



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Elaine dos Ramos Soares

Impacto da ingestão de farinha de jabuticaba em parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal em modelo murino de obesidade

Rio de Janeiro

2020

Elaine dos Ramos Soares

Impacto da ingestão de farinha de jabuticaba em parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal em modelo murino de obesidade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientador: Prof^o Dr. Julio Beltrame Daleprane

Co-orientadora: Prof^a Dra. Mariana Costa Monteiro

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

S676 Soares, Elaine dos Ramos.
Impacto da ingestão de farinha de jabuticaba em parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal em modelo murino de obesidade / Elaine dos Ramos Soares. – 2020.
91 f.

Orientador: Julio Beltrame Daleprane
Co-orientadora: Mariana Costa Monteiro
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Jabuticaba – Teses. 3. Obesidade – Teses. 4. Fenóis – Teses. I. Daleprane, Julio Beltrame. II. Monteiro, Mariana Costa III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Elaine dos Ramos Soares

Impacto da ingestão de farinha de jabuticaba em parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal em modelo murino de obesidade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em: 26 de outubro de 2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Uerj

Dra. Kim Ohanna Pimenta Inada
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a. Dra. Helen Hermana Miranda Hermsdorff
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Prof^a. Dra. Martina Rudnicki
Universidade de York

Prof^a. Dra. Vanessa de Souza Mello
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Uerj

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus
MEU TUDO.

AGRADECIMENTOS

A Deus que caminhou ao meu lado e que por muitas vezes me ouviu através de lágrimas. Obrigada Senhor por sempre falar ao meu coração e por mais que o meu lado humano muitas vezes prevaleça, obrigada por nunca me abandonar! Obrigada por ser minha força!

Ao meu querido orientador prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane, obrigada pelos 6 anos de intenso convívio, pela orientação, pela parceria, por confiar e acreditar em mim, por incentivar seus alunos a criar asas, pelas conversas, pela compreensão, pela generosidade. Seu conhecimento e sua experiência foram e serão sempre importantes e essenciais para minha caminhada pessoal e profissional.

A minha querida coorientadora prof. Dra. Mariana Costa Monteiro, pelo apoio e colaboração que foram de extrema importância para a concretização deste trabalho. Obrigada por tantos ensinamentos ao longo destes 4 anos.

Aos meus pais, Odete dos Ramos Soares e Marinho dos Santos Soares, que são os meus maiores exemplos de vida. Obrigada por toda a educação e por todos os valores que vocês me deram ao longo da minha vida.

À minha irmã, Viviane dos Ramos Soares, que cumpre com maestria seu papel de irmã e por ter me apresentado com a minha linda sobrinha, Luísa, que ilumina não só meus dias, mas os de toda a família.

À Aruanna Cajaty Soares, minha amiga que se intitula aluna (rsrs). O que seria deste doutorado sem você, sinceramente não sei. Obrigada por me ensinar tanto, pelas risadas, pela parceria, pelas conversas sérias e não tão sérias também. Obrigada por sua leveza. Nossa, quantos momentos indescritíveis e únicos vivemos juntas, né?! Levo você sempre no coração e conte comigo no que precisar!

À minha amiga-irmã, Elisa Bernardes Monteiro, pela parceria de seis anos de intenso convívio, pelos densos diálogos, por estar perto quando muitos se afastaram, por acreditar mais em mim do que eu mesma, pelas risadas, pelas reuniões nas redes sociais, por ser o meu oposto. Você é peça fundamental no quebra-cabeça da minha vida! Obrigada, obrigada e obrigada! Te amo!

Aos professores e alunos do Núcleo de Estudos de Nutrição e Fatores de Estresse por todos os seminários e conselhos que contribuíram de forma efetiva para o projeto e para minha formação acadêmica.

Aos professores Roberto Soares de Moura e Ângela de Castro Resende, por terem me recebido de braços abertos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais desde os tempos do mestrado.

À Prof. Dra Cristiane Aguiar da Costa, obrigada por todos os conselhos, pelas caronas, por todas as conversas, por me incentivar e por todo apoio desde 2014.

