

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EFEITOS DE *Coffea arabica* SOBRE A
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA**

LAURA ORSI MACHADO

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**BOTUCATU – SP
2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EFEITOS DE *Coffea arabica* SOBRE A
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA**

ALUNA: LAURA ORSI MACHADO
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO DI STASI

Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

**BOTUCATU – SP
2011**

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

Machado, Laura Orsi.

Avaliação preliminar dos efeitos de *Coffea arabica* sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica / Laura Orsi Machado. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho acadêmico (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista; Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Farmacologia. 2. Óleo de café. 3. Obesidade.

Palavras-chave: Cafestol; Dieta hipercalórica; Obesidade; Óleo de café; Plantas medicinais.

Auxílio Financeiro



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Proc. 2010/03824-6

Epígrafe

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Alda e Antônio, e à minha irmã, Thais. Que me deram força, exemplo, amor e carinho e que sempre me incentivaram, permitindo a conquista de um dos meus sonhos.

“Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.”

Raul Seixas

Agradecimentos

À Deus, por toda a força, por nunca ter deixado faltar nada a mim e por ter me guiado em todos os momentos.

À família que eu pude escolher, Dona Cida e as meninas da República Albergue, que foram minhas amigas e companheiras durante esses cinco anos, dividindo comigo os piores e melhores momentos da faculdade e que vão estar pra sempre no meu coração.

Aos meus amigos da Turma XLIII da Biologia Integral, por todos os momentos passados juntos, pelas aulas, trabalhos, churrascos, viagens, festas e tudo mais que dividimos durante a graduação e que deixarão muita saudade.

Ao pessoal do laboratório LaFit, Adriana, Leonardo, Ana, Patrícia, Aline, Alexandre (Pênis), Luiz, Alexandre (Kita), Ju Severi, Ju Checon, Juliana, Fabiana, Adriano e Tarina, pela amizade, companheirismo, pelas risadas e principalmente por todos os ensinamentos que me passaram e pela paciência que tiveram em me ensinar. Grandes amigos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, por toda ajuda e companheirismo.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro.

Ao Orientador

Agradeço ao Prof. Luiz Claudio Di Stasi por ter me dado a oportunidade de crescer profissional e pessoalmente, abrindo as portas de seu laboratório. Por todo o conhecimento e ensinamento transmitidos, pela confiança, pela paciência, pelos conselhos e pela amizade.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Sumário

PRÓLOGO	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 OBESIDADE	5
1.2 PLANTAS MEDICINAIS (ÓLEO DE CAFÉ VERDE)	6
1.3 DIETA HIPERCALÓRICA	8
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE:	10
3.1.1 <i>Animais</i>	10
3.1.2 <i>Indução de obesidade</i>	10
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO	13
3.3 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE:.....	14
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA	17
4.2 ANÁLISE DO TRATAMENTO COM O ÓLEO DE CAFÉ VERDE	20
5 CONCLUSÃO	24
6 REFERÊNCIAS	24

Índice de Figuras

Figura 1: Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento.....	18
Figura 2: Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas. * Diferença significativa em relação ao grupo dieta normocalórica, $p < 0.05$	19
Figura 3: Efeito do tratamento com óleo de café (<i>Coffea arabica</i>) no peso dos animais (Δ peso). * Diferença significativa em relação ao grupo de animais obesos, $p < 0,05$. ** Diferença significativa em relação ao grupo animais obesos, $p < 0,01$	21
Figura 4: Média de consumo dos diferentes grupos experimentais durante 21 dias após a indução de obesidade.....	22

Índice de Tabelas

Tabela 1: Macronutriente e micronutrientes da ração (%).	11
Tabela 2: Perfil de aminoácidos das rações (%).	12
Tabela 3: Perfil de carboidratos das rações (%).	12
Tabela 4: Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%).	13
Tabela 5: Perfil químico do óleo de café verde.	14
Tabela 6: Variação do peso corpóreo dos animais de diferentes grupos experimentais.	20
Tabela 7 : Variação do peso dos animais de diferentes grupos experimentais após 8 semanas de dieta a pós tratamento com o produto-teste. ¹ Variação do peso após 8 semanas de fornecimento de dieta. ² Variação do peso após tratamento com o produto teste, calculado em comparação ao último dia de fornecimento de dieta hipercalórica .	22
Tabela 8: Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais. * Diferença significativa em relação ao grupo de animais normais, $p < 0.01$	23

Prólogo

No decorrer desse trabalho de conclusão de curso fomos colocadas frente a alguns desafios descritos neste prólogo. O projeto apresentado é parte integrante de um auxílio regular da FAPESP (proc. 09/52471-1) intitulado: “*Impacto do estresse físico e psicogênico sobre a ingesta alimentar, ganho de peso e aparência geral da pele: modulação nutrigenômica, proteômica e metabolômica por extratos de plantas e alimentos funcionais.*”. O trabalho, também vinculado com a empresa Chemyunion Química LTDA, tem como objetivo avaliar a atividade de quatro plantas, entre elas a *Coffea arabica*, em animais obesos e posteriormente submetidos ao estresse físico e psicogênico; com o intuito de observar os efeitos dessas plantas na obesidade, na prevenção ao estresse e na aparência geral da pele.

Dessa forma, a presente monografia se desenvolveu tendo como base estes objetivos, buscando padronizar prioritariamente um modelo de estresse, um modelo de obesidade, coletar dados para estudo da pele e analisar os efeitos do óleo *Coffea arabica* na obesidade, no estresse e na pele. Entretanto, os desafios enfrentados no início do projeto exigiram tempo e estudo para que os mesmos fossem resolvidos da melhor maneira, o que nos levou a concluir apenas a padronização dos modelos de estresse e obesidade, a análise do efeito do óleo de café verde na obesidade induzida por dieta hipercalórica e a coleta de dados para estudo dos efeitos do mesmo na pele e no estresse.

Desafios enfrentados: No início do ano tivemos um problema com a aquisição dos animais (camundongos das linhagens isogênicas C57BL/6 e C57BL/6J Lep^{ob} - animal obeso nocaute para leptina) de experimentação. Tais animais seriam fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), porém na época da solicitação dos animais, essa instituição

alegou não possuir os mesmos nas quantidades necessárias para a realização dos estudos propostos, pois sua produção estava sendo utilizada apenas pelos docentes e pesquisadores da própria Unicamp, sendo impossível atender a demanda externa. Sendo assim, buscamos alternativas para adquirir estes animais, mas todas as tentativas foram infrutíferas, visto que tal linhagem era escassa em todos os biotérios que entramos em contato.

Visto a dificuldade, optamos em utilizar uma metodologia de obesidade induzida por dieta enriquecida, utilizando-se camundongos da linhagem Swiss, disponíveis no Biotério Central da UNESP. Dessa forma, precisamos padronizar este modelo de obesidade em camundongos convencionais. Para esta padronização, foi utilizado como base o método descrito por Nascimento *et al.*, 2008.

