energia provinda da gordura, dietas estas ricas em ácidos graxos linoleico (n-6) e oleico (n-9). Neste modelo, tem sido considerado que ganho de peso entre 10-25%, em roedores, pode ser classificado como obesidade moderada (HARROLD; WILLIAMS; WIDDOWSON, 2000; WOODS et al., 2003) e acima de 40% como obesidade severa (LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2002). No entanto, inúmeras dificuldades podem surgir durante a experimentação animal envolvendo a obesidade, de forma que o método de indução de obesidade por dieta hipercalórica requer uma padronização prévia para permitir uma real avaliação das propriedades anti-obesidade de diferentes compostos, sintéticos ou naturais.

O uso de medicação para o tratamento da obesidade ainda é controverso, mas há um consenso que os medicamentos atuam melhor quando associados à reeducação alimentar e aumento da prática de atividades físicas (DIXIT et al., 2012). Em adição, o uso de medicamentos ainda não representa cura para a obesidade e devido à escassez de dados não se sabe exatamente quais mecanismos de ação dos fármacos estão envolvidos na perda de peso, dificultando o uso rotineiro destes produtos (DIXIT et al., 2012). Atualmente há disponível no mercado brasileiro apenas dois medicamentos anti-obesidade liberados pela Anvisa, o orlistate e a sibutramina (YUN, 2010). O primeiro atua reduzindo a absorção de gordura no intestino pela inibição da lipase pancreática (BALLINGER; PEIKIN, 2002; DREW; DIXON; DIXON, 2007; HUTTON; FERGUSON, 2004; THURAIRAJAH et al., 2005),

e o segundo é anorexígeno, aumentando a saciedade (LEAN, 2001; TZIOMALOS; KRASSAS; TZOTZAS, 2009). No entanto, os dois medicamentos apresentam efeitos colaterais como aumento da pressão sanguínea, boca seca, constipação, dor de cabeça e insônia (THURAIRAJAH et al., 2005; DE SIMONE; D'ADDEO, 2008; KARAMADOUKIS et al., 2009).

Considerando a falta de um medicamento totalmente seguro e eficaz para o tratamento da obesidade, vários estudos buscam encontrar novas alternativas para o tratamento dessa enfermidade e dentre as opções encontram-se os compostos de origem vegetal, os quais podem ser úteis para o tratamento de distúrbios relacionados à obesidade ou para reduzir os efeitos colaterais dos fármacos anorexígenos tradicionais, quando usados em associação (MAYER et al., 2009). De modo geral, existe um grande interesse público no uso de compostos de origem natural, sendo o uso de plantas medicinais baseado na premissa de que em sua complexa constituição estão presentes ativos que promovam saúde e aliviem diferentes sintomas associados a doenças distintas (DIXIT et al., 2012).

Uma variedade de produtos naturais, incluindo extratos brutos e compostos isolados de plantas, pode induzir redução do peso corporal e prevenir a obesidade induzida por dieta (HAN et al., 2006; RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008; YUN, 2010). Dentre os compostos já reconhecidamente benéficos que interferem em diferentes mediadores da obesidade destacam-se compostos como polifenóis, ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA), oleoiletanolamida (OEA), fitoesteróis, entre outros (JONES, 2002; NIELSEN et al., 2004; LI et al., 2005; WOLFRAM; WANG; THIELECKE, 2006; ARTMANN et al., 2008; THIELECKE; BOSCHMANN, 2009;).

No presente estudo, foram selecionados para estudos o óleo de café verde - *Coffea arabica* L. padronizado em palmitato de cafestol e um extrato padronizado em fitoesteróis obtido a partir de canola - *Brassica campestris* L. Estes produtos foram selecionados frente sua composição química e a partir de estudos preliminares que demonstraram sua potencialidade de ação sobre o metabolismo energético e sobre a gordura corporal (SHIMODA; SEKI; AITANI, 2006; GAULLIER et al., 2007; PEREDA, 2009; GRATTAN, 2013).

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Estudos têm revelado que o café e a cafeína desempenham um papel preventivo contra diabetes tipo 2, promovem uma melhora no quadro clínico dos diabéticos, aumentam o gasto

energéticos e promovem a lipólise em adipócitos de ratos (SHIMODA; SEKI; AITANI, 2006). Em adição, nota-se que o café também tem uma rica história médica, e que seus benefícios terapêuticos estão sendo cientificamente validados (BISHT; SISODIA, 2010).

O café é rico em uma variedade de substâncias biologicamente ativas (GUMY et al., 2009), dentre elas, a mais conhecida é a cafeína. O óleo de café verde utilizado no presente estudo não possui cafeína, contudo possui substâncias igualmente importantes em sua composição, como os diterpenos - cafestol e kahweol -, os ácidos graxos saturados - ácido palmítico, esteárico -, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) – ácido oleico, linoleico e araquidônico - e os tocoferóis. Estudos mostram que os diterpenos cafestol e kahweol atuam como agentes quimioprotetores (CAVIN; HOLZHÄUSER, 1998; HUBER et al., 2004), tem ação anti-inflamatória (KIM; JUNG; JEONG, 2004) e o kahweol ainda atua como anti-inflamatório e anti-angiogênico, dessa forma, é um potencial composto para ser usado em terapias antitumorais (CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2011). Os tocoferóis presentes neste óleo são reconhecidos pelos seus efeitos protetores da pele, prevenindo doenças inflamatórias, assim como o desenvolvimento do envelhecimento cutâneo (BOELSMA; HENDRIKS; ROZA, 2001; NAKAYAMA et al., 2003). Já estudos com os PUFAs mostraram que são capazes de reduzir o risco do desenvolvimento da obesidade, diminuir os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides (JOURDAN et al., 2011; WIELINGA et al., 2012) e os riscos de fatalidade das doenças cardíacas (MOZAFFARIAN; WU, 2011). A ação destes compostos pode ser devido à diminuição de triglicérides plasmáticos, modulação da agregação plaquetária e diminuição da síntese de agentes anti-inflamatórios (DE ROOS; MAVROMMATIS; BROUWER, 2009). Em adição, recentemente estudos clínicos realizados com o óleo de café associado aos fitoesteróis de canola apresentaram resultados na redução de medidas da região da coxa de voluntárias e na redução da espessura do tecido adiposo da hipoderme, além de um aumento da taxa de lipólise superior àquele induzido com o uso isolado dos diferentes produtos (PEREDA, 2009).

Por sua vez, os fitoesteróis são componentes da membrana celular das plantas que apresentam estrutura e função semelhante ao colesterol, diferindo apenas no tamanho da cadeia pela presença de um grupamento metil ou etil no C-24, sendo os mais comumente encontrados o β -sitosterol, estigmasterol e

campesterol (LAGARDA; GARCÍA-LLATAS; FARRÉ, 2006; GARCÍA-LLATAS; RODRÍGUEZ-ESTRADA, 2011). Fitoesteróis não são sintetizados pela espécie humana, mas são introduzidos na dieta através de alimentos, como, por exemplo, óleos vegetais e nozes (GARCÍA-LLATAS; RODRÍGUEZ-ESTRADA, 2011). Estudos demonstram que a ingestão diária desses compostos tem comprovada ação na diminuição dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol, sendo seu efeito benéfico para tratamento de doenças cardíacas (AMIR SHAGHAGHI; ABUMWEIS; JONES, 2013; GRATTAN, 2013). Dados epidemiológicos sugerem um menor risco de desenvolvimento de câncer quando há um aumento na ingestão de fitoesteróis (GRATTAN, 2013). Estes compostos demonstraram um potente efeito na redução no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão, reduzindo em 50% o risco no grupo com grande consumo (MENDILAHARSU et al., 1998), além de apresentarem efeito estimulador da produção de citocinas, resultando em efeito preventivo de metástase no câncer (GRATTAN, 2013). Os fitoesteróis também são capazes de substituir o colesterol da membrana plasmática e promover mudanças nas propriedades estruturais e funcionais da dupla camada lipídica, alterando assim sua fluidez e permeabilidade, capacidade que favorece a ação de compostos no interior das células, visto que facilitam o transporte de moléculas pela membrana (MORA et al., 1999; GARCÍA-LLATAS; RODRÍGUEZ-ESTRADA, 2011). Desta forma, fitoesteróis são compostos potencialmente úteis como coadjuvantes em formulações farmacêuticas para facilitar a absorção de outros produtos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como principais objetivos:

Padronizar o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hipercalórica em roedores e avaliar os mais apropriado para o estudos de novos produtos .

Estudar os efeitos do tratamento com o óleo de café verde (*Coffea arabica* L.), fitoesteróis de canola (*Brassica campestris* L.) e da associação dos dois produtos na obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss e ratos machos da linhagem Wistar obtidos, respectivamente, do Biotério central da UNESP – Campus de Botucatu e Biotério ANILAB - animais de laboratório de Paulínia, São Paulo. Os camundongos foram alojados em rack ventilada com mini-isoladores de polissulfona (Alesco Ind. e Com. Ltda) (Figura 3A), já os ratos foram alojados em estante ventilada (Alesco Ind. e Com. Ltda) (Figura 3B) com filtração de ar de entrada e de saída, mantido no interior de uma sala climatizada sob a temperatura constante de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UNESP de Botucatu (Anexos A e B)

Figura 3 – A) rack ventilada com mini isoladores e B) estante ventilada



3.2 INDUÇÃO DE OBESIDADE

Para a indução da obesidade utilizamos uma dieta hipercalórica que apresentava alto teor de gordura. Para o grupo que não passou pelo processo de indução de obesidade foi fornecida uma dieta normocalórica, porém essa dieta normocalórica foi diferente entre os camundongos e os ratos, pois o fornecedor não estava mais comprando a dieta utilizada com os camundongos em pequenas quantidades, apenas compras acima de mil quilogramas eram efetuadas, desta forma, alteramos a dieta para uma que se assemelhasse à dos camundongos e que foi possível realizar a compra de quantidades pequenas.

A composição básica da dieta normocalórica dos camundongos é: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, farelo de bolacha, amido de milho, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo de soja degomado, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, iodato de cálcio, monóxido de manganês, niacina, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato ferroso, vitaminas, DL-metionina, L-lisina, etoxiquin e hidróxido de tolueno butilado.

A dieta normocalórica dos ratos tem em sua composição básica: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, DL-metionina, óleo de soja degomado, fosfato bicálcico, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), vitaminas, biotina, cloreto de colina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantotênico, iodato de cálcio, selenito de sódio, óxido de zinco, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato ferroso, aditivo adsorvente, aditivo antifúngico, aditivo antioxidante, veículo q.s.p.

E a dieta hipercalórica tem em sua composição básica: milho moído, farelo de soja, farelo de bolacha, proteína concentrada de soja, gérmen de milho, amido de milho, chocolate em pó, quireira de arroz, soro de leite em pó, farinha de vísceras, levedura autolisada de cana-de-açúcar, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), ácido fólico, biotina, cloreto de colina, iodato de cálcio, monóxido de manganês, niacina, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato ferroso, vitaminas, DL-metionina, L-lisina, L-treonina, L-triptofano, ácido propiônico, aditivo enzimático, etoxiquin e hidróxido de tolueno butilado. A principal diferença entre as rações normocalórica e a ração hipercalórica está na quantidade de lipídeos, sendo que a ração

hipercalórica apresenta concentrações de lipídeos 5 vezes maior que a dieta normocalórica (Tabela 1).

Para a indução da obesidade tanto os camundongos quanto os ratos (ambos com 21 dias) foram divididos em dois grupos, conforme a ração que receberam:

Dieta normocalórica camundongos (DN) - receberam a ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere®) por um período de 8 semanas.

Dieta normocalórica ratos (DN) - receberam a ração padrão para roedores (Biotec Ratos e Camundongos 9301, BioBase Ração para animais de Laboratório) por um período de 10 semanas.

Dieta hipercalórica (DH) – camundongos receberam ração hipercalórica (RC Focus 2413 - chocolate, Agrocere®), por um período de 8 semanas e os ratos receberam a ração hipercalórica por um período de 10 semanas.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hipercalórica, está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Macronutrientes e micronutrientes das rações (g/kg)

Componentes	Rações		
	Padrão 1765	Hipercalórica	Biotec
Proteína	220	200	220
Gordura	40	200	40
Minerais	80	100	100
Fibras	80	90	80
Cálcio	15	14	14
Fósforo	8	7	8

Todos os animais foram pesados e o consumo de ração foi medido duas vezes na semana. Foram considerados obesos os animais que apresentaram, no mínimo, 10% a mais de peso em comparação aos animais controles (dieta normocalórica) (LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2002; WOODS et al., 2003; NOVELLI et al., 2007). Após essa seleção se iniciou o tratamento com os diferentes compostos.