À Grazielle Freitas de Bem que sempre esteve ao meu lado em momentos pessoais e profissionais, me incentivando, me ajudando e principalmente me ensinando. Obrigada pela amizade, por me ouvir, pelos conselhos e pelas risadas. A sua força e a sua garra me inspiraram muito ao longo destes seis anos.

A todos os membros do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular (UERJ), por terem me recebido com amor e ternura e pelos ensinamentos para vida pessoal e acadêmica. Em especial agradeço à Prof. Dra. Vanessa de Souza Mello, à Fabiane Ferreira Martins e à Priscila Carapeto que estiveram comigo em diversos momentos e contribuíram de forma ativa para realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional. Tenho muito orgulho de conhecer pessoas iluminadas como vocês. Muito obrigada!

À Prof. Dra. Nathália Moura Nunes, obrigada por confiar em mim e no meu trabalho, por todos os conselhos, pelas caronas, por estar presente em um dos momentos mais difíceis da minha família, por todas as conversas e por sempre implantar a sementinha da curiosidade acadêmica em mim. Minha gratidão por ter conhecido você é imensurável!

À Kim Ohanna Pimenta Inada, obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo, pela parceria construída, por acreditar em mim, por estar comigo em momentos difíceis e me compreender, pelos conselhos e por nossa intuição mútua na vida. Você é uma inspiração!

Ao Prof. Dr. Benjamim P. Willing, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, na Universidade de Alberta no Canadá, por ter aberto um mundo de novas possibilidades e ter estimulado meu aprimoramento científico.

A todos os membros do laboratório coordenado pelo Dr. Willing, por terem me acolhido tão bem, pelos diálogos e seminários. Em especial agradeço à Camila e ao Andrew que foram essenciais para construção do meu aprendizado neste período, mas não posso esquecer de mencionar Pravina, Edward, Janelle, Hannah, Tingting, Carla, Natalie, Benjamin e Ymiao. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos canadenses-brasileiros Daniel Morais, Mario Dainez, Emanuele, Goes, Raytha Murillo, Raiany Andrade, obrigada por estarem nesta jornada comigo. Vocês são geniais e torço muito por cada um de vocês. Guardo vocês no meu coração e levo vocês para a vida!! Muito, muitíssimo obrigada por tudo!!!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPQ pelo financiamento do presente trabalho.

“Eis que estou convosco todos os dias, até o fim dos tempos.”

Mt 28,20

RESUMO

SOARES, E. R. Impacto da ingestão de farinha de jabuticaba em parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal em modelo murino de obesidade. 2020. 91 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A relação entre a obesidade, doença hepática gordurosa não alcoólica e a microbiota intestinal vem sendo objeto de estudo em diferentes campos da nutrição. A ingestão de compostos fenólicos tem sido relatada como benéfica por exercer múltiplos efeitos biológicos na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs). Desta forma, o presente estudo avaliou a influência do consumo de farinha de jabuticaba (JPSP) em modelo murino de obesidade induzido por dieta nos parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal. Camundongos machos adultos (C57BL/6) foram divididos em 5 grupos experimentais (n=16): grupo controle, grupo hiperlipídico (HF), e grupos hiperlipídicos acrescido de 5%, 10% ou 15% de JPSP nas dietas (HF-J5, HF-J10 e HF-J15, respectivamente). Após indução da obesidade (9 semanas) e intervenção com JPSP (4 semanas) foi avaliado a massa corporal, o consumo alimentar, os parâmetros bioquímicos plasmáticos, o remodelamento hepático, a metabolização de compostos fenólicos e o perfil da microbiota intestinal. O tratamento com 15% de farinha de jabuticaba atenuou o ganho de massa corporal dos animais. Observou-se, ainda, que o consumo de JPSP promoveu melhora significativa em parâmetros metabólicos associados à obesidade, como a inflamação, a dislipidemia e a resistência à insulina. Além disso, a intervenção com JPSP diminuiu a concentração de malondialdeído e aumentou a atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase no tecido hepático. O consumo de JPSP promoveu atenuação do remodelamento hepático, com menor percentual de esteatose hepática e menor deposição de fibras de colágeno, possivelmente relacionados não só a redução da massa e do volume hepático, como também menor concentração de triglicerídeo e colesterol hepático. As concentrações plasmáticas de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase demonstraram que o consumo de JPSP não promoveu toxicidade hepática, mesmo em sua maior concentração. A determinação dos metabólitos urinários derivados do ácido elágico consistiu em um importante marcador do consumo de fenólicos, evidenciando cinco metabólitos derivados do ácido elágico conjugados ao ácido glucurônico. Adicionalmente, houve efeito antimicrobiano e alteração na diversidade microbiana, bem como diminuição da endotoxemia metabólica, principalmente nos grupos que consumiram 10% e 15% de JPSP. O consumo da farinha de jabuticaba foi capaz de promover melhora de parâmetros metabólicos relacionados à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e suas comorbidades associadas. Tais achados podem estar relacionados à mudança na comunidade da microbiota intestinal, promovendo efeitos locais e sistêmicos, sendo consistentes com a proteção de alterações dos parâmetros metabólicos da obesidade.