Além do modelo de obesidade, também houve padronização do modelo de choque físico e psicogênico. Sendo assim, devo destacar que este foi um projeto de iniciação científica com uma importância além da minha formação como bacharel em Ciências Biológicas. Trata-se de um projeto que permitiu não apenas meu crescimento acadêmico, mas também pessoal, permitindo ainda a implantação de uma linhagem completamente nova no Laboratório de Fitomedicamentos, que poderá levar ao avanço nesta área de pesquisa e a utilização das técnicas por futuros alunos.

É importante ainda ressaltar que a padronização deste modelo de obesidade permitirá sua utilização em demais projetos de iniciação científica, mestrado e doutorado em fase de implantação em nosso laboratório e que os demais estudos, propostos inicialmente, estão sendo desenvolvidos e esperamos publicar seus resultados brevemente.

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. O uso de alimentos funcionais e de dietas adequadas 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 com a obesidade com um importante atrativo de que este esquema terapêutico é entendido como mais seguro e eficaz para a saúde que o tratamento com anorexígenos tradicionais. Este trabalho tem como objetivo desenvolver e padronizar modelos de ensaios biológicos em estresse e obesidade, visando também avaliar o efeito do óleo de grãos verdes de *Coffea arabica* na regulação do peso corpóreo e no balanço energético de camundongos. Para isso, foram feitas triagens *in vivo* deste produto e os estudos de seus efeitos no metabolismo energético em camundongos não obesos e com obesidade induzida por dieta hipercalórica. Após indução da obesidade por 8 semanas, os animais foram tratados por 21 dias com os extratos por via oral. Após os 21 dias os animais foram mortos para avaliação dos efeitos destes produtos sobre o consumo diário de ração e sobre o peso corpóreo. O grupo tratado com o óleo de *Coffea arabica* L. apresentou significativa perda de peso e o consumo de ração elevado. De acordo com os resultados, é possível concluir que o extrato padronizado de *Coffea arabica* L. promoveu redução do peso corpóreo sem promover diminuição na quantidade de alimento ingerido.

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. The use of functional foods and appropriate diets to call health promotion has grown as a mechanism for prevention, control and treatment of chronic diseases such as obesity. Several ethnopharmacological studies indicate plant species for the treatment of disorders associated with obesity with a major attraction of this regimen is perceived as safer and more effective health than the traditional treatment with appetite suppressants. This work aims to develop and standardize models of biological assays in stress and obesity, also aims to evaluate the effect of oil green beans of *Coffea arabica* in the regulation of body weight and energy balance in mice. To this end, trials were made *in vivo* studies of this product and their effects on energy metabolism in non-obese mice with obesity induced by hypercaloric diet. After induction of obesity by 8 weeks, animals were treated for 21 days with the extracts orally. After 21 days the animals were killed to evaluate the effects of these products on daily feed intake and on body weight. The group treated with the oil of *Coffea arabica* L. showed significant weight loss and feed intake high. According to the results, we conclude that the standardized extract of *Coffea arabica* L. decreased body weight without restriction or decrease the amount of food ingested.

1 Introdução

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença complexa, sendo caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode ser prejudicial à saúde (OMS, 2011), especialmente por estar associada a muitas outras doenças, principalmente, diabetes, hipertensão, artrite e doenças cardíacas (Yun, 2010). A obesidade é a forma mais comum de má-nutrição, contribuindo para o surgimento destas co-morbidades, decorrentes do excesso de peso corporal, do padrão alimentar inadequado e da resistência insulínica (Flegal *et al.*, 2002 *apud* Repetto *et al.*, 2003).

A incidência de obesidade tem aumentado em taxas alarmantes, tornando-se um problema de saúde mundial com incalculáveis custos sociais (Yun, 2010). Atualmente, a obesidade e o sobrepeso são considerados um dos maiores problemas de saúde pública do mundo e estão avançando de forma rápida e progressiva (Repetto *et al.*, 2003). Em 2008, mais de um bilhão de adultos (maiores de 20 anos) apresentavam sobrepeso (OMS, 2011). Nos Estados Unidos, a prevalência de obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) em mulheres adultas é de 33,4% e, em homens, 27,5% (Drenick, *et al.*, 1980 *apud* Repetto *et al.*, 2003) e no Brasil, segundo dados do inquérito nacional de 1997, a prevalência está em torno de 12,4% para mulheres e 7,0% para homens. Quando se inclui também os casos de sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) estes valores elevam-se para 38,5% dos homens e 39% das mulheres (Repetto *et al.*, 2003).

Trata-se de uma epidemiologia preocupante, visto que a obesidade está vinculada a diversas co-morbidades e pode levar a outras doenças. Dados da Organização Mundial de Saúde, revelam que pelo menos 2.8 milhões de adultos morrem por ano como resultado do sobrepeso ou da obesidade. Além disso, 44% dos casos de diabetes, 23%

dos casos de doenças cardíacas isquêmicas (infartos), e entre 7 a 41% de cânceres são atribuídos ao sobrepeso e obesidade (OMS, 2011).

Atualmente, tal doença é tratada com o uso de duas diferentes drogas do mercado (Chaput *et al.*, 2007), uma delas é o orlistat (Xenical[®]), que reduz a absorção intestinal de gordura através da inibição da lipase pancreática (Ballinger & Peikin, 2002; Drew *et al.*, 2007; Hutton & Fergusson, 2004). A outra é a sibutramina (Reductil[®]), uma substância anoréxica, ou supressora do apetite (Lean, 2001; Tziomalos *et al.*, 2009). Ambas as drogas apresentam efeitos adversos, incluindo hipertensão (aumento da pressão sanguínea), xerostomia (boca seca), constipação, cefaleia (dor de cabeça) e insônia (de Simone & D'Addeo, 2008; Slovacek *et al.*, 2008).

Devido à insatisfação com os altos custos e com os efeitos colaterais dos medicamentos atuais, a busca de novos produtos que sejam mais seguros e eficazes no tratamento da obesidade torna-se necessária.

1.2 Plantas Medicinais (Óleo de café verde)

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Fabricant & Farnsworth, 2001; Veiga Jr *et al.*, 2005; Gurib-Fakim, 2006).

De modo geral, existe um grande interesse público no uso de compostos de origem natural, os quais atualmente caracterizam um mercado que movimenta bilhões de dólares anualmente (Heber, 2003). As plantas têm desempenhado um significativo papel na manutenção da saúde humana e melhora da qualidade de vida por milhares de

anos, como uma fonte valiosa de componentes para temperos, bebidas, cosméticos e medicamentos (Heber, 2003).