Os experimentos foram realizados em duas fases: primeiro com camundongos e posteriormente com ratos.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliação dos efeitos do óleo de café verde e dos fitoesteróis de canola foram realizados dois experimentos diferente, sendo o primeiro com camundongos Swiss e o segundo com ratos Wistar. Em ambos os estudos, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo Branco - animais não obesos.

Grupo Controle - animais obesos.

Grupo *Pair-feeding* - animais obesos com restrição de dieta (70% da média de consumo do grupo Controle).

Grupo OC - animais obesos tratados com extrato de óleo de café verde.

Grupo FC - animais obesos tratados com extrato de fitoesteróis de canola.

No segundo experimento (ratos) além dos 5 grupos discriminados acima, acrescentou-se um 6º grupo com a associação dos extratos:

Grupo OC/FC - animais obesos tratados com a associação dos extratos.

Todos os grupos receberam a dieta normocalórica *ad libitum*, com exceção dos grupos *pair-feeding*, que sofreram restrição de 30% da dieta, restrição essa calculada pela média de consumo de ração dos respectivos animais controles, conforme discriminado acima. Todos os grupos receberam água *ad libitum*.

O tratamento foi realizado durante 21 dias, sendo a que morte dos animais ocorreu no 22º dia. Todos os compostos testes foram diluídos em uma solução de metilcelulose 1% com 8% de Tween 80 e administrados por via oral na dose de 100mg/kg durante 21 dias. Os grupos controles receberam o veículo na mesma dose e pelo mesmo tempo.

3.4 COMPOSTOS TESTE

3.4.1 Óleo de café verde (*Coffea arabica* L.)

O Óleo de Café Verde (OC), de nome comercial MELSCREEN COFFEE EL DEO foi fornecido pela Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil). Foi obtido através de um processo de prensagem a frio de grãos selecionados de café verde orgânico, devidamente certificado pela ECOCERT S. A. Foram realizadas análises quantitativas da composição química, composição graxa está apresentada na tabela 2, e análises físico-químicas e microbiológicas (Anexo C).

Tabela 2 - Perfil químico do óleo de café verde

Compostos	Faixa de concentração (%)
Ácido palmítico	25,0 – 40,0
Ácido esteárico	7,0 – 15,0
Ácido oleico	8,0 – 15,0
Ácido linoléico	35,0 – 48,0
Ácido linolênico	0,1 – 3,0
Ácido araquidônico	2,0 – 5,0
Palmitato de cafestol	10,0 – 20,0

3.4.2 Fitoesteróis de *Brassica campestris* L.

O produto testado (CardioAid™ Plant Sterols) foi fornecido pela empresa ADM Nutrition para a Chemyunion Química Ltda (empresa parceira na realização desse projeto) e consiste, principalmente em fitoesteróis de *Brassica campestris* (FC) (Tabela 3).

Tabela 3 - Especificações do CardioAid™ Plant Sterols

Esteróis vegetais total, %	Min. 95
Beta-sitosterol, %	40-58
Campesterol, %	20-30
Estigmasterol, %	14-22
Brassicasterol, %	0-6
Sitostanol, %	0-5
Tocoferóis, mg/g	0-15
Metais pesados, ppm	Max. 10
Contagem padrão em placas, por g	Max. 1,000
Levedura e mofo, por g	Max. 300
Salmonella	Neg.
<i>E. coli</i>	Neg.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Neg.

3.4.3 Associação do óleo de café e fitoesteróis de canola

Os extratos foram associados na proporção de duas partes de óleo de café verde e uma dos fitoesteróis de canola (OC/FC), proporção igual ao produto Slimbuster® L fabricado pela Chemyunion Química Ltda (PEREDA, 2009).

3.5 OBTENÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISE

Após os experimentos, os animais foram decapitados e o sangue obtido foi coletado em eppendorf, deixado em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado por 20 minutos a 4000rpm. O soro separado foi armazenado à -80° C para as análises bioquímicas.

3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MACROSCÓPICOS

Avaliação diária (durante os 21 dias de tratamento) de parâmetros como aumento ou redução da ingesta e do peso corpóreo de todos os animais. Ao final do tratamento com os ratos foi feita a medição do comprimento naso-anal, da circunferência abdominal e torácica para o cálculo do IMC, relação abdômen/tórax e Lee index, que é indicativo da obesidade em animais.

3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As mensurações de leptina (R&D System Mouse Leptin DY498 e Millipore Rat Leptin #EZRL-83K), β -endorfina (β -endorfin Rat EIA Kit EK-022-33), adiponectina (Millipore Rat Adiponectin #EZRADP-62K), hormônio de crescimento (Millipore Rat/Mouse Hormone # EZRMGH-45K), proteína C reativa (R&D System Mouse CRP DY1829 e R&D System DY1744) e insulina (Millipore Rat/Mouse Insulin #EZRMI-13K) foram realizadas através de reações enzimáticas enzima-substrato (ELISA), utilizando kits disponíveis comercialmente usando o soro dos animais. A mensuração de glicose dos ratos foi realizada utilizando o glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche®), para tanto foi feita coleta de amostras de sangue dos ratos.

As análises de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-colesterol dos ratos foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica – UNESP – Campus de Botucatu.

3.7.1 Determinação da concentração de triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo SOLONI (1971), o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

3.7.2 Determinação da concentração de colesterol total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colesterol oxidase com hidrólise enzimática prévia dos ésteres mediante uma lipase. A água oxigenada liberada na oxidação produziu fenol oxidado e 4-aminofenazona, catalisada pela peroxidase, com formação de quinonimina vermelha (MOURA, 1982).

3.7.3 Determinação da concentração HDL-colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, encontravam-se as lipoproteínas de alta densidade (HDL), onde se determinou o colesterol incorporado às mesmas (LOPES-VIRELLA et al., 1977).

3.7.4 Determinação da concentração de LDL-colesterol e VLDL-colesterol

Os valores de LDL e VLDL-colesterol foram obtidos pela equação de Friedewald (COHN & ROTH, 1996).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças estatísticas entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguidas por teste de significância. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

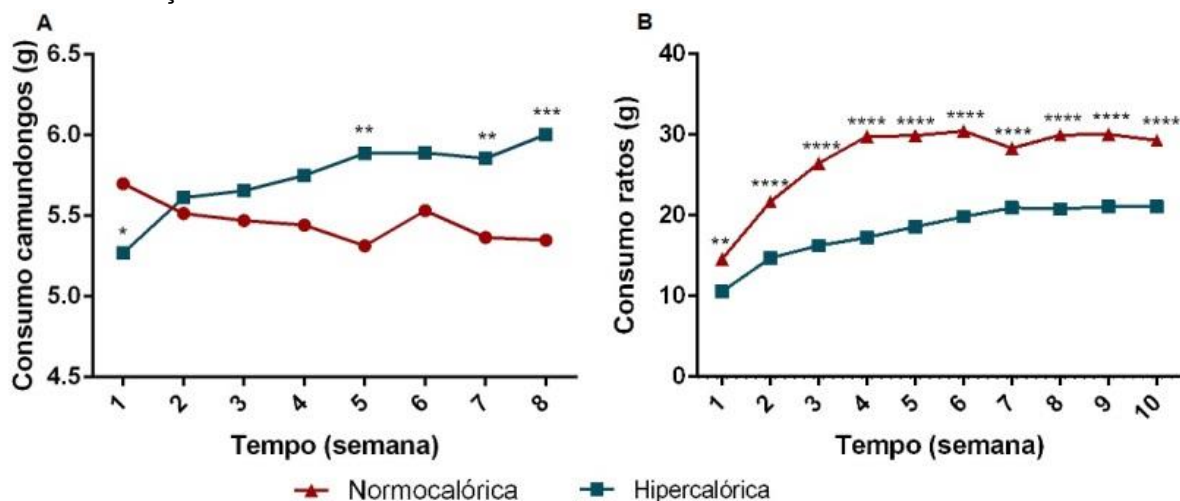
Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA INDUÇÃO DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS E RATOS

Após a ambientação dos animais, houve uma separação entre os que receberam a dieta normocalórica e os que receberam a dieta hipercalórica, com o intuito de induzir a obesidade. Como podemos observar na figura 4, os experimentos apresentaram resultados diferentes quanto ao consumo das dietas quando comparados camundongos e ratos. No experimento com camundongos (figura 4A), o grupo da dieta hipercalórica mostrou um consumo maior de ração quando comparado ao grupo de animais que recebeu dieta normocalórica, diferente do que ocorreu no processo de indução de obesidade em ratos (figura 4B). Segundo Stubbs e Whybrow *apud* Hariri e Thibault (2010) o esperado era uma diminuição no consumo devido à alta densidade de calorias presente na dieta, como ocorreu nos experimentos com os ratos.

Figura 4 - Média de consumo dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante a indução da obesidade

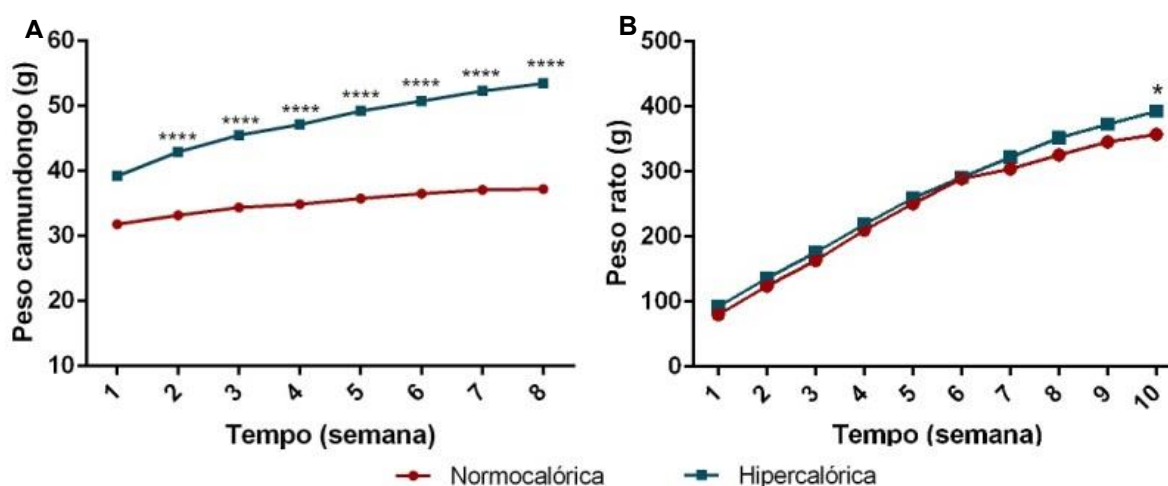


A) camundongos que receberam as dietas por 8 semanas e B) ratos que receberam as dietas por 10 semanas. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA de duas vias e teste a posteriori de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Com relação ao consumo da dieta hipercalórica durante as semanas observamos um aumento significativo de massa corpórea dos animais, tanto do

experimento com camundongo como o com ratos, quando comparados aos que consumiram a dieta normocalórica (Figura 5). Nos camundongos que receberam a dieta hipercalórica houve um aumento de 16,6g (44,1%) de massa corpórea em comparação ao grupo da dieta normocalórica. Por outro lado, no experimento com os ratos essa diferença de peso entre o grupo da dieta hipercalórica com a normocalórica foi de 40,9g (11,4%). Quando essa diferença é acima de 40% a obesidade pode ser considerada como severa e quando esta diferença estiver entre 10-25% pode se considerar que houve o desenvolvimento de obesidade moderada (HARROLD; WILLIAMS; WIDDOWSON, 2000; LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2002; WOODS et al., 2003). Dessa forma, a indução de obesidade através da dieta hipercalórica foi efetiva nos dois experimentos, no entanto pode-se observar que além da necessidade de maior tempo para induzir a obesidade em ratos (10 semanas) quando comparado aos camundongos (8 semanas), a severidade da obesidade foi maior em camundongos que em ratos, provavelmente pelo maior consumo de dieta hipercalórica em relação aos animais que receberam dieta normocalórica.