Palavras-chave: Jabuticaba. Compostos fenólicos. Obesidade. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Composição da microbiota intestinal.

ABSTRACT

SOARES, E. R. Effects of jaboticaba powder ingestion on metabolic parameters and gut microbiota in a murine model of obesity. 2020. 91 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The interaction between obesity, non-alcoholic fatty liver disease, and the gut microbiota has been studied in different fields of nutrition. Phenolic compounds intake has been reported to be beneficial due to the multiple biological effects in preventing the development of chronic non-communicable diseases (NCDs). Thus, the present study evaluated the influence of jaboticaba peel and seed powder (JPSP) consumption in a murine model of diet-induced obesity on metabolic parameters and gut microbiota. Adult male mice (C57BL/6) were divided into 5 experimental groups (n = 16): control group, high-fat group (HF), and high-fat groups plus 5%, 10%, or 15% of JPSP in the diets (HF-J5, HF-J10, and HF-J15, respectively). After obesity induction (9 weeks) and intervention with JPSP (4 weeks), body mass, food intake, plasma biochemical parameters, liver remodeling, metabolism of phenolic compounds, and gut microbiota profile were evaluated. Treatment with 15% JPSP attenuated the animals' body mass gain. It was also observed that JPSP consumption promoted a significant improvement in metabolic parameters associated with obesity, such as inflammation, dyslipidemia, and insulin resistance. Besides, intervention with JPSP decreased the concentration of malondialdehyde and increased the glutathione peroxidase antioxidant activity in liver tissue. The consumption of JPSP promoted beneficial hepatic remodeling, with a lower percentage of fatty liver and less deposition of collagen fibers, possibly related to not only the reduction of liver mass and volume, as well as a lower concentration of hepatic triglyceride and cholesterol. The plasma concentrations of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase demonstrated that JPSP consumption did not promote liver toxicity, even in its highest concentration. The determination of urinary metabolites derived from ellagic acid was an important marker of phenolic consumption, showing five metabolites derived from ellagic acid conjugated to glucuronic acid. Additionally, there was an antimicrobial effect and changes in microbial diversity, as well as a decrease in metabolic endotoxemia, especially in groups that consumed 10% and 15% of JPSP. JPSP consumption was able to improve metabolic parameters related to obesity induced by a high-fat diet and its associated comorbidities. Such findings may be related to the change in the gut microbiota community, promoting local and systemic effects, being consistent with the protection of changes in the metabolic parameters of obesity.

Keywords: Jaboticaba. Phenolic compounds. Obesity. Non-alcoholic fatty liver disease. gut microbiome composition.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGL	Ácidos graxos livres
Akt	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Quinase ativada por AMP
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Area under the curve
CAT	Catalase
CBAs	Compostos bioativos em alimentos
CCl4	Tetracloroeto de carbono
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNL	<i>De novo lipogenesis</i>
DNPH	<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
FAS	<i>Fatty acid sintase</i>
FFAR	<i>Free fatty acid receptors</i>
FAF	<i>Fasting induced adipose factor</i>
FOXO	<i>forkheade</i>
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GPr	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSH	Glutaciona
GSK	Glicogênio sintase quinase
HCC	Hepatocarcinoma
HFD	<i>High fat diet</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HMG CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMG CoA-R	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
Ikk	quinase IKB