Recentemente, estudos com plantas medicinais adquiriram atração para o tratamento de várias doenças metabólicas, incluindo a adiposidade, complicações do diabetes e doenças cardiovasculares, devido às limitações dos medicamentos existentes e de seus efeitos colaterais (Holman *et al.*, 1991 *apud* Gumy *et al.*, 2009). O reino vegetal é um vasto campo para pesquisar agentes naturais eficazes e com efeitos colaterais leves (Gumy *et al.*, 2009).

Uma variedade de produtos naturais, incluindo extrato bruto e compostos isolados de plantas, pode induzir redução do peso corporal e prevenir a obesidade induzida por dieta. (Han *et al.*, 2005; Moro & Basile, 2000; Rayalam *et al.*, 2008 *apud* Yun, 2010). Dessa forma, vários levantamentos etnofarmacológicos indicam espécies vegetais para o tratamento de distúrbios relacionados à obesidade com o principal atrativo de que este esquema terapêutico é entendido como mais seguro e eficaz para a saúde do que o tratamento com anorexígenos tradicionais (Heber, 2003).

Dentre as espécies vegetais indicadas podemos citar o café (*Coffea arabica*) que é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Estudos científicos têm revelado que o café e a cafeína desempenham um papel preventivo contra várias doenças degenerativas da sociedade moderna (Shimoda *et al.*, 2006). Em adição, nota-se que o café também tem uma rica história médica, sendo que os benefícios terapêuticos do café são agora suportados por um nível de crescimento rápido e significativo da validação científica (Bisht & Sisodia, 2010).

O café é rico em uma variedade de substâncias biologicamente ativas (Gumy *et al.*, 2009). Dentre elas, a mais conhecida e estudada é a cafeína (Wheatley, 2005; Namba & Matsuse, 2002; Gross *et al.*, 1996 *apud* Pereda, 2009). Estudos relatam que o

consumo moderado de café ajudou a reduzir o risco de diabetes do tipo II (Van Dam & Feskens, 2002); que a cafeína promove a lipólise em ratos (Fredholm & Lindgren, 1984 *apud* Shimoda, 2006) e a despesa de energia em humanos (Arciero *et al.*, 1995 *apud* Shimoda *et al.*, 2006).

O óleo de café verde utilizado no presente estudo não possui cafeína, contudo possui substâncias igualmente importantes em sua composição, sendo padronizado em cafestol, kawool e tocoferóis. Sendo assim, estudos mostram que os diterpenos cafestol e kahweol são indicados como anti-inflamatórios e atuam como agentes quimioprotetores (Cavin *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004), enquanto que os tocoferóis presentes neste óleo são reconhecidos pelos seus efeitos protetores da pele, prevenindo doenças inflamatórias, assim como o desenvolvimento do envelhecimento cutâneo (Nakayama *et al.*, 2003; Boelsma *et al.*, 2001).

Com base no exposto, é clara a necessidade de estudos voltados para obtenção de novos produtos de interesse terapêutico, seja de novos fármacos ou de fitoterápicos padronizados, para o tratamento de diversas doenças, dentre as quais podemos destacar a obesidade e suas co-morbidades. Neste sentido, diante das observações relatadas, este trabalho propõe avaliar o efeito do óleo de grãos verdes de *Coffea arabica* na regulação do peso corpóreo e no balanço energético de camundongos. A escolha desse produto deve-se à presença de diferentes constituintes que apresentaram em estudos prévios efeitos potencialmente benéficos para a melhora do aspecto geral da pele, e do metabolismo por diferentes mecanismos de ação.

1.3 Dieta hipercalórica

Atualmente, é incontestável que a nutrição desempenha papel predominante no gerenciamento da saúde, aspecto que permitiu a descoberta tanto da importância de

certos nutrientes essenciais, como também das quantidades específicas de cada nutriente necessárias para a manutenção da saúde (Mutch *et al.*, 2005). Reconhece-se que a maioria das doenças que afetam a espécie humana, assim como seu processo de envelhecimento e respectivas manifestações estéticas, incluindo a obesidade, são minimizados por mudanças no estilo de vida, como alimentação balanceada, bem-estar, prática de atividades físicas, entre outros hábitos (Milner,2004).

Dessa forma, o estilo de vida sedentário e a má alimentação, predominantes no mundo atual, desempenham um papel significativo no desenvolvimento da obesidade (Kumari *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação positiva entre a ingestão de gordura na dieta e a obesidade. A ingestão de gordura na dieta muitas vezes é apontada como responsável pelo aumento da adiposidade. Estudos em países como China, Canadá e os EUA têm demonstrado que, quando a quantidade média de gordura na dieta aumenta, a incidência de obesidade também aumenta (George *et al.*, 1990; Tucker & Kano, 1992 *apud* Hariri & Thibault, 2010).

Sendo assim, a atual epidemia de obesidade do mundo é uma consequência da alta disponibilidade e consumo de dietas altamente energéticas, juntamente com uma redução no consumo de energia (Astrup *et al.*, 1994; Lissner & Heitmann, 1995 *apud* Nascimento *et al.*, 2008). Entretanto, estudos eficazes sobre as consequências da obesidade, em humanos, têm limitações éticas (Lubrano-Berthelieir *et al.*, 2003; Carroll *et al.*, 2004 *apud* Nascimento *et al.*, 2008). Fato que torna necessário o desenvolvimento de modelos experimentais dietéticos (Nascimento *et al.*, 2008).

Tendo em vista esse fato, pode-se dizer que para melhor entender e estudar doenças humanas, modelos animais são essenciais (Kanasaki & Koya, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de modelos experimentais de obesidade induzida em ratos e camundongos podem ser mais apropriados para estudar tal patologia (Nascimento *et*

al., 2008). Além disso, estudos já mostraram que dietas ricas em gordura induzem obesidade não apenas em humanos, mas também em animais (Hariri & Thibault, 2010).

Sendo assim, o presente estudo objetivou a padronização e o desenvolvimento de um modelo experimental de dieta hipercalórica em camundongos, baseado nos estudos de Nascimento *et al.*, 2008, e a utilização desse modelo para o estudo do efeito do óleo de *Coffea arabica* na obesidade.

2 Objetivos

Este trabalho propõe desenvolver e padronizar modelos de ensaios biológicos em estresse e obesidade, visa também avaliar o efeito do óleo de grãos verdes de *Coffea arabica* na regulação do peso corpóreo e no balanço energético de camundongos.

3 Material e Métodos

3.1 Padronização do modelo de obesidade:

3.1.1 Animais

Camundongos machos Swiss foram obtidos do Biotério Central da UNESP e alojados em estante ventilada com mini-isoladores de polissulfona (Alesco Ind. e Com. Ltda.) e filtração de ar de entrada e de saída constante, mantidos em sala climatizada sob a temperatura constante de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Após período de adaptação de uma semana, os animais receberam diferentes dietas, conforme descrito abaixo.