Figura 5 - Média de peso dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante a indução de obesidade



A) camundongos que receberam as dietas por 8 semanas e B) ratos que receberam as dietas por 10 semanas. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA de duas vias e teste a posteriori de Bonferroni * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

Considerando os dados absolutos, nota-se que o ganho de peso dos camundongos que receberam a dieta normocalórica foi de apenas 6,3g (Δ peso), enquanto os que receberam a dieta hipercalórica ganharam 16,8g (Tabela 4). Já com os ratos, o ganho de peso dos animais da dieta hipercalórica foi de 319,6g,

enquanto os animais da dieta normocalórica ganharam 287,6g (Tabela 4). Esse ganho de peso confirma a indução da obesidade com o uso da dieta padronizada.

Tabela 4 - Variação do peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais

	Camundongos		Ratos	
	Dieta normocalórica	Dieta hipercalórica	Dieta normocalórica	Dieta hipercalórica
Peso inicial	31,3 ± 1,0	37,4 ± 0,4	72,1 ± 1,0	81,0 ± 1,2
Após engorda	37,6 ± 1,4	54,2 ± 0,5 ****	359,7 ± 4,5	400,6 ± 3,8 ***
Δ peso	6,8	18,5	287,6	319,6

Dados expressos em média ± E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por teste T de student

p<0,001; *p<0,0001

Com estes dados, podemos inicialmente considerar que o processo de indução da obesidade usando dieta hipercalórica foi mais eficiente em camundongos Swiss que em ratos Wistar. Isto é importante já que o uso de camundongos requer menor espaço, menor quantidade de dieta e de produtos de tratamento. Por outro lado, a coleta de fluídos e amostras orgânicas para análise de mediadores é limitada nos camundongos quando comparamos com os ratos.

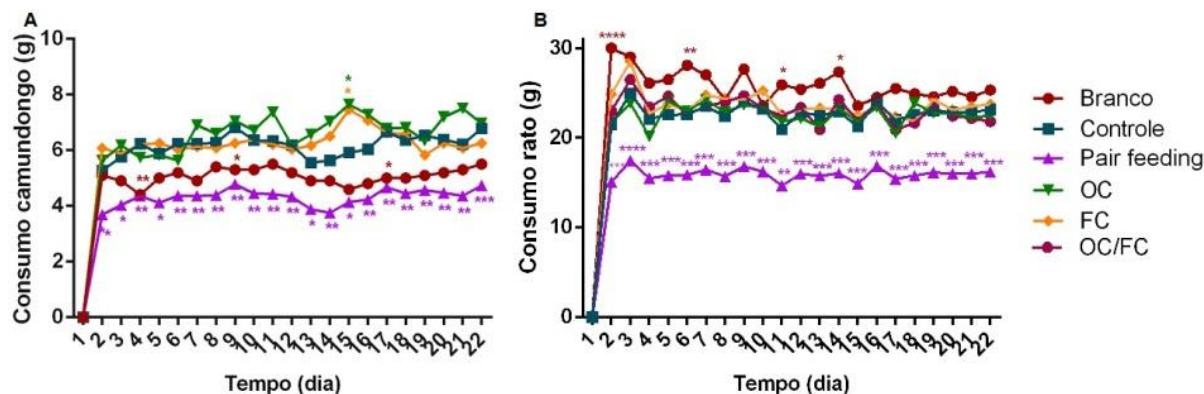
4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A OBESIDADE

4.2.1 Avaliação dos parâmetros macroscópicos

Após a indução da obesidade, os animais foram separados nos grupos descritos e tratados por 21 dias. Como se nota na figura 6, os animais do grupo *pair-feeding* diferiram significativamente no consumo de ração devido à restrição da alimentação. Os camundongos do grupo branco, comparado com os do grupo controle também ingeriram significativamente menor quantidade de ração em alguns dias, entretanto, o grupo OC e o FC ingeriram significativamente quantidades maiores que o grupo obeso em alguns dias (Figura 6). No experimento com os ratos, o grupo *pair-feeding*

apresentou diferença significativamente menor no consumo da ração em relação ao controle, e o grupo magro, OC, FC e OC/FC não apresentaram diferenças significativas no consumo em relação ao grupo controle.

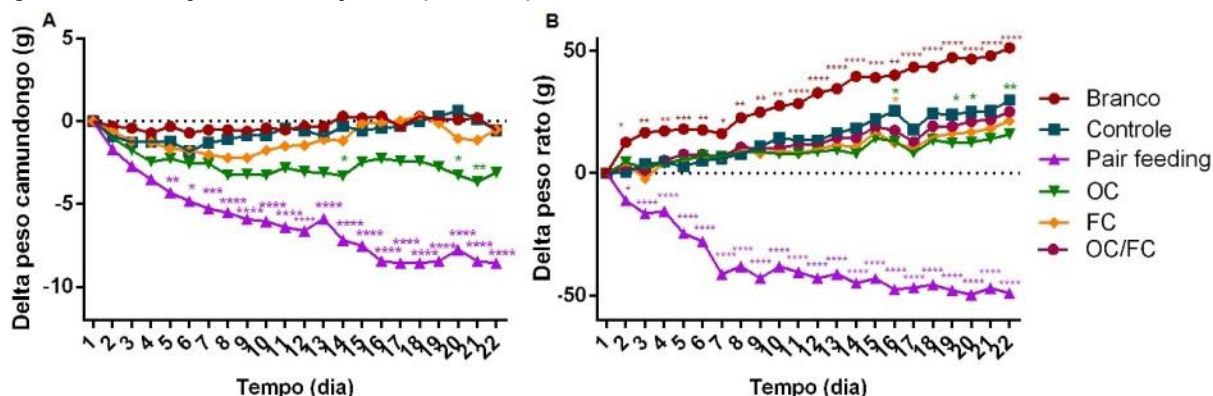
Figura 6 - Média de consumo de ração por grupo



Dados expressos em consumo/número de animais. A) camundongos e B) ratos. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA de duas vias e teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs controle

Quando se analisa o delta peso, pode-se notar que a administração de fitoesteróis de canola não foi efetiva em diminuir significativamente esse parâmetro nos camundongos (Figura 7A). No segundo experimento (ratos), pode-se observar um delta peso menor no dia 16 quando em comparação ao grupo obeso (Figura 7B). Já a administração do óleo de café foi efetiva em diminuir o ganho de peso em alguns dias tanto no primeiro como no segundo experimento (Figura 7), efeito que provavelmente poderia ser potencializado com um tratamento mais prolongado. Como esperado, os animais do grupo *pair-feeding* apresentaram um delta peso menor em ambos os experimentos.

Figura 7 - Avaliação da evolução do peso corporal dos animais



Dados expressos em Δ peso corporal. A) camundongos e B) ratos. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA de duas vias e teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs controle

Após os 21 dias de tratamento, os animais foram mortos e o sangue foi coletado, separando-se o soro para as análises bioquímicas. No segundo experimento além desses parâmetros também foi avaliado o IMC, o Lee index e relação abdômen/tórax, os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Perfil dos animais após os diferentes tratamentos

	Relação A/T	Lee index (g³/cm)	IMC (g/cm²)
Branco	1,06 ± 0,007 ^{***}	0,289 ± 0,001 [*]	0,62 ± 0,01
Controle	1,13 ± 0,01	0,297 ± 0,003	0,66 ± 0,02
<i>Pair-feeding</i>	1,05 ± 0,01 ^{***}	0,281 ± 0,002 ^{***}	0,55 ± 0,01 ^{****}
OC	1,10 ± 0,02	0,291 ± 0,002	0,64 ± 0,01
FC	1,14 ± 0,01	0,294 ± 0,003	0,65 ± 0,02
OC/FC	1,12 ± 0,01	0,300 ± 0,002	0,67 ± 0,01

Dados expressos em média ± erro padrão da média. Comparação feita com o grupo controle. *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001

A relação abdômen/tórax é um indicativo da obesidade, sendo que o valor resultante mais próximo de 1 significa que não houve uma deposição excessiva de gordura na região do abdômen (NOVELLI et al., 2007), não caracterizando o animal como obeso. Ao analisarmos a tabela 5, pode-se notar que os animais do grupo branco e os animais do grupo *pair-feeding* possuem relação abdômen/tórax mais próxima de 1, sendo diferente significativamente dos animais do grupo controle. Em relação aos grupos tratados os resultados obtidos se assemelham ao grupo controle, não apresentando diferenças significativas.

O Lee index também é uma medida usada para avaliar se o animal está obeso (NOVELLI et al., 2007) e nossos resultados mostram uma diferença significativa do grupo controle em relação ao grupo branco e *pair-feeding* em relação ao grupo controle, comprovando a indução da obesidade. Dentre os grupos tratados, não houve diferenças significativas quando comparados com o grupo controle.

Outra medida utilizada para classificação da obesidade em alguns experimentos com roedores é o IMC, o mesmo utilizado em humanos, porém neste parâmetro apenas o grupo *pair-feeding* apresentou diferença significativa em relação ao controle, não sendo possível observar a diferença com o grupo branco e os grupos tratados.

4.2.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

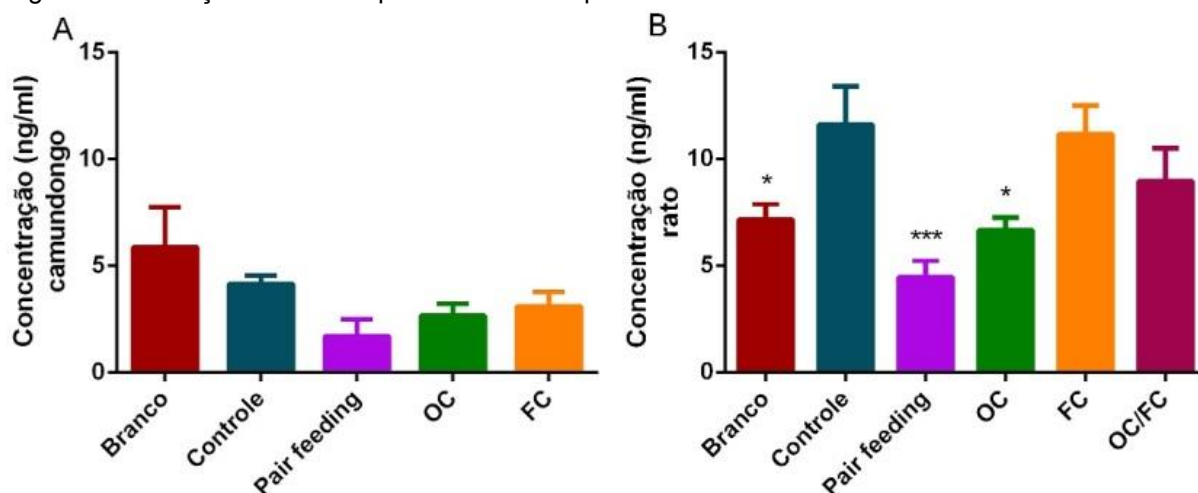
Com relação às análises bioquímicas, nos camundongos devido ao pequeno número de amostras foi possível realizar somente as análises de glicose, leptina, insulina e proteína C reativa.