IL-6	Interleucina-6
IR	<i>Insulin receptor</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JNK	<i>Jun N-terminal quinase</i>
JPSP	<i>Jaboticaba peel and seed powder</i>
KJ	Kilojoules
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
mTORC1/S6K	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NcK	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i>
NFkB	<i>Nuclear fator kappa b</i>
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
PD	<i>Phylogenetic diversity</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PUFA	<i>Poly-unsaturated fatty acid</i>
RI	Resistência à insulina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i>
SFA	Saturated fatty acid
SH2	Domínio homólogo 2 ao Src
SOD	Super-óxido dismutase
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding proteins</i>
TA	Tecido adiposo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeo
TLR4	<i>Toll like receptors 4</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis fator alpha</i>
VLDL	<i>Very low density liprotein</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de desregulação do tecido adiposo.	19
Figura 2 -	Expansão do tecido adiposo.	20
Figura 3 -	Hipertrofia adipocítica induzindo alteração fenotípica de macrófagos em tecido adiposo.....	21
Figura 4 -	Regulação do metabolismo da glicose.	23
Figura 5 -	Mecanismos que promovem a resistência à insulina.	24
Figura 6 -	Progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica.	25
Figura 7 -	Esquema simplificado da síntese de ácidos graxos, da síntese de colesterol e da excreção de colesterol pela via biliar no fígado.....	27
Figura 8 -	Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir da molécula de oxigênio e atuação de enzimas antioxidantes.....	29
Figura 9 -	Esquema simplificado do impacto do consumo de dieta hiperlipídica na microbiota intestinal.....	31
Figura 10 -	Estrutura química dos compostos fenólicos.	36
Figura 11 -	Esquema do desenho experimental.	44
Figura 12 -	Consumo de ração em gramas, energia (KJ) e compostos fenólicos nos grupos experimentais.....	53
Figura 13 -	Padrão de fragmentação MS ² de metabólitos urinários de derivados de ácido elágico.....	54
Figura 14 -	Cromatograma representativo dos metabólitos urinários derivados do ácido elágico.	55
Figura 15 -	Evolução ponderal dos grupos experimentais.	56
Figura 16 -	Sensibilidade a glicose nos grupos experimentais.	57
Figura 17 -	Marcadores de estresse oxidativo hepático nos grupos experimentais.	59
Figura 18 -	Marcadores de dano hepático nos grupos experimentais.	60
Figura 19 -	Esteatose hepática nos grupos experimentais.....	61
Figura 20 -	Fibrose hepática nos grupos experimentais.....	62
Figura 21 -	Análise de coordenadas principais e índices de alfa diversidade nos grupos experimentais.	63
Figura 22 -	LPS plasmático, número de bactérias totais e razão firmicutes/bacteroidetes nos grupos experimentais.....	64
Figura 23:	Heat map do conteúdo cecal nos grupos experimentais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da farinha da jabuticaba.	41
Tabela 2 - Composição das dietas ofertadas aos animais.	41
Tabela 3 - Distribuição de macronutrientes e de energia das dietas ofertadas aos animais.	42
Tabela 4 - Lista de <i>primers</i> para PCR em tempo real.	51
Tabela 5 - Perfil de compostos fenólicos nas rações experimentais adicionadas de farinha de jabuticaba.	52
Tabela 6 - Identificação dos metabólitos urinários dos compostos fenólicos derivados do ácido elágico.	53
Tabela 7 - Metabólitos urinários derivados do ácido elágico nos grupos experimentais. .	55
Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e citocinas inflamatórias nos grupos experimentais.	58
Tabela 9 - Perfil microbiano do conteúdo cecal nos grupos experimentais.	66