3.1.2 Indução de obesidade

Os animais foram divididos em dois grupos:

-DN (dieta normocalórica): animais que receberam a ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere[®]) por um período de 8 semanas. A ração padrão RC Focus 1765 foi composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico.

-DH (dieta hipercalórica): animais que receberam ração hipercalórica (RC Focus 2413 - chocolate, Agrocere[®]), por um período de 8 semanas. A ração hipercalórica RC Focus 2413 é constituída de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplementos mineral e vitamínico. A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hipercalórica, mensurada pela empresa Agrocere[®], está apresentada na Tabela 1. Os perfis de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1: Macronutriente e micronutrientes da ração (%).

Componentes	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7
Calorias (kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

Tabela 2: Perfil de aminoácidos das rações (%).

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hiperclórica
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,39	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

Tabela 3: Perfil de carboidratos das rações (%).

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hiperclórica
Rafinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Ramnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%).

Ácidos Graxos	Rações	
	Padrão	Hiperclórica
Capróico (c6:0)	0,00	0,02
Caprílico (c8:0)	0,03	0,03
Cáprico (c10:0)	0,02	0,05
Láurico (c12:0)	0,33	0,25
Mirístico (c14:0)	0,30	0,33
Palmítico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Esteárico (c18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (c16:1)	0,06	0,15
Oléico (c18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (c18:2n6c)	47,10	40,83
α -Linolênico (c18:3n3)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

Para ambos os grupos, a oferta de ração e água corrente foi sem restrições. Todos os animais foram pesados e o consumo de ração foi medido diariamente.

Após 8 semanas, os camundongos da ração hiperclórica que apresentaram o ganho de peso (Δ_{peso}) maior ou igual a 13 foram classificados como obesos e utilizados nas etapas subsequentes do projeto.

3.2 Obtenção do extrato padronizado

Óleo de café verde:

O Óleo de Café Verde (OC), de nome comercial MELSCREEN COFFEE EL DEO[®] foi fornecido pela empresa Chemyunion Química Ltda. (Sorocaba, SP, Brasil), e obtido através de um processo de prensagem a frio de grãos selecionados de café verde orgânico, devidamente certificado pela ECOCERT S. A.

A análise quantitativa da composição química do OC foi realizada pela Chemyunion Química Ltda. A análise da composição graxa do OC foi realizada por

cromatografia gasosa (CG). O conteúdo de palmitato de cafestol foi determinado por CLAE/HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Os compostos químicos do OC demonstraram o perfil indicado na Tabela 5.

Tabela 5: 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 linoleico	35,0 – 48,0
Ácido linolênico	0,1 – 3,0
Ácido araquídico	2,0 – 5,0
Palmitato de cafestol	10,0 – 20,0

O OC foi solubilizado em 92 partes de metil-celulose a 1% e 8 partes de tween 80 e administrado por via oral.

3.3 Padronização do modelo de estresse:

O protocolo do estresse físico e psicogênico foi definido após pesquisas e discussões de artigos (Shanks *et al.*, 1990; Katayama *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008; Sim *et al.*, 2010; Golub *et al.*, 2011). E foi padronizado da seguinte forma: a indução do estresse por choque inescapável e psicogênico foi realizada em caixa de esquiva apropriada (50 x 25 x 30 cm) similar à descrita por Malacrida *et al.*, 1997.

No modelo de choque inescapável, os animais foram colocados individualmente na caixa e após 3 minutos de adaptação foram submetidos a uma sessão de 30 choques

de 0,5 mA por 2 segundos sem possibilidade de fuga, com intervalos entre choques aleatórios entre 5 e 25 segundos.

No modelo de choque psicogênico, os animais foram colocados em uma caixa em frente àquela em que os animais foram submetidos ao choque inescapável, para que o animal testemunha pudesse ouvir os sons e observar o comportamento dos animais submetidos ao choque.

3.4 Delineamento experimental

Para definir a dose do extrato a ser utilizado, levou-se em consideração a quantidade de ingestão de dietéticos por humanos, que é, usualmente, de 50 mg/kg, dessa forma decidiu-se testar, preliminarmente, as doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Nesta etapa do projeto, referente a este trabalho de conclusão de curso, foi utilizado apenas o tratamento na dose de 100 mg/Kg.

O tratamento se iniciou apenas após o processo de indução de obesidade (8 semanas). Os animais receberam os respectivos tratamentos durante 21 dias antes da indução do estresse físico ou psicogênico.

Os animais dos grupos não tratados com o extrato receberam somente o veículo via oral durante o mesmo período. Os grupos *pair feeding* sofreram restrição de 30% da dieta, que foi calculada pela média de consumo de ração dos respectivos grupos controles, conforme discriminado abaixo. Os outros grupos receberam ração e água *ad libitum*. O consumo de ração e o peso dos camundongos foram monitorados diariamente.

Os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos:

- Animais não tratados:

Grupo 1 - animais Swiss não obesos (n= 10);

Grupo 2 - animais Swiss obesos (n= 22);

Grupo 3 - (*Pair feeding*) - animais Swiss obesos com restrição de dieta (70% da média de consumo do grupo 2) (n= 24);

- Grupo Tratado:

Grupo 4 - animais Swiss obesos tratados com óleo de café verde (n= 24);

O protocolo experimental, foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Protocolo 147-CEEA.

No 22º dia os animais foram mortos. Aproximadamente 2 mL de sangue foram coletados e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos para sua coagulação. Após esse período o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 4400 r.p.m. O soro separado foi armazenado a -80° C para análises bioquímicas posteriores. Coração, pulmão, baço, testículos, rins, cérebro e hipotálamo foram retirados, pesados e armazenados em solução fixadora (ALFAC). Os órgãos que apresentaram significativas diferenças estatísticas em relação ao peso foram submetidos à análise histopatológica.

Uma amostra de pele do dorso de cada camundongo foi retirada para análise histológica e foi armazenada em uma solução fixadora composta de álcool 80%, formaldeído e ácido acético (ALFAC – 18(v):2(v):1(v)). Além disso, foram coletadas amostras de tecido adiposo visceral, armazenadas a -80°C em criotubos com 300µl de Trizol para posterior extração do RNA total e avaliação da expressão gênica. Uma amostra do tecido adiposo também foi retirada e armazenada em ALFAC para análise histológica. O hipotálamo dos animais foi retirado e foram coletadas amostras para análises histológicas (armazenadas em ALFAC) e de expressão gênica (armazenado a -80°C em 200µl de Trizol).