4.2.3.1 Leptina

Leptina, um hormônio peptídico produzido principalmente pelos adipócitos, ocupa receptores de leptina presentes em vários locais do hipotálamo, fornecendo informação sobre o “*status*” energético do corpo para o centro regulador do sistema nervoso central (HURT et al., 2011). A leptina é produzida pelo tecido adiposo proporcionalmente ao volume dos adipócitos, portanto, na medida em que ocorre um acúmulo excessivo de gordura, a produção e concentração de leptina aumenta na circulação (HARROLD; WILLIAMS; WIDDOWSON, 2000). Em concentrações elevadas, o efeito da leptina, como consequência de sua ação no hipotálamo, é a diminuição do apetite e aumento da taxa de metabolismo, enquanto em baixas concentrações provoca o aumento do apetite e diminuição da taxa metabólica (HARROLD; WILLIAMS; WIDDOWSON, 2000). Na obesidade também pode ocorrer o quadro de resistência à leptina, dessa forma mesmo com níveis elevados, em animais com obesidade não ocorre a saciedade (KERSHAW; FLIER, 2004). Diferentemente do esperado, entre os camundongos a concentração de leptina circulante foi semelhante nos animais do grupo controle quando comparados aos animais do grupo branco ($5,86 \pm 1,88$ ng/mL branco vs $4,14 \pm 0,40$ ng/mL controle) (Figura 8A). Os grupos *pair-feeding*, OC e FC também não diferiram do grupo controle. Por outro lado, em ratos o grupo controle apresentou um aumento significativo em relação ao grupo branco ($7,19 \pm 0,68$ ng/mL branco vs $11,64 \pm 0,68$ ng/mL controle) e ao grupo *pair-feeding* ($4,49 \pm 0,74$ ng/mL). O grupo OC reduziu

significativamente em relação ao grupo controle ($6,67 \pm 0,60$ ng/mL) (Figura 8B), sendo que o grupo OC apresentou redução nos níveis de leptina circulante, de forma a se assemelhar ao grupo branco, que não é obeso. Essa redução dos níveis de leptina no grupo tratado com óleo de café verde pode ser devido aos compostos presentes no extrato, visto que estudos observaram uma relação negativa entre os níveis plasmáticos de leptina e ingestão de PUFA e demonstraram que estes são capazes de reduzir a expressão gênica de leptina tanto *in vivo* como *in vitro* (RACLOT et al., 1997; FUKUDA; IRITANI, 1999; RESELAND et al., 2001). Por outro lado, os tratamentos com os fitoesteróis de canola e a associação dos extratos não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Figura 8 - Avaliação dos níveis plasmáticos de leptina



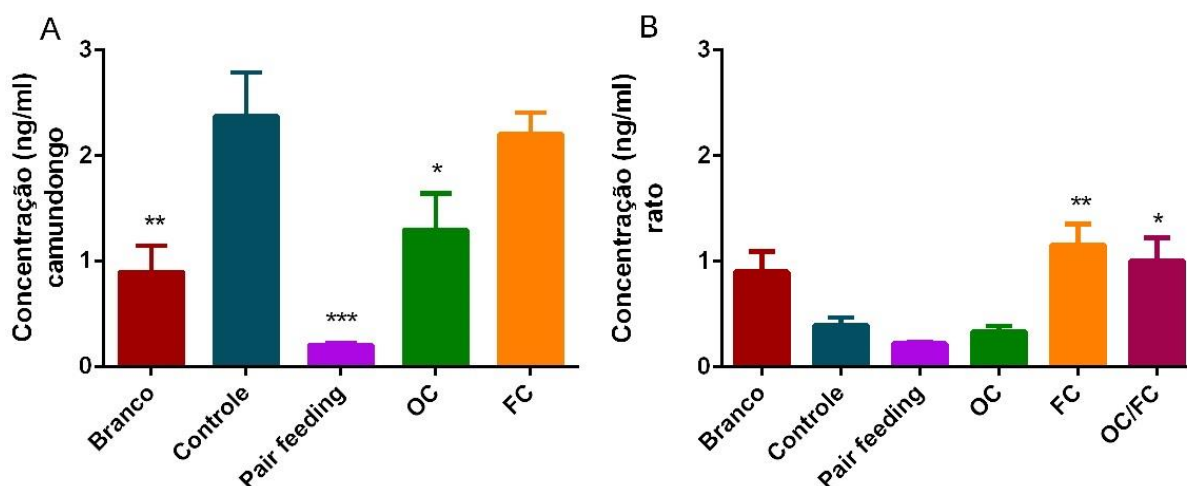
Dados expressos em média \pm E.P.M. A) camundongos e B) ratos. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle

4.2.3.2 Insulina

Quanto ao papel da insulina como reguladora do apetite e saciedade, apesar de exercer um potente efeito anabólico em tecidos periféricos, sua ação central é promover um balanço energético negativo (SCHWARTZ; WOODS; PORTE, 2000). Concentrações de insulina plasmática estão diretamente relacionadas ao peso corporal e, principalmente, à adiposidade corporal (BENOIT et al., 2004; HURT et al., 2011). No primeiro experimento, como era esperado o grupo controle aumentou significativamente os níveis circulantes de insulina quando comparado com o branco e o *pair-feeding* ($0,90 \pm 0,25$ ng/mL magro e $0,21 \pm 0,02$ ng/mL *pair-feeding* vs $2,37$

$\pm 0,42$ ng/mL controle). O grupo OC também apresentou níveis plasmáticos de insulina significativamente menores que o grupo controle ($1,30 \pm 0,35$ ng/mL) (Figura 9A), enquanto FC não afetou este parâmetro. Tais resultados estão em acordo com estudos que demonstram que os PUFAs, componentes do óleo de café verde têm efeitos na diminuição dos níveis de insulina plasmática (EYJOLFSON; SPRIET; DYCK, 2004; LEE et al., 2006). No experimento com ratos, diferentemente da hiperinsulinemia esperada, os níveis do grupo controle não diferiram significativamente do grupo branco. O grupo *pair-feeding* e OC foram semelhantes ao grupo controle. Curiosamente houve um aumento significativo nos grupos FC e OC/FC ($1,16 \pm 0,20$ pg/mL FC e $1,01 \pm 0,21$ OC/FC pg/mL vs $0,90 \pm 0,19$ pg/mL controle) (Figura 9B). O resultado observado não está em concordância com outros estudos que demonstraram que os fitoesteróis não alteram os níveis plasmáticos de insulina (CALPE-BERDIEL et al., 2008; MISAWA et al., 2008). No entanto, é importante ressaltar que a hiperinsulinemia não foi induzida no modelo de obesidade em ratos o que poderia explicar a diferença de efeitos dos tratamentos em ambos os modelos utilizados.

Figura 9 - Avaliação dos níveis plasmáticos de insulina

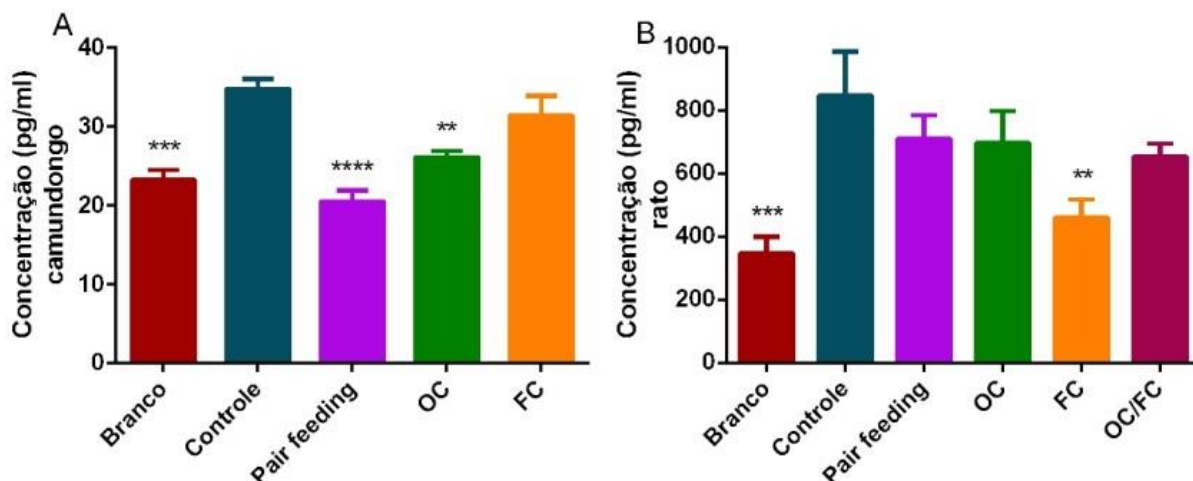


Dados expressos em média \pm E.P.M. A) camundongos e B) ratos. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle

4.2.3.3 Proteína C Reativa

A proteína C Reativa (PCR) é um marcador não específico da inflamação, no entanto uma das mais importantes correlações desta proteína é a adiposidade, sendo positivamente proporcional ao índice de massa corporal e à circunferência da cintura e do quadril (VISSER et al., 1999; WEE; MUKAMAL; HUANG, 2008). Estudos têm sugerido que um estilo de vida saudável associado à perda de peso correlaciona-se com reduções nos níveis de PCR, enquanto que a obesidade, o sedentarismo e o tabagismo aumentam seus níveis, através da ativação de mediadores inflamatórios (SELVIN; PAYNTER; ERLINGER, 2007). Os resultados mostram que os níveis plasmáticos de PCR estão significativamente aumentados no grupo controle em relação ao branco tanto em camundongos ($23,25 \pm 1,24 \mu\text{g/mL}$ branco vs $34,79 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ controle) como em ratos ($346,95 \pm 52,70 \text{ pg/mL}$ branco vs $845,50 \pm 139,98 \text{ pg/mL}$ controle) (Figura 10). No grupo *pair-feeding* se observou uma redução significativa apenas em camundongos ($20,52 \pm 1,39 \mu\text{g/mL}$). O tratamento com óleo de café verde também foi capaz de reduzir os níveis de PCR, porém essa diferença foi significativa apenas nos camundongos ($26,13 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$). Na literatura, os dados são controversos já que estudos clínicos demonstraram que uma dieta rica em ácido linoleico não foi capaz de alterar os níveis plasmáticos de CRP (LIOU et al., 2007), enquanto que a administração de ácido linoleico conjugado contribuiu com o aumento de CRP em humanos (RISERUS, 2002; SMEDMAN et al., 2007). No entanto, deve-se ressaltar que o extrato testado contém diferentes constituintes. Por outro lado, o tratamento com fitoesteróis de canola mostrou uma redução significativa apenas nos ratos ($461,12 \pm 56,83 \text{ pg/mL}$). Na literatura os resultados também são controversos, alguns estudos realizados em ratos e humanos demonstraram que os fitoesteróis não foram hábeis em alterar os níveis de PCR (CSONT et al., 2013; GARAIOVA et al., 2013), resultados em concordância com os experimentos com camundongos. Entretanto, em outros estudos demonstrou-se que os fitoesteróis são capazes de reduzir os níveis plasmáticos de PCR tanto em ratos como em humanos (XU et al., 2011; BECKER et al., 2013), assim como o observado em nossos experimentos com ratos.

Figura 10 - Avaliação dos níveis plasmáticos de proteína C reativa



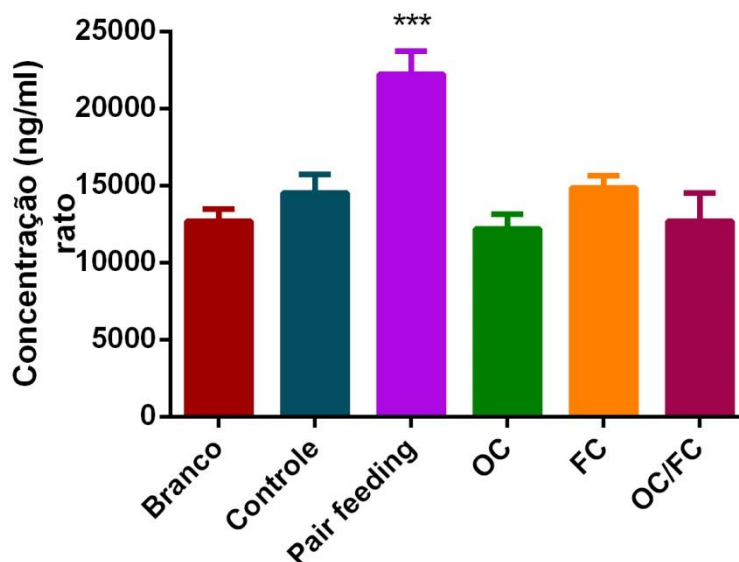
Dados expressos em média \pm E.P.M. A) camundongos e B) ratos. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs controle

4.2.3.4 Adiponectina

A adiponectina é uma proteína específica produzida pelos adipócitos cuja produção depende do estado nutricional, sendo que seus níveis encontram-se diminuídos na obesidade e na insulino-resistência (BERG; SCHERER, 2005; KERSHAW; FLIER, 2004; PRINS, 2002). A adiponectina tem função anti-aterogênica, regula a homeostasia dos lipídeos (aumenta oxidação lipídica) e da glicose, é anti-diabética e anti-inflamatória, diminuindo a ativação e proliferação de células T, impedindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentando as anti-inflamatórias (KERSHAW; FLIER, 2004; SINGLA; BARDOLOI; PARKASH, 2010). Diferentemente do esperado, os níveis de adiponectina no grupo controle estavam semelhantes ao grupo branco ($12697,37 \pm 794,77$ ng/mL branco vs $14510,80 \pm 1200,60$ ng/mL controle) (Figura 11). Em relação ao grupo controle, o grupo *pair-feeding* obteve níveis significativamente aumentados de adiponectina ($22216,94 \pm 1526,60$ ng/mL). Como é possível observar no gráfico, os grupos tratados não foram capazes de alterar os níveis circulantes de adiponectina. Mesmo considerando que o extrato de óleo de café verde possui tocoferóis e ácido linoleico, descritos como compostos capazes de aumentar os níveis de adiponectina (MARTINS et al., 2010; DEROSA et al., 2011; KASIMANICKAM; KASIMANICKAM, 2011), não houve alterações deste parâmetro, resultado também observado por

Shadman et al. (2013) que testou os efeitos isolados do ácido linoleico nos níveis de adiponectina em humanos.

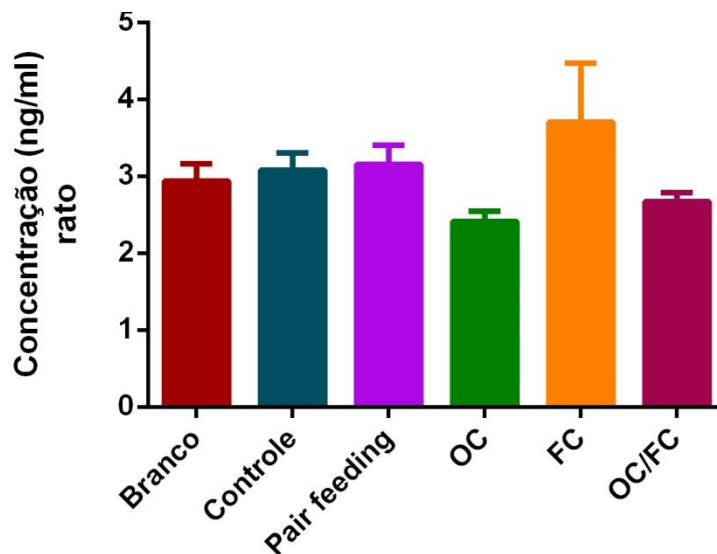
Figura 11 - Avaliação dos níveis plasmáticos de adiponectina em ratos



Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett *** $p < 0,001$ vs controle

4.2.3.5 β -endorfina

A β -endorfina é um peptídeo opióide endógeno produzido nos neurónios do hipotálamo e sua secreção pode ser estimulada pela ingestão de comida rica em gordura e açúcar (MATSUMURA et al., 2012). Estudos também demonstram que a β -endorfina é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina e melhorar a resistência à insulina (LEE et al., 2013). A ação no controle energético ainda não está totalmente esclarecida, no entanto a administração de β -endorfina aumenta a ingestão alimentar a curto prazo, porém a longo prazo este efeito não é observado (DUTIA et al., 2012; APPLEBYARD et al., 2003). Como é possível observar na figura 12, em nossos experimentos não encontramos diferenças significativas nos níveis de β -endorfina circulante, sugerindo que este mediador não é um bom marcador em modelos de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

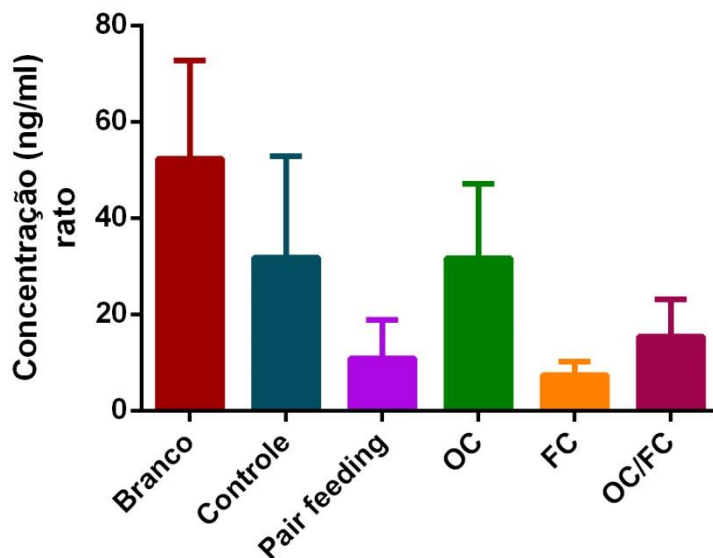
Figura 12 - Avaliação dos níveis plasmáticos de β -endorfina em ratos

Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett.

4.2.3.6 Hormônio de crescimento

Com relação ao hormônio de crescimento (GH), há dados que mostram que a obesidade desregula sua secreção, dessa forma, a secreção está diminuída nos animais obesos, mas pode ser restaurada com uma restrição calórica e perda de peso (SCACCHI; PINCELLI; CAVAGNINI, 1999; THOMAS et al., 2013). Estudos também mostraram que a administração de GH em adultos obesos promove uma diminuição da gordura corporal, além de diminuir os níveis de triacilgliceróis e aumentar a lipólise (NAM; MARCUS, 2000; WELTMAN et al., 2001). Em nossos experimentos não foi possível observar uma diminuição significativa do controle em relação ao branco ($52,36 \pm 20,36$ ng/mL branco vs $31,86 \pm 21,01$ ng/mL controle) (Figura 13). Em relação aos tratamentos também não houve diferenças significativas. Dados similares foram observados em diversos estudos que verificaram que o tratamento com fitoesteróis e ácido linoleico, compostos presentes em nossos produtos, também não afetaram os níveis plasmáticos de GH (COLLINS; VARADY; JONES, 2007; UCHIYAMA et al., 2013).

Figura 13 - Avaliação dos níveis plasmáticos do hormônio de crescimento em ratos

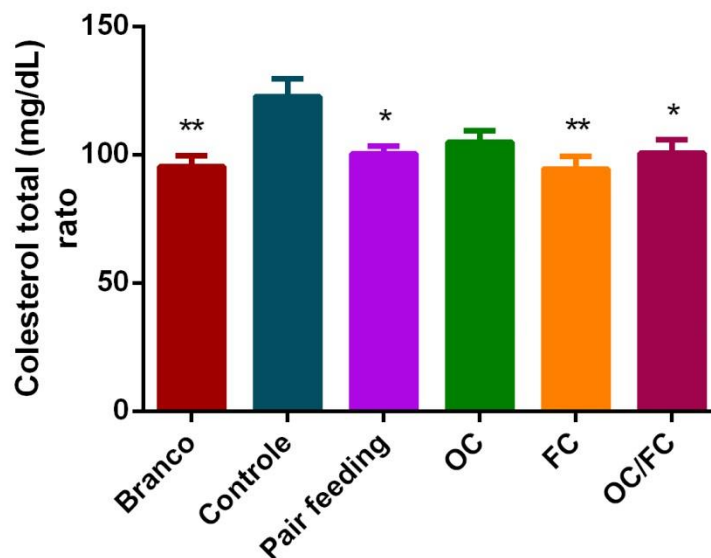


Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett.

4.2.3.7 Colesterol total

Atualmente, sabe-se que a obesidade está relacionada com hiperlipidemia, que é o aumento anormal de lipídeos na corrente sanguínea. Dessa forma, analisamos o perfil lipídico dos animais a fim de avaliar se houve uma melhora desses parâmetros nos animais tratados. Estudos demonstram que os níveis de colesterol estão aumentados em animais obesos (PARK; LEE, 2013; WIECEK et al., 2002). Nossos experimentos mostram que os níveis de colesterol total estavam aumentados significativamente no grupo controle em relação ao branco e ao *pair-feeding* ($95,38 \pm 4,37$ mg/mL branco e $100,35 \pm 3,00$ mg/mL *pair-feeding* vs $122,74 \pm 6,97$ mg/mL controle) (Figura 14). Com relação ao grupo OC, não houve alteração desse parâmetro, se assemelhando ao grupo controle. No entanto, no grupo FC e no grupo OC/FC verificou-se uma redução significativa do colesterol ($94,43 \pm 5,00$ mg/mL FC e $100,52 \pm 5,26$ mg/mL OC/FC). Essa redução pode ser explicada devido aos efeitos dos fitoesteróis que são hábeis em reduzir os níveis de colesterol devido à inibição de sua recaptação (LAGARDA; GARCÍA-LLATAS; FARRÉ, 2006; BARTŁOMIEJ; JUSTYNA; EWA, 2012).

Figura 14 - Avaliação dos níveis plasmáticos de colesterol total em ratos



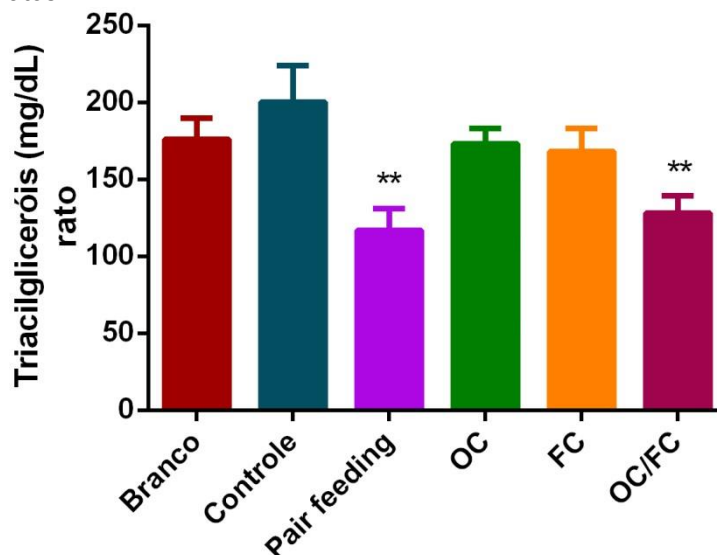
Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs controle

4.2.3.8 Triacilgliceróis

Estudos mostram que uma dieta rica em gordura aumenta os níveis de triacilgliceróis plasmáticos (DOURMASHKIN et al., 2005). Ademais, a gordura visceral está diretamente relacionada ao aumento de triacilgliceróis plasmáticos (SINGLA; BARDOLOI; PARKASH, 2010). Nosso experimento não mostrou diferenças entre o grupo controle e o grupo branco ($175,87 \pm 13,83$ mg/mL branco vs $200,09 \pm 24,00$ mg/mL controle) (Figura 15), no entanto, no grupo *pair-feeding* essa diminuição foi significativa ($117,00 \pm 14,09$ mg/mL). Em nossos experimentos o tratamento com óleo de café verde que é rico em PUFA não reduziu significativamente os níveis de triacilgliceróis plasmáticos. Resultado semelhante ao encontrado por Shadman et al. (2013) que se utilizou de cápsulas contendo PUFA para analisar seu efeito em pacientes diabéticos com sobrepeso. O grupo FC não diferiu do grupo controle, resultado similar ao previamente descrito por Bartłomiej; Justyna e Ewa (2012). Por outro lado, o tratamento com a associação de óleo de café verde com fitoesteróis de canola teve melhor efeito em relação aos extratos isolados, reduzindo significativamente os níveis plasmáticos de triacilgliceróis

($128,31 \pm 10,95$ mg/mL) em níveis similares àqueles induzidos pela restrição da dieta.

Figura 15 - Avaliação dos níveis plasmáticos de triglicérides em ratos

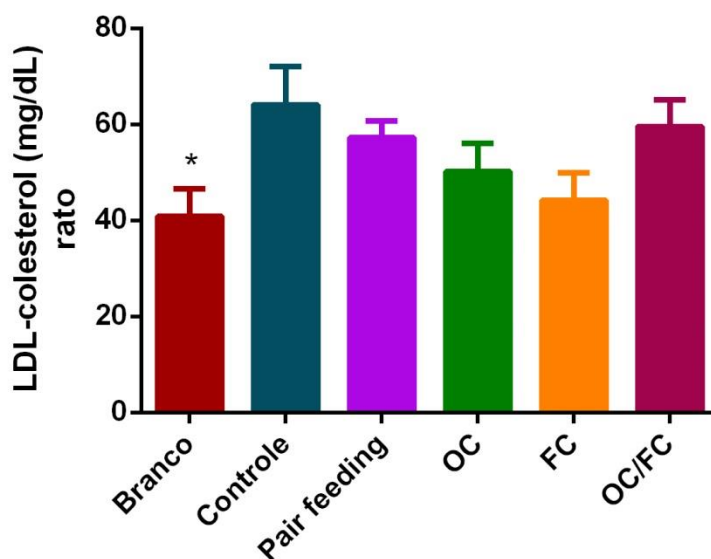


Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett ** $p < 0,01$ vs controle

4.2.3.9 LDL-colesterol

A concentração plasmática de LDL-colesterol também está diretamente relacionada com a adiposidade corporal (WIECEK et al., 2002). Em nosso estudo, verificamos que os níveis plasmáticos de LDL-colesterol aumentaram de forma significativa no grupo controle em relação ao branco ($40,87 \pm 5,67$ mg/mL branco vs $64,13 \pm 7,97$ mg/mL controle). Em relação aos grupos *pair-feeding*, OC, FC e OC/FC não houve uma alteração nos níveis de LDL-colesterol em relação ao grupo controle (Figura 16). Apesar de estudos terem demonstrado que o aumento da ingestão de fitoesteróis reduziu os níveis de LDL-colesterol (KATAN et al., 2003; LAGARDA; GARCÍA-LLATAS; FARRÉ, 2006), nossos resultados com os fitoesteróis de canola não promoveram esta redução. Estudos demonstram que o ácido linoleico, presente no óleo de café verde, não é capaz de alterar os níveis plasmáticos de LDL-colesterol em humanos (SHADMAN et al., 2013), resultados semelhantes aos encontrados em nossos experimentos com roedores.