3.5 Análise estatística

Dados paramétricos foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett. Dados não paramétricos (escala microscópica) foram expressos na forma de mediana (range) e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de Dunn. Todas as análises foram feitas pelo software *GraphPad Instat* com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4 Resultados e discussão

4.1 Avaliação da obesidade induzida por dieta hipercalórica

No processo de indução de obesidade por dieta hipercalórica os dois grupos de animais (dieta normocalórica e dieta hipercalórica) tiveram o consumo de ração mensurado diariamente (Figura 1).

Neste trabalho o grupo de dieta hipercalórica não apresentou um consumo reduzido quando comparado ao grupo de dieta normocalórica (Figura 1). Diferente do que ocorreu em outros trabalhos como de Nascimento *et al.*(2008) e Nascimento (2011), nos quais o grupo hipercalórico teve menor ingestão alimentar do que o grupo normocalórico, devido ao maior nível calórico da ração. Isso pode ter sido ocasionado pelo fato de a dieta hipercalórica possuir um aromatizante, no caso, de chocolate, que dá à ração aroma e sabor mais atraente do que o da ração normocalórica, aumentando assim a ingestão de ração pelos camundongos com dieta hipercalórica.

Como dito, não houve diferença significativa no consumo de ração entre os dois grupos, porém a partir da quarta semana, os animais do grupo hipercalórico tiveram um consumo, tendenciosamente maior, porém não significativo, comparado aos animais do grupo dieta normocalórica, visto que o esperado seria uma redução no consumo de dieta hipercalórica devido ao alto teor de calorias na ração.

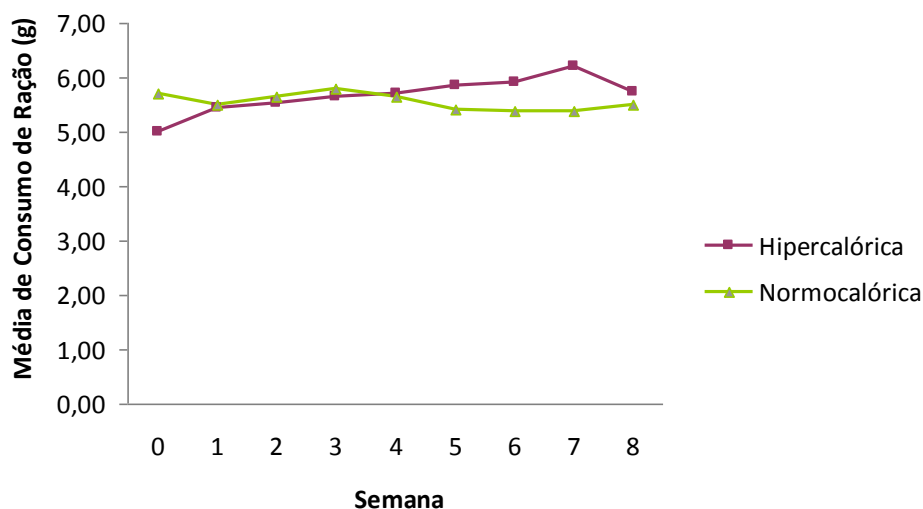


Figura 1: Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento.

A figura 2 mostra que, como resultado deste alto consumo pelo grupo, concomitantemente com a composição mais calórica da ração, a dieta hipercalórica tornou os camundongos do grupo hipercalórico obesos, como era esperado, induzindo o ganho de peso com diferenças significativas a partir da terceira semana de dieta.

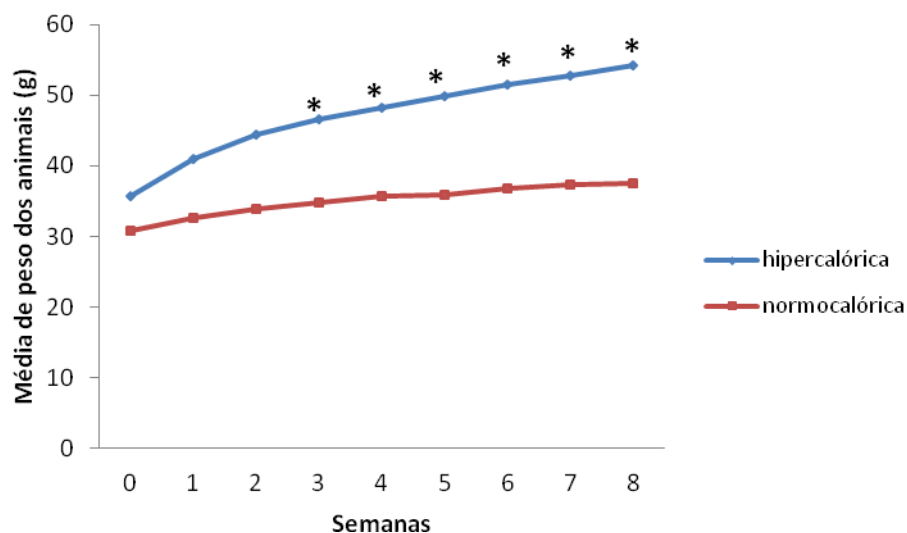


Figura 2: Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas. * Diferença significativa em relação ao grupo dieta normocalórica, $p < 0.05$.

Na oitava semana, a diferença de peso médio dos animais tratados com dieta hipercalórica em relação aos animais tratados com dieta normocalórica foi de 16,59 g, ou seja, os animais estavam 44% acima do peso dos animais normais. Conforme relatado por Hariri & Thibault (2010), há um consenso entre os pesquisadores de que diferenças de 10-25% de peso corporal maior que os animais normais são consideradas como uma obesidade moderada, enquanto que um ganho de peso maior que 40% é considerado como um caso de obesidade severa. Com base neste estudo, assim como em outros estudos recentes (He *et al.*, 2010; Dean *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2007; Pitombo *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2003; Van Heek *et al.*, 1997), podemos considerar que a metodologia que utilizamos neste projeto permitiu a indução de obesidade após o fornecimento da dieta hipercalórica pelo período de 8 semanas, menor que o período utilizado pelos pesquisadores citados acima, que normalmente necessitam de 10-12 semanas para atingir uma diferença de ganho de peso superior a 40%.

Considerando-se valores absolutos, os animais que receberam dieta normocalórica apresentaram uma média de peso corpóreo no primeiro dia de fornecimento da dieta de 30.8 ± 1.0 g e após 8 semanas de dieta normocalórica atingiram o peso médio final de 37.6 ± 1.4 g, com uma variação total de peso de 6.8 (Δ peso). No grupo dos animais que receberam dieta hipercalórica, o peso médio inicial foi de 34.2 ± 1.0 g, enquanto que o peso médio final foi de 52.3 ± 1.4 g, com um Δ peso de 18.1 (Tabela 6), confirmando a indução de obesidade com o uso da dieta padronizada e utilizada no presente projeto.