Figura 16 - Avaliação dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol em ratos

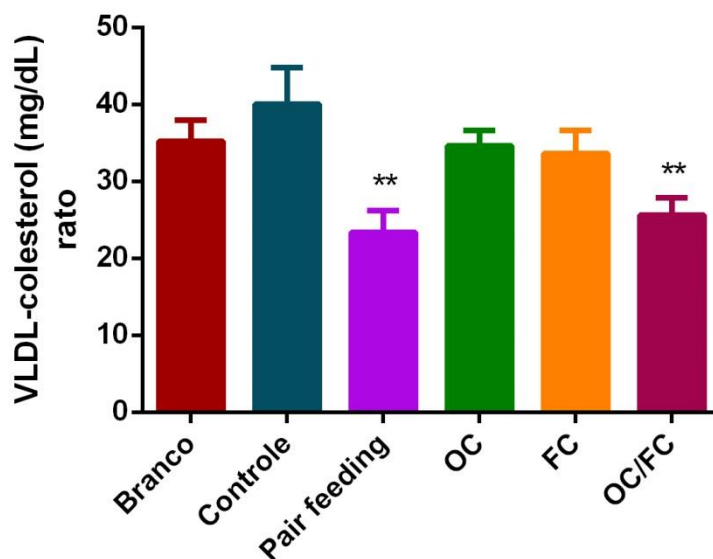


Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett * $p < 0,05$ vs controle

4.2.3.10 VLDL-colesterol

O VLDL-colesterol é responsável pela distribuição do triacilglicerol para vários tecidos como o coração, tecido adiposo e músculo esqueléticos (DIJK; KERSTEN, 2014). Segundo Kim et al. (2013) uma dieta rica em gordura é responsável pelo aumento dos níveis de VLDL-colesterol plasmáticos e esses são responsáveis por aumento de casos de aterosclerose em obesos (ECKEL; BARAUCH; ERSHOW, 2002). Em nossos experimentos não se verificou diferença nas concentrações plasmáticas de VLDL-colesterol entre os grupos branco e controle. Os grupos OC e FC também não diferiram do grupo controle. Houve uma redução significativa no VLDL-colesterol plasmático no grupo *pair-feeding* e no grupo OC/FC ($23,40 \pm 2,81$ mg/mL *pair-feeding* e $25,66 \pm 2,19$ mg/mL OC/FC vs $40,02 \pm 4,80$ mg/mL controle) (Figura 17). Estudos em humanos com dieta enriquecida com fitoesteróis não produziram alterações nos níveis plasmáticos de VLDL-colesterol, estando nossos estudos em concordância com estes resultados (OOI et al., 2007). Estudos realizados com camundongos com obesidade induzida por dieta hipercalórica mostram que o grupo tratado com tocoferóis reduziu os níveis de VLDL-colesterol plasmáticos em relação ao seu controle (KIM et al., 2013). Apesar do óleo de café verde conter tocoferóis, o extrato testado não foi hábil em reduzir o VLDL-colesterol quando administrado isoladamente.

Figura 17 - Avaliação dos níveis plasmáticos de VLDL-colesterol em ratos

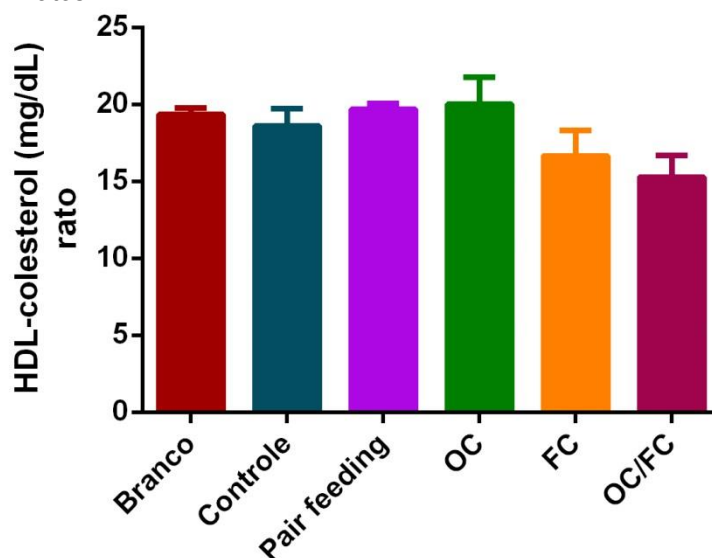


Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett ** $p < 0,01$ vs controle

4.2.3.11 HDL-colesterol

O HDL-colesterol tem a função de transportar o excesso de colesterol dos tecidos para o fígado, posteriormente o colesterol é removido do organismo no lúmen intestinal através da bile (NAKAMURA; YUDELL; LOOR, 2013). Estudos demonstram que a concentração plasmática de HDL está inversamente relacionada à adiposidade, sendo assim, animais obesos tem uma diminuição dos níveis plasmáticos de HDL em relação aos não obesos (SINGLA; BARDOLOI; PARKASH, 2010; WIECEK et al., 2002). Como pode-se notar na figura 18, nossos resultados não apresentaram diferenças significativas nos níveis de HDL-colesterol sanguíneo em nenhum dos grupos, mesmo considerando que os extratos testados possuem constituintes descritos na literatura com eficazes no aumento dos níveis de HDL-colesterol (RASSIAS; KESTIN; NESTEL, 1991; BARTŁOMIEJ; JUSTYNA; EWA, 2012; GUEBRE-EGZIABHER et al., 2013; SHADMAN et al., 2013).

Figura 18 - Avaliação dos níveis plasmáticos de HDL-colesterol em ratos

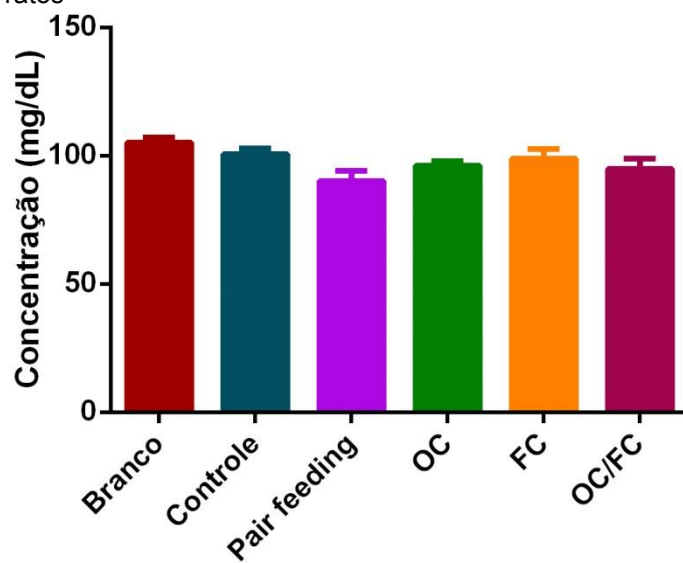


Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett.

4.2.3.12 Glicose

Estudos indicam que na obesidade há uma diminuição da captação de glicose pelo tecido adiposo, sugerindo um aumento no plasma (SINGLA; BARDOLOI; PARKASH, 2010), porém nos experimentos não foi possível observar diferenças nenhum dos grupos estudados (Figura 19). Os resultados apresentados pelo tratamento com fitoesteróis estão em concordância com os estudos de Devaraj, Autret e Jialal (2006), que testaram uma bebida rica em fitoesteróis em humanos e como resultado não houve alteração do nível de glicose. Assim como o tratamento com o óleo de café verde está em acordo com o resultado encontrado por Castellano et al. (2013) no qual tratamento realizados em leitões com uma dieta enriquecida com PUFA's não altera os níveis de glicose plasmática.

Figura 19 - Avaliação dos níveis plasmáticos de glicose em ratos



Dados expressos em média \pm E.P.M. Diferenças estatísticas testadas por ANOVA e teste a posteriori de Dunnett.

Considerações Finais e Conclusão

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos pelo trabalho, algumas considerações finais são importantes. Em relação à padronização do modelo de obesidade por dieta hipercalórica em camundongos e ratos, verificamos que a indução da obesidade foi alcançada em ambos os roedores. Pudemos constatar que para os camundongos o estabelecimento da obesidade foi mais eficaz, já que foram necessárias oito semanas para se atingir um nível de obesidade severa, enquanto que em ratos, além do período ter sido maior (10 semanas), obtivemos apenas uma obesidade moderada quanto comparamos com os camundongos. Por outro lado, o modelo utilizando ratos permite a obtenção de maiores quantidades de amostras biológicas para a realização das dosagens, quando comparamos com os camundongos que possuem esta limitação.

Considerando-se as espécies vegetais estudadas com o objetivo de atuarem como produtos no controle da obesidade, foi possível com base nos resultados obtidos (Tabelas 6 e 7) estabelecer algumas conclusões.

Tabela 6 - Sumário dos resultados obtidos no experimento com camundongos

	Branco	<i>Pair-feeding</i>	Café	Canola
Consumo	↓	↓	↑	↑
Delta peso	-	↓	↓	-
Leptina	-	-	-	-
Insulina	↓	↓	↓	-
PCR	↓	↓	↓	-

Tabela 7 - Sumário dos resultados obtidos no experimento com ratos

	Branco	Pair-feeding	Café	Canola	Café/Canola
Consumo	-	↓	-	-	-
Delta peso	↑	↓	↓	-	-
Relação A/T	↓	↓	-	-	-
Lee index	↓	↓	-	-	-
IMC	-	↓	-	-	-
Leptina	↓	↓	↓	-	-
Insulina	-	-	-	↑	↑
PCR	↓	-	-	↓	-
Adiponectina	-	↑	-	-	-
β-endorfina	-	-	-	-	-
GH	-	-	-	-	-
Colesterol	↓	↓	-	↓	↓
Triacilgliceróis	-	↓	-	-	↓
LDL	↓	-	-	-	-
VLDL	-	↓	-	-	↓
HDL	-	-	-	-	-
Glicose	-	-	-	-	-

O óleo de café verde foi eficaz em diminuir o delta peso tanto nos ratos como nos camundongos, além de reduzir os níveis de insulina e PCR nos camundongos e os níveis de leptina nos ratos. O tratamento com fitoesteróis de canola não alterou nenhum parâmetro nos camundongos, entretanto reduziu os níveis de PCR e colesterol total no experimento com ratos. O tratamento com a associação de óleo de café verde e fitoesteróis de canola, que somente foi testada nos ratos, apresentou redução nos níveis de colesterol total, triacilgliceróis e VLDL-colesterol, mostrando para estes parâmetros que a associação foi eficaz quando comparados ao uso isolado dos produtos.

Estes resultados mostram a potencialidade do óleo do café no controle da obesidade, no entanto, maior eficácia poderia ser obtida utilizando-se um esquema de tratamento mais prolongado que aquele utilizado no presente estudo.

Desde que o tratamento da obesidade mostra-se como uma estratégia complexa, é possível sugerir que a incorporação destes produtos na dieta de pacientes obesos em associação com fármacos anti-obesidade e exercício físico, poderia representar uma estratégia associada para facilitar o controle da obesidade nestes pacientes, no entanto, estudos mais detalhados e prolongados seriam necessários.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR SHAGHAGHI, M.; ABUMWEIS, S. S.; JONES, P. J. H. **Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis.** Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics. v. 113, n. 11, p. 1494–503, nov. 2013.