Tabela 6: Variação do peso corpóreo dos animais de diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Peso inicial (g)	Após 8 semanas (g)	Δ peso (g)
Animais normais	$30,8 \pm 1,0$	$37,6 \pm 1,4$	6,8
Animais obesos	$34,2 \pm 1,0$	$52,3 \pm 1,4$ *	18,1

* Diferença significativa em relação ao grupo de animais com dieta normocalórica, $p < 0.05$.

Dessa forma, os animais que tiveram esta diferença de ganho de peso foram selecionados como obesos, enquanto os animais da dieta normocalórica foram selecionados como controle não obeso. Os experimentos seguiram então com os animais escolhidos de acordo com suas diferenças de peso corpóreo.

4.2 Análise do tratamento com o óleo de café verde

Após os 21 dias de tratamento com o produto pudemos observar que a partir do 19º dia de tratamento o grupo tratado com o óleo de café verde mostrou uma redução significativa do peso corpóreo (Figura 3). Nota-se ainda que o grupo *pair feeding* apresentou um peso corporal inferior a todos os grupos devido à restrição de dieta.

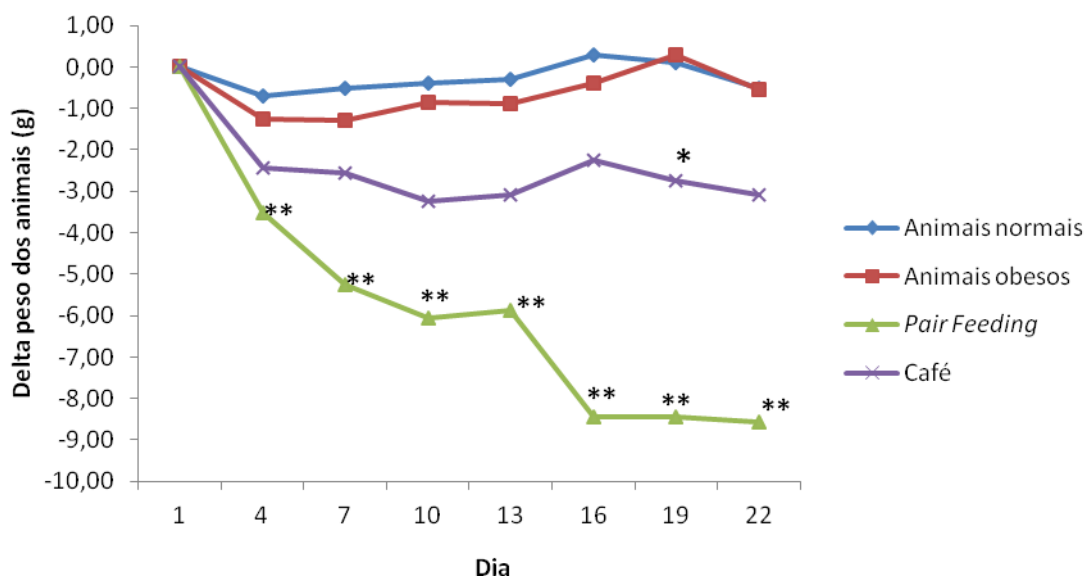


Figura 3: Efeito do tratamento com óleo de café (*Coffea arabica*) no peso dos animais (Δ peso).
 * Diferença significativa em relação ao grupo de animais obesos, $p < 0,05$.
 ** Diferença significativa em relação ao grupo animais obesos, $p < 0,01$.

Tendo em vista estudos anteriores (Kumari *et al.*, 2011; Jong Won Yun, 2010; Bisht & Sisodia, 2010; Gumy *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Shimoda *et al.*, 2006; Van Dam & Feskens, 2002; Acheson *et al.*, 1980), que já indicavam o café como potencial redutor de peso e também como preventivo para diabetes do tipo II, tal resultado já era esperado. Entretanto, a maioria desses estudos cita como principal princípio ativo do café a cafeína, componente não presente no óleo de café estudado neste projeto. Sendo assim, os componentes presentes no óleo de café verde estudado: cafestol, kaweol e tocoferóis, ainda precisam ser mais bem estudados, correlacionando seus efeitos com os possíveis mecanismos de ação na obesidade.

Podemos ainda notar que o produto MELSCREEN COFFEE EL DEO® não reduziu a ingesta alimentar quando comparado aos outros grupos (Figura 4). Indicando

que o óleo de café verde não é um produto anorexigênico, pois apresenta redução do peso sem interferir no consumo de ração pelos animais.

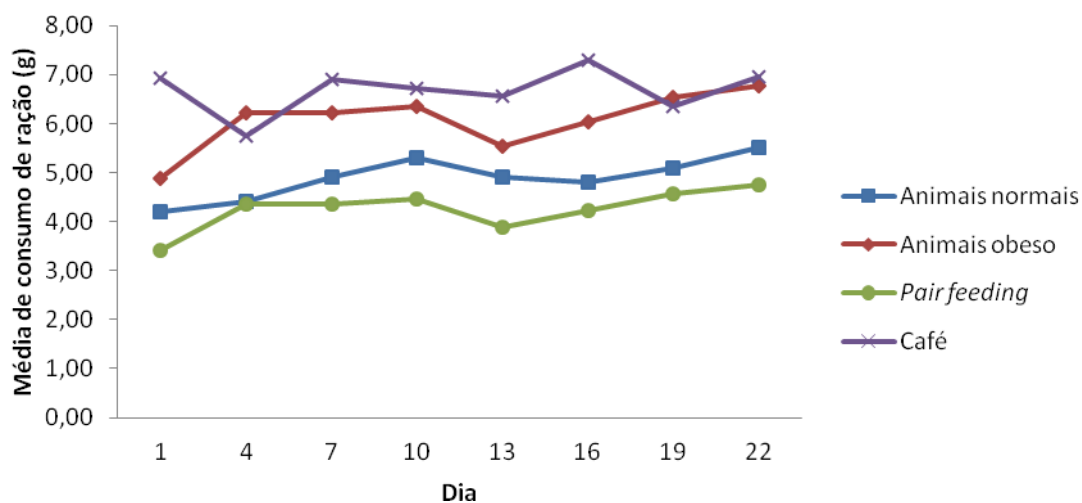


Figura 4: Média de consumo dos diferentes grupos experimentais durante 21 dias após a indução de obesidade.

A Tabela 7 mostra a variação do peso dos animais durante todo o procedimento experimental. Nesta tabela verifica-se claramente que a dieta hipercalórica utilizada garantiu a indução de obesidade promovendo um ganho de peso médio de 18.1 g comparando-se com o ganho médio de peso de 6.8 g dos animais tratados com a dieta normocalórica. Após o tratamento, verifica-se claramente que ocorreu redução no ganho de peso dos animais tratados com o óleo de café.