APPLEYARD, S. M. et al. **A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis.** Endocrinology. v. 144, n. 5, p. 1753–60, maio 2003.

ARTMANN, A. et al. **Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine.** Biochimica et biophysica acta. v. 1781, n. 4, p. 200–12, abr. 2008.

BAHIA, L. et al. **The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study.** BMC public health. v. 12, n. 1, p. 440, jan. 2012.

BALLINGER, A.; PEIKIN, S. R. **Orlistat: its current status as an anti-obesity drug.** European journal of pharmacology. v. 440, n. 2-3, p. 109–17, 12 abr. 2002.

BARTŁOMIEJ, S.; JUSTYNA, R.-K.; EWA, N. **Bioactive compounds in cereal grains - occurrence, structure, technological significance and nutritional benefits - a review.** Food science and technology international. v. 18, n. 6, p. 559–68, dez. 2012.

BECKER, D. J. et al. **Phytosterols, red yeast rice, and lifestyle changes instead of statins: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial.** American heart journal. v. 166, n. 1, p. 187–96, jul. 2013.

BENOIT, S. C. et al. **Insulin and leptin as adiposity signals.** Recent progress in hormone research. v. 59, p. 267–85, jan. 2004.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. **Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease.** Circulation research. v. 96, n. 9, p. 939–49, 13 maio 2005.

BISHT, S.; SISODIA, S. **Coffea arabica: A wonder gift to medical science.** Journal of Natural Pharmaceuticals. v. 1, n. 1, p. 58, 2010.

BOELSMA, E.; HENDRIKS, H. F.; ROZA, L. **Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids.** The American journal of clinical nutrition. v. 73, n. 5, p. 853–64, maio 2001.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. **High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents.** Obesity. v. 15, n. 4, p. 798–808, abr. 2007.

CALPEL-BERDIEL, L. et al. **Phytosterols do not change susceptibility to obesity, insulin resistance, and diabetes induced by a high-fat diet in mice.** Metabolism: clinical and experimental. v. 57, n. 11, p. 1497-501, 2008.

CANCELLO, R. et al. **Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity.** Diabetes. v. 55, n. 6, p. 1554–61, jun. 2006.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. **Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene.** PloS one. v. 6, n. 8, p. e23407, jan. 2011.

CASTELLANO, C.-A. et al. **Dietary conjugated α -linolenic acid did not improve glucose tolerance in a neonatal pig model.** European journal of nutrition. 5 set. 2013.

CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D. **The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism.** Carcinogenesis. v. 19, n. 8, p. 1369–75, ago. 1998.

COHN, R. M.; ROTH, K. S. **Lipid and lipoprotein metabolism.** Biochemistry and disease. Baltimore: Williams and Wilkins Publishers, p.280, 1996.

COLLINS, M.; VARADY, K. A; JONES, P. J. H. **Modulation of apolipoprotein A1 and B, adiponectin, ghrelin, and growth hormone concentrations by plant**

sterols and exercise in previously sedentary humans. Canadian journal of physiology and pharmacology. v. 85, n. 9, p. 903–10, set. 2007.

CSONT, T. et al. **Effect of a multivitamin preparation supplemented with phytosterol on serum lipids and infarct size in rats fed with normal and high cholesterol diet.** Lipids in health and disease. v. 12, p. 138, jan. 2013.

DE ROOS, B.; MAVROMMATIS, Y.; BROUWER, I. A. **Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease.** British journal of pharmacology. v. 158, n. 2, p. 413–28, set. 2009.

DE SIMONE, G.; D'ADDEO, G. **Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk.** Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases. v. 18, n. 5, p. 337–41, jun. 2008.

DEROSA, G. et al. **Effects of n-3 PUFA on insulin resistance after an oral fat load.** European Journal of Lipid Science and Technology. v. 113, n. 8, p. 950–960, 14 ago. 2011.

DEVARAJ, S.; AUTRET, B. C.; JIALAL, I. **Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers.** The American journal of clinical nutrition. v. 84, n. 4, p. 756–61, out. 2006.

DIJK, W.; KERSTEN, S. **Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4.** Trends in endocrinology and metabolism. n. Vldl, p. 1–10, 4 jan. 2014.

DIVOUX, A. et al. **Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes.** The Journal of clinical endocrinology and metabolism. v. 97, n. 9, p. E1677–85, set. 2012.

DIXIT, P. et al. **Anti-obese activity of Butea monosperma (Lam) bark extract in experimentally induced obese rats.** Indian journal of experimental biology. v. 50, n. 7, p. 476–83, jul. 2012.

DOURMASHKIN, J. T. et al. **Different forms of obesity as a function of diet composition.** International journal of obesity. v. 29, n. 11, p. 1368–78, nov. 2005.

DREW, B. S.; DIXON, A. F.; DIXON, J. B. **Obesity management: update on orlistat.** Vascular health and risk management. v. 3, n. 6, p. 817–21, jan. 2007.

DUTIA, R. et al. **β -Endorphin antagonizes the effects of α -MSH on food intake and body weight.** Endocrinology. v. 153, n. 9, p. 4246–55, set. 2012.

ECKEL, R. H.; BARAUCH, W. W.; ERSHOW, A. **Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease.** Circulation. v. 105, n. 24, p. 2923–2928, 18 jun. 2002.

EYJOLFSON, V.; SPRIET, L. L.; DYCK, D. J. **Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans.** Medicine and science in sports and exercise. v. 36, n. 26, p. 814-20, 2004.

FINKELSTEIN, E. A et al. **Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates.** Health affairs. v. 28, n. 5, p. w822–31, 2009.

FONTAINE, K. R. et al. **Years of life lost due to obesity.** JAMA : the journal of the American Medical Association. v. 289, n. 2, p. 187–93, 8 jan. 2003.

FORD, E. S.; MOKDAD, A. H. **Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere.** The Journal of clinical endocrinology and metabolism. v. 93, n. 11 Suppl 1, p. S1–8, nov. 2008.

FUKUDA, H.; IRITANI, N. **Transcriptional regulation of leptina gene promoter in rat.** FEBS letters. v. 455, p. 169-9, 1999.

GARAIOVA, I. et al. **Effect of a plant sterol, fish oil and B vitamin combination on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic children and adolescents: a pilot study.** Nutrition journal. v. 12, p. 7, jan. 2013.

GARCÍA-LLATAS, G.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T. **Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food.** Chemistry and physics of lipids. v. 164, n. 6, p. 607–24, set. 2011.

GAULLIER, J.-M. et al. **Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese.** The British journal of nutrition. v. 97, n. 3, p. 550–60, mar. 2007.

GRATTAN, B. J. **Plant sterols as anticancer nutrients: evidence for their role in breast cancer.** Nutrients. v. 5, n. 2, p. 359–87, fev. 2013.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammatory mechanisms in obesity.** Annual review of immunology. v. 29, p. 415–45, jan. 2011.

GUEBRE-EGZIABHER, F. et al. **Differential dose effect of fish oil on inflammation and adipose tissue gene expression in chronic kidney disease patients.** Nutrition. v. 29, n. 5, p. 730–6, maio 2013.

GUMY, C. et al. **Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by plant extracts used as traditional antidiabetic medicines.** Fitoterapia. v. 80, n. 3, p. 200–5, abr. 2009.

HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. **Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases.** European heart journal. v. 29, n. 24, p. 2959–71, dez. 2008.

HAN, L. et al. **Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from Kochia scoparia fruit.** Phytotherapy research. v. 882, n. August, p. 877–882, 2006.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. **High-fat diet-induced obesity in animal models.** Nutrition research reviews. v. 23, n. 2, p. 270–99, dez. 2010.

HARROLD, J. A.; WILLIAMS, G.; WIDDOWSON, P. S. **Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus.** Journal of neurochemistry. v. 74, n. 3, p. 1224–8, mar. 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammation and metabolic disorders**. *Nature*. v. 444, n. 7121, p. 860–7, 14 dez. 2006.

HUBER, W. W. et al. **Potential chemoprotective effects of the coffee components kahweol and cafestol palmitates via modification of hepatic N-acetyltransferase and glutathione S-transferase activities**. *Environmental and molecular mutagenesis*. v. 44, n. 4, p. 265–76, jan. 2004.

HURT, R. T. et al. **Obesity epidemic: overview, pathophysiology, and the intensive care unit conundrum**. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. v. 35, n. 5 Suppl, p. 4S–13S, set. 2011.

HUTTON, B.; FERGUSON, D. **Changes in body weight and serum lipid profile in obese patients treated with orlistat in addition to a hypocaloric diet: a systematic review of randomized clinical trials**. *The American journal of clinical nutrition*. v. 80, n. 6, p. 1461–8, dez. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2013.

JAIME, P. C. et al. **Brazilian obesity prevention and control initiatives**. *Obesity reviews*. v. 14 Suppl 2, n. November, p. 88–95, nov. 2013.

JONES, P. J. *Clinical nutrition: 7. Functional foods--more than just nutrition*. *CMAJ: Canadian Medical Association journal*. v. 166, n. 12, p. 1555–63, 11 jun. 2002.

JOURDAN, C. et al. **Gene-PUFA interactions and obesity risk**. *The British journal of nutrition*. v. 106, n. 8, p. 1263–72, out. 2011.

KARAMADOUKIS, L. et al. **An unusual complication of treatment with orlistat**. *Clinical nephrology*. v. 71, n. 4, p. 430–432, 2009.

KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V. R. **Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin**

concentrations, and mRNA expression of PPAR γ and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology*. v. 76, n. 3, p. 482–91, ago. 2011.

KATAN, M. B. et al. **Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels.** *Mayo Clinic proceedings*. v. 78, n. 8, p. 965–78, ago. 2003.

KATZMARZYK, P. T.; JANSSEN, I. **The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update.** *Canadian journal of applied physiology*. v. 29, n. 1, p. 90–115, fev. 2004.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. **Adipose tissue as an endocrine organ.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. v. 89, n. 6, p. 2548–56, jun. 2004.

KIM, D. Y. et al. **Effects of d- α -tocopherol supplements on lipid metabolism in a high-fat diet-fed animal model.** *Nutrition research and practice*. v. 7, n. 6, p. 481–7, dez. 2013.

KIM, J. Y.; JUNG, K. S.; JEONG, H. G. **Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages.** *FEBS letters*. v. 569, n. 1-3, p. 321–6, 2 jul. 2004.

LAGARDA, M. J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. **Analysis of phytosterols in foods.** *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. v. 41, n. 5, p. 1486–96, 28 ago. 2006.

LEAN, M. E. **How does sibutramine work?** *International journal of obesity*. v. 25 Suppl 4, p. S8–11, dez. 2001.

LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. **Obesity, Inflammation and Diet.** *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*. v. 16, n. 3, p. 143–152, set. 2013.

LEE, J. et al. **Saturated , but not n-6 polyunsaturated , fatty acids induce insulin resistance : role of intramuscular accumulation of lipid metabolites.** *Journal of applied physiology*. v. 100, n. 5, p. 1467-74, 2006.

LEE, W.-J. et al. **Rhodiola-water extract induces β -endorphin secretion to lower blood pressure in spontaneously hypertensive rats.** *Phytotherapy research*. v. 27, n. 10, p. 1543–7, out. 2013.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. **Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity.** *American journal of physiology, regulatory, integrative and comparative physiology*. v. 282, n. 1, p. R46–54, jan. 2002.

LI, H. et al. **EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism.** *Kidney international*. v. 67, n. 3, p. 867–74, mar. 2005.

LIOU, Y. A. et al. **Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men.** *The Journal of nutrition*. v. 137, n. 4, p. 945–52, abr. 2007.

LOPES-VIRELLA, M. F. et al. **Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by different methods.** *Clinical Chemistry*. v.13, n.5, p.882-884, 1977.

MARTINS, S. V et al. **Serum adipokine profile and fatty acid composition of adipose tissues are affected by conjugated linoleic acid and saturated fat diets in obese Zucker rats.** *The British journal of nutrition*. v. 103, n. 6, p. 869–78, mar. 2010.

MATHEW, B. et al. **Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment.** *The American journal of the medical sciences*. v. 334, n. 1, p. 23–30, jul. 2007.

MATSUMURA, S. et al. **Dietary fat ingestion activates β -endorphin neurons in the hypothalamus.** *FEBS letters*. v. 586, n. 8, p. 1231–5, 24 abr. 2012.