Tabela 7: Variação do peso dos animais de diferentes grupos experimentais após 8 semanas de dieta após tratamento com o produto-teste. ¹ Variação do peso após 8 semanas de fornecimento de dieta. ² Variação do peso após tratamento com o produto teste, calculado em comparação ao último dia de fornecimento de dieta hipercalórica

Grupos experimentais	Peso inicial (g)	Após 8 semanas (g)	Δ peso ¹ (g)	Após tratamento	Δ peso ² (g)
Animais normais	30,8 ± 1,0	37,6 ± 1,4	6,8	36,8 ± 1,6	-0,8
Animais obesos	34,2 ± 1,0	52,3 ± 1,4 *	18,1	51,5 ± 1,4	-0,8
Pair-feeding	35,1 ± 1,3	54,0 ± 1,3 *	18,9	43,0 ± 1,5 **	-11,0
Animais obeso + Café	36,4 ± 0,7	55,0 ± 0,8 *	18,6	52,0 ± 1,6	-3,0

Entretanto, apesar dos efeitos positivos do produto teste em relação ao peso corpóreo, o óleo de café verde também apresentou efeito no fígado dos camundongos que receberam o tratamento. Sendo que estes apresentaram um aumento no peso do fígado significativo quando comparado com os outros grupos, como podemos observar na Tabela 8. Os demais órgãos não apresentaram diferença de peso quando comparados com o grupo controle (animais normais).

Tabela 8: Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Fígado (g)	Baço (g)	Rins (g)	Coração (g)	Pulmão (g)	Testículo (g)	Cérebro (g)	Hipotálamo (g)
Animais normais	12,92 ± 0,09	3,48 ± 0,13	7,11 ± 0,46	3,87 ± 0,19	4,95 ± 0,38	4,35 ± 0,11	6,00 ± 0,11	1,10 ± 0,04
Animais obesos	12,36 ± 0,12	3,12 ± 0,12	6,00 ± 0,08	3,60 ± 0,07	4,83 ± 0,28	4,20 ± 0,08	5,21 ± 0,11	0,93 ± 0,03
<i>Pair-feeding</i>	11,60 ± 0,09	2,80 ± 0,11	5,97 ± 0,06	3,85 ± 0,08	5,28 ± 0,18	4,44 ± 0,09	5,67 ± 0,09	0,94 ± 0,04
Animais obeso + Café	13,31 ± 0,11*	3,33 ± 0,13	6,27 ± 0,11	3,84 ± 0,08	5,03 ± 0,22	4,16 ± 0,24	5,28 ± 0,11	0,95 ± 0,04

* Diferença significativa em relação ao grupo de animais normais, $p < 0.01$

Tal alteração indica uma possível toxicidade do óleo de café na dose de 100 mg/kg que pode afetar o fígado alterando seu peso. Alguns estudos (Weusten-Van der Wouw *et al.*, 1994; Urgert *et al.*, 1995, Tverdal & Skurtveit, 2003) indicam que os compostos cafestol e kawool, presentes neste produto, são responsáveis por aumentar o colesterol sérico e causar alterações no fígado, podendo alterar também as enzimas hepáticas, sendo este então um dos possíveis motivos da alteração de peso do fígado desses animais. Entretanto, ainda não podemos afirmar ser esta realmente a causa, pois estudos histológicos ainda estão sendo feitos para que se possa afirmar a verdadeira causa do aumento de peso do fígado.

5 Conclusão

O modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos aparentemente foi padronizado com sucesso, visto que os animais mostraram significativo ganho de peso corpóreo, sendo considerados obesos e podendo ser utilizados nas outras etapas do projeto.

Podemos ainda dizer que o óleo de café verde se apresentou como produto potencial no controle da obesidade induzida por dieta hipercalórica, apresentando redução significativa no peso corpóreo dos animais sem alterar a ingesta de alimento, indicando então que tal produto não possui ação anorexigênica ou supressora do apetite.

Dessa forma, estudos muito promissores podem ainda surgir a partir desses resultados, visando a busca por uma dose adequada para redução do peso corpóreo e ainda buscas para desvendar o mecanismo de ação do produto estudado no controle da obesidade.

6 Referências

- ACHESON, K. J.; ZAHORSKA-MARKIEWICZ, B.; PITTET, PH.; ANANTHARAMAN, K.; JÉQUIER, E. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. **Am. J Clin. Nutr.**, v. 33, p. 989-997, 1980.
- ARAÚJO, E.P.; SOUZA, C.T.; UENO, M.; CINTRA, D.E.; BERTOLO, M.B.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinol.**, v. 148, nº 12, p. 5991-5997, 2007.
- BALLINGER, A. & PEIKIN, S.R. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. **European Journal of Pharmacology**, v.440, p. 109– 117, 2002.
- BISHT, S. & SISODIA, S.S. *Coffea arabica*: A wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, nº 1, 2010.
- BOELSMA, E.; HENDRIKS, H.F.J.; ROZA, L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p. 853–864, 2001.

- CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; CONTABLE, A. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. **Carcinogen**, v. 19, p. 1369-1375, 1998.
- CHAPUT, J.P.; ST-PIERRE, S.; TREMBLAY, A. Currently Available Drugs for the Treatment of Obesity: Sibutramine and Orlistat. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 3-10, 2007.
- DAI, J.X.; HAN, H.L.; TIAN, M.; CAO, J.; XIU, J.B.; SONG, N.N.; HUANG, Y.; XU, T.L.; DING, Y.Q.; XU, L. Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. **PNAS**, v. 105, n° 33, p. 11981-11986, 2008.
- DE SIMONE, G. & D'ADDEO, G. Sibutramine: Balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 18, p. 337e341, 2008.
- DEAN, J.T.; TRAN, L.; BEAVEN, S.; TONTONOZ, P.; REUE, K.; DIPPLE, K.M.; LIAO, J.C. Resistance to diet-induced obesity in mice with synthetic glyoxylate shunt. **Cell Metabol.**, v. 9, p. 525-536, 2009.
- DREW, B.S.; DIXON, A.F.; DIXON, J.B. Obesity management: Update on orlistat. **Vascular Health and Risk Management**, v. 3, n° 6, p. 817-821, 2007
- FABRICANT, D. S. & FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, n° 1, p. 69-75, 2001.
- GOLUB, Y.; KALTWASSER, S.F.; MAUCH, C.P.; HERRMANN, L.; SCHMIDT, U.; HOLSBOER, F.; CZISCH, M.; WOTJAK, C.T. Reduced hippocampus volume in the mouse model of Post traumatic Stress Disorder. **J Psychiatr Res**, v. 45, n° 5, p. 650-659, 2011.
- GUMY, C.; THURNBICHLER, C.; AUBRY, E.M; BALAZS, Z.; PFISTERER, P.; BAUMGARTNER, L.; STUPPNER, H.; ODERMATT, A.; ROLLINGER, J.M. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by plant extracts used as traditional antidiabetic medicines. **Fitoterapia**, v. 80, p. 200-205, 2009.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol. Aspects Med.**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.
- HARIRI, N. & THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 270-299, 2010.
- HARRIS, R.B.S.; BOWEN, H.M.; MITCHELL, T.D. Leptin resistance in mice is determined by gender and duration of exposure to high-fat diet. **Physiology & Behavior**, v. 78, p. 543-555, 2003.
- HE, M.; SU, H.; GAO, W.; JOHANSSON, S.M.; LIU, Q.; WU, X.; LIAO, J.; YOUNG, A.A.; BARTFAI, T.; WANG, M.W. Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. **PLoS One**, v. 5, n° 12, e14205, 2010.
- HEBER, D. Herbal preparations for obesity: are they useful? **Prim Care**, v. 30, p. 441-463, 2003.
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, visitado em 19 de setembro de 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. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1461-8, 2004.