MAYER, M. A et al. **Recent advances in obesity pharmacotherapy.** *Current clinical pharmacology*. v. 4, n. 1, p. 53–61, jan. 2009.

MENDILAHARU, M. et al. **Phytosterols and risk of lung cancer: a case-control study in Uruguay.** Lung cancer. v. 21, n. 1, p. 37–45, 1998.

MISAWA, E. et al. Administration of phytosterols isolated from Aloe vera gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. Obesity research & clinical practice. v. 2, n. 4, p. 239-45, 2008.

MOKDAD, A H. et al. **The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States.** JAMA : the journal of the American Medical Association. v. 286, n. 10, p. 1195–200, 12 set. 2001.

MORA, M. P. et al. **Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity.** Chemistry and physics of lipids. v. 101, n. 2, p. 255–65, set. 1999.

MOURA, R. A. **Técnicas de laboratório.** 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. **Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events.** Journal of the American College of Cardiology. v. 58, n. 20, p. 2047–67, 8 nov. 2011.

NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. **Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids.** Progress in lipid research. v. 53, n. December, p. 124-44, 18 dez. 2013.

NAKAYAMA, S. et al. **Protective effect of alpha-tocopherol-6-O-phosphate against ultraviolet B-induced damage in cultured mouse skin.** The Journal of investigative dermatology. v. 121, n. 2, p. 406–11, ago. 2003.

NAM, S. Y.; MARCUS, C. **Growth hormone and adipocyte function in obesity.** Hormone research. v. 53 Suppl 1, p. 87–97, 2000.

NIELSEN, M. J. et al. **Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide.** Journal of lipid research. v. 45, n. 6, p. 1027–9, jun. 2004.

NOVELLI, E. L. B. et al. **Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats.** *Laboratory animals.* v. 41, n. 1, p. 111–9, jan. 2007.

O'BRIEN, P. E.; DIXON, J. B. **The extent of the problem of obesity.** *American journal of surgery.* v. 184, n. 6B, p. 4S–8S, dez. 2002.

OOI, E. M. M. et al. **Dietary plant sterols supplementation does not alter lipoprotein kinetics in men with the metabolic syndrome.** *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* v. 16, n. 4, p. 624–31, jan. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Obesity.** OMS, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>> Acesso em: 25 nov. 2013.

PARK, K.-M.; LEE, S. H. **Anti-hyperlipidemic activity of *Rhynchosia nulubilis* seeds pickled with brown rice vinegar in mice fed a high-fat diet.** *Nutrition research and practice.* v. 7, n. 6, p. 453–9, dez. 2013.

PEREDA, M. D. C. V. **Avaliação dos efeitos do óleo extraído dos grãos verdes de *Coffea arabica* L. e dos fitoesteróis de *Brassica campestris* L. na melhora da celulite e da gordura localizada.** Campinas, UNICAMP, 2009.

PEREIRA, L.; FRANCISCHI, R.; LANCHETA JR, A. **Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina.** *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia.* v. 47, p. 111–127, 2003.

PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. **Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance.** *Biochemical and biophysical research communications.* v. 341, n. 2, p. 507–14, 10 mar. 2006.

PRINS, J. B. **Adipose tissue as an endocrine organ.** *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* v. 16, n. 4, p. 639–651, dez. 2002.

RACLOT, T. et al. **Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues.** *Journal of lipid research.* v. 38, n. 10, p. 1963–72, out. 1997.

RASSIAS, G.; KESTIN, M.; NESTEL, P. J. **Linoleic acid lowers LDL cholesterol without a proportionate displacement of saturated fatty acid.** European journal of clinical nutrition. v. 45, n. 6, p. 315-20, 1991.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. **Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle.** The Journal of nutritional biochemistry. v. 19, n. 11, p. 717–26, nov. 2008.

RESELAND, J. E. et al. **Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids.** Journal of lipid research. v. 42, n. 5, p. 743–50, maio 2001.

RISERUS, U. **Supplementation With Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Dependent Oxidative Stress and Elevated C-Reactive Protein: A Potential Link to Fatty Acid-Induced Insulin Resistance.** Circulation. v. 106, n. 15, p. 1925–1929, 23 set. 2002.

SCACCHI, M.; PINCELLI, A. I.; CAVAGNINI, F. **Growth hormone in obesity.** International journal of obesity and related metabolic disorders. v. 23, n. 3, p. 260–271, 1999.

SCHWARTZ, M.; WOODS, S.; PORTE, D. **Central nervous system control of food intake.** Nature. v. 404, p. 661–671, 2000.

SELVIN, E.; PAYNTER, N.; ERLINGER, T. **The effect of weight loss on C-reactive protein: a systematic review.** Archives of Internal Medicine. v. 167, p. 31–39, 2007.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. **Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation.** Journal of lipid research. v. 48, n. 6, p. 1253–62, jun. 2007.

SHADMAN, Z. et al. **Effect of conjugated linoleic acid and vitamin E on glycemic control, body composition, and inflammatory markers in overweight type2 diabetics.** Journal of diabetes and metabolic disorders. v. 12, n. 1, p. 42, jan. 2013.

SHAH, T.; LEIK, C.; WALSH, S. **Neutrophil infiltration and systemic vascular inflammation in obese women.** *Reproductive Sciences.* v. 17, n. 2, p. 116–124, 2010.

SHI, H.; KOKOEVA, M.; INOUE, K. **TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.** *The Journal of Clinical Investigation.* v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. **Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice.** *BMC complementary and alternative medicine.* v. 6, p. 9, jan. 2006.

SINGLA, P.; BARDOLOI, A.; PARKASH, A. A. **Metabolic effects of obesity: A review.** *World journal of diabetes.* v. 1, n. 3, p. 76–88, 15 jul. 2010.

SMEDMAN, A. et al. **Conjugated linoleic acid increased C-reactive protein in human subjects.** *British Journal of Nutrition.* v. 94, n. 05, p. 791, 8 mar. 2007.

SOLONI, F. G. **Simplified manual method for determination of serum triglycerides.** *Clinical Chemistry.* v.17, n.6, p.531-534, 1971.

SURMI, B.; HASTY, A. **Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling.** *Future lipidology.* v. 3, n. 5, p. 545–556, 2008.

THIELECKE, F.; BOSCHMANN, M. **The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - a review.** *Phytochemistry.* v. 70, n. 1, p. 11–24, jan. 2009.

THOMAS, G. A et al. **Obesity, growth hormone and exercise.** *Sports medicine.* v. 43, n. 9, p. 839–49, 2013.

THURAIRAJAH, P. H. et al. **Orlistat (Xenical)-induced subacute liver failure.** *European journal of gastroenterology & hepatology.* v. 17, n. 12, p. 1437–8, dez. 2005.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. **Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.** Nature reviews. Immunology. v. 6, n. 10, p. 772–83, out. 2006.

TZIOMALOS, K.; KRASSAS, G. E.; TZOTZAS, T. **The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update.** Vascular health and risk management. v. 5, n. 1, p. 441–52, jan. 2009.

UCHIYAMA, F. et al. **Lepidium meyenii (Maca) enhances the serum levels of luteinising hormone in female rats.** Journal of ethnopharmacology. p. 1–7, 11 dez. 2013.

VISSER, M. et al. **Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults.** JAMA : the journal of the American Medical Association. v. 282, n. 22, p. 2131–35, 1999.

WANG, Y.; MONTEIRO, C.; POPKIN, B. **Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia.** The American journal of clinical Nutrition. v. 75, n. 8120, p. 971–7, 2002.

WEE, C.; MUKAMAL, K.; HUANG, A. **Obesity and C-reactive Protein Levels Among White, Black, and Hispanic US Adults.** Obesity. v. 16, n. 4, p. 875–880, 2008.

WIECEK, A. et al. **The adipose tissue: a novel endocrine organ of interest to the nephrologist.** Nephrology, dialysis, transplantation. v. 17, n. 2, p. 191–5, fev. 2002.

WIELINGA, P. Y. et al. **Arachidonic acid/docosahexaenoic acid-supplemented diet in early life reduces body weight gain, plasma lipids, and adiposity in later life in ApoE*3Leiden mice.** Molecular nutrition & food research. v. 56, n. 7, p. 1081–9, jul. 2012.

WOLFRAM, S.; WANG, Y.; THIELECKE, F. **Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench.** Molecular nutrition & food research. v. 50, n. 2, p. 176–87, fev. 2006.

WOODS, S. C. et al. **A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats.** The Journal of Nutrition. v. 133, n. 4, p. 1081–1087, 2003.

WU, H. et al. **T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity.** Circulation. v. 115, n. 8, p. 1029–38, 27 fev. 2007.

XU, J. et al. **Rapeseed oil fortified with micronutrients reduces atherosclerosis risk factors in rats fed a high-fat diet.** Lipids in health and disease, v. 10, n. 1, p. 96, jan. 2011.

YE, J. et al. **Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice.** American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism. v. 70808, p. 1118–1128, 2007.

YUN, J. **Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review.** Phytochemistry. v. 71, p. 1625–1641, 2010.

ZHANG, Y.; JAYAPRAKASAM, B. **Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by cabernet sauvignon grape skin compounds.** Journal of agricultural and food chemistry. v. 52, n. 2, p. 228–33, 28 jan. 2004.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética para realização dos experimentos com os camundongos

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 147-CEEA, sobre “*Avaliação dos efeitos de fármacos, de plantas medicinais, e alimentos funcionais sobre o estresse físico e psicogênico em animas normais e geneticamente modificados (CB57L/6J lep^{ob})*”, sob a responsabilidade de LUIZ CLAUDIO DI STASI, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *ad referendum* pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**.

Botucatu, 20 de outubro de 2009.



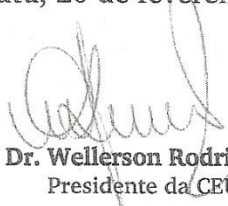
Profa. Dra. PATRÍCIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO
Presidente - CEEA

ANEXO B – Certificado do comitê de ética para realização dos experimentos com ratos

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 440-CEUA, sobre "Avaliação da atividade de produtos naturais na obesidade induzida por dieta hipercalórica", sob a responsabilidade de Luiz Claudio Di Stasi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 20 de fevereiro de 2013.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

ANEXO C – Laudo das análises do extrato de óleo de café verde



CHEMYUNION

Certificado de Análise

Produto	MELSCREEN COFFEE		
Lote	CN093-0610	Fabricação	08.06.2010
Pais Origem	BR	Validade	08.06.2012
Desc Química	Óleo obtido de grãos verdes de café (<i>Coffea arabica</i>).		

Análises	Unidades	Métodos	Especificações	Resultado
Aparência (25°C)		Visual	Líquido oleoso, límpido à levemente turvo	De acordo
Cor		Visual	Marron esverdeado à âmbar	De acordo
Odor		Organoléptico	Característico	De acordo
Índice de acidez	mg de KOH / g de am.	MA002CH	Max. 10,00	2,81
Índice de saponificação	mg de KOH / g de am.	MA003CH	140,00 - 190,00	167,50
Índice de peróxido	mEq O2/1000g de am.	MA021CH	Max. 12,00	1,64
Contagem Total Microorganismos Aero bios	UFC / ml de amostra	MA071CH	Max. 100	De acordo
Fungos e Leveduras	UFC / ml de amostra	MA074CH	Ausente	De acordo

OBSERVAÇÕES

Responsável CQ DAIANE BARROS

CRQ 04406318-IV Região

Analisado em 16.06.2010

Aprovado

Daiane Barros

Supervisora GQ ANA PAULA M.VILAR

CRQ 04251830 - IV Região

Garantia de Qualidade

Aprovado

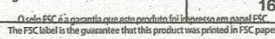
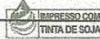
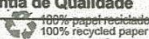
Ana Paula M. Vilar

APROVADO

Assinatura Eletrônica

0000000000000022120

16.06.2010



Fábrica e Atendimento ao Cliente: Rua José de Oliveira Cassu, 447 - Eden - Sorocaba - SP - Brasil - 18103-065 - Fábrica - Tel.: 15 2102-2000 - Fax: 15 2102-2002 - Tel.: 15 2102-2003 - Fax: 15 2102-2001 - email: vendas@chemyunion.com.br
Adm. Corporativa/ Export Sales: R. Dr. Samuel Porto, 351 - 10º andar - Saúde - SP/Brasil - 04105-4010 - Tel.: +55 11 2173-0100 - email: export@chemyunion.com.br - www.chemyunion.com.br