- JONG WON YUN. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemistry**, v.71, p. 1625–1641, 2010.
- KANASAKI, K. & KOYA, D. Review Article: Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, ID 197636, 2011.
- KATAYAMA, M.; AOKI, E.; SUZUKI, H.; KAWANA, S. Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a non-depilated mouse model. **Exp Dermatol**, v. 16, n° 7, p. 553-560, 2007.
- KIM, J.Y.; JUNG, K.S.; JEONG, H.G. Suppressive effects of the kawool and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **FEBS Lett**, v. 569, p. 321-326, 2004.
- KLAUS, S.; PÜLTZ, C.; THÖNE-REINEKE, C.; WOLFRAM, S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. **Int. J. Obesity**, v. 29, p. 615-623, 2005.
- KUMARI, P.; SINGH, N.; BHATIA, V.; CHAWLA; KUMAR, D. Herbal fight for obesity: A review. **International Journal Pharmaceutical Research & Development**, ISSN: 0974 – 9446, v. 3, n° 4, p. 193 – 201, 2011.
- MALACRIDA, S.A.; TEIXEIRA, N.A.; QUEIROZ, M.L. Hematopoietic changes in rats after inescapable and escapable shocks. **Immunopharmacol. Immunotoxicol**, v. 19, n° 4, p. 523-533, 1997.
- MEJ LEAN. How does sibutramine work? **International Journal of Obesity**, v.25, n° 4, p. 8–11, 2001.
- MILNER, J.A. Molecular targets for bioactive food components. **J Nutr**, v. 134, n° 9, p. 2492S-2498S, 2004.
- MUTCH, D.M.; WAHL, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of Nutrition. **FASEB J**, v. 19, n° 12, p. 1602-1616, 2005.
- NAKAYAMA, S.; KATOH, E.M.; TSUSUKI, T.; KOBAYASHI, S. Protective effects of alpha-tocopherol-6-O-phosphate against ultraviolet B-induced damage in culture mouse skin. **J Invest Dermatol**, v. 121, p. 406-411, 2003.
- NASCIMENTO, A.F.; SUGIZAKI, M.M.; LEOPOLDO, A.S.; LIMA-LEOPOLDO, A.P.; LUVIZOTTO, R.A.M.; NOGUEIRA, C.R.; CICOGNA, A.C. A Hypercaloric Pellet-Diet Cycle Induces Obesity and Co-Morbidities in Wistar Rats. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n° 6, p. 968-74, 2008.
- NASCIMENTO, T.B. Alterações cardiovasculares e desenvolvimento de obesidade em animais submetidos à dieta hipercalórica e estresse crônico. **Dissertação de Mestrado, Unesp – Botucatu**, 2011.
- PEREDA, M.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. **Tese de doutorado, Unicamp**, p. 191, 2009.
- PITOMBO, C.; ARAÚJO, E.P.; SOUZA, C.T.; PAREJA, J.C.; GELONEZE, B.; VELLOSO; L.A. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. **J. Endocrinol**, v. 191, p. 699-706, 2006.
- REPETTO, G.; RIZZOLLI, J.; BONATTO, C. Prevalência, Riscos e Soluções na Obesidade e Sobrepeso: Here, There, and Everywhere. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n° 6, 2003.
- SHANKS, N.; GRIFFITHS, J.; ZALCMAN, S.; ZACHARKO, R.M.; ANISMAN, H. Mouse strain differences in plasma corticosterone

- following uncontrollable footshock. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 36, n° 3, p. 515-519, 1990.
- 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, n° 9, 2006.
- SIM, Y.B.; PARK, S.H.; KANG, Y.J.; KIM, S.M.; LEE, J.K.; JUNG, J.S.; SUH, H.W. The Regulation of Blood Glucose Level in Physical and Emotional Stress Models: Possible Involvement of Adrenergic and Glucocorticoid Systems. **Arch Pharm Res**, v. 33, n. 10, p. 1679-1683, 2010.
- SLOVACEK, L., PAVLIK, V., SLOVACKOVA, B. The effect of sibutramine therapy on occurrence of depression symptoms among obese patients. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 18, p. 43 – 44, 2008.
- TANAKA, K.; NISHIZONO, S.; TAMARU, S.; KONDO, M.; SHIMODA, H.; TANAKA, J.; OKADA, T. Anti-Obesity and Hypotriglyceridemic Properties of Coffee Bean Extract in SD Rats. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 15, n° 2, p. 147 – 152, 2009.
- TVERDAL, A. & SKURTVEIT, S. Coffee Intake and Mortality from Liver Cirrhosis. **Annal of Epidemiology.**, v. 13, n. 6, p. 419-423, 2003.
- 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, p. 441–452, 2009.
- URGERT, R.; SCHULZ, A.G.M.; KATAN, M.B. Effects of cafestol and kahweol from coffee grounds on serum lipids and serum liver enzymes in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 61, p. 149-54, 1995.
- VAN DAM, R.M. & FESKENS, E.J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v. 360, p. 1477-1478, 2002.
- VAN HECK, M.; COMPTON, D.S.; FRANCE, C.F.; TEDESCO, R.P.; FAWZI, A.B.; GRAZIANO, M.P.; SYBERTZ, E.J.; STRADEER, C.D.; DAVIS JR, H.R. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 385-390, 1997.
- VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n° 3, p. 519-528, 2005.
- WEUSTEN-VAN DER WOUW, M.P.M.E.; KATAN, M.B.; VIANI, R.; HUGGETT, A.C.; LIARDON, R.; LUND-LARSEN, P.G.; THELLE, S.D.S.; AHOLA, I.; ARO, A.; MEYBOOM, S.; BEYNEN, A.C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. **J. Lipid Res.**, v. 35, p. 721-733, 1994.