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1	Obesidade e suas alterações metabólicas.....	16
1.1.1	Obesidade	16
1.1.2	Resistência à insulina	21
1.1.3	Doença hepática gordurosa não alcoólica	24
1.1.4	Microbiota intestinal.....	29
1.2	Papel da nutrição no controle e no tratamento da obesidade e comorbidades	32
1.3	Compostos fenólicos	35
1.4	Jabuticaba	37
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Rações experimentais	41
4.2	Perfil de compostos fenólicos das rações experimentais	42
4.3	Experimento <i>in vivo</i>	43
4.3.1	Consumo de ração, marcadores de consumo de compostos fenólicos e evolução ponderal.....	44
4.3.2	Teste oral e tolerância a glicose e eutanásia.....	45
4.3.3	Parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e citocinas inflamatórias.....	46
4.3.4	Marcadores de dano oxidativo	47
4.3.4.1	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	47
4.3.4.2	Carbonilação de proteínas	47
4.3.5	Atividade antioxidante enzimática	48
4.3.5.1	Atividade da catalase.....	48
4.3.5.2	Atividade da glutathione peroxidase (GPx)	48
4.3.6	<u>Concentração de triglicerídeos e colesterol hepático.....</u>	<u>49</u>
4.3.7	<u>Histologia do tecido hepático</u>	<u>49</u>

4.3.8	<u>Microbiota intestinal</u>	50
4.4	Análises estatísticas	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Perfil de compostos fenólicos das rações adicionadas de farinha de jabuticaba	52
5.2	Consumo de ração e marcadores de consumo de ácido elágico	52
5.3	Efeito do consumo da farinha de jabuticaba sobre a evolução ponderal	56
5.4	Efeito do consumo de JPSP sobre tolerância a glicose	56
5.5	Efeito do consumo da farinha de jabuticaba sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos, de lipídeos e marcadores inflamatórios	57
5.6	Efeito do consumo da farinha de jabuticaba sobre marcadores de estresse oxidativo hepático	58
5.7	Efeito do consumo da farinha de jabuticaba no remodelamento hepático	59
5.9	Efeito do consumo da farinha de jabuticaba na composição da microbiota intestinal	63
6	DISCUSSÃO	67
	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética	91

INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tornou-se a doença hepática crônica mais comum, concomitante à obesidade, cuja alta prevalência se transformou em um grande desafio à saúde pública em todo o mundo. Atualmente, o comprometimento hepático é considerado um mecanismo complexo com múltiplos fatores promovendo o desenvolvimento e a progressão da DHGNA, como resistência à insulina (RI), obesidade e alterações na composição da microbiota intestinal. Esses mecanismos estão intimamente relacionados a fatores ambientais, entre os quais a alimentação vem sendo objeto de estudo em diferentes campos da nutrição.

A alimentação consiste em um fator ambiental que vem despertando o interesse devido a potenciais atividades biológicas de nutrientes e de compostos bioativos (CBAs) presentes em diversas matrizes alimentares. O consumo de CBAs está relacionado ao menor risco de desenvolvimento de DCNTs. Os alimentos fontes desses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, destacando-se as frutas como uma das principais fontes dietéticas. Dentre as frutas, destaca-se a jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), fruta nativa da mata atlântica. Dentre os CBAs encontrados na jaboticaba, os compostos fenólicos merecem destaque por estarem presentes em quantidades expressivas e por apresentarem diversas propriedades benéficas à saúde, tais como atividade anti-inflamatória, melhora na sensibilidade à insulina, atenuação da dislipidemia, atividade antimicrobiana. Estas propriedades são atribuídas não só aos compostos fenólicos, mas também aos metabólitos destes que são gerados após passagem pelo trato gastrointestinal.

Desta forma, levando-se em consideração a influência que os compostos fenólicos exercem sobre a saúde, e a associação destes com as alterações metabólicas oriundas da obesidade e da microbiota intestinal, torna-se plausível a hipótese de que os compostos fenólicos presentes na farinha de jaboticaba consigam atenuar parâmetros metabólicos da obesidade associados a alterações na microbiota intestinal.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Obesidade e suas alterações metabólicas

1.1.1 Obesidade

A elevada prevalência da obesidade e de comorbidades associadas tornaram-se um grande desafio epidemiológico mundial (AFSHIN et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência de obesidade triplicou entre 1975 e 2016, ano no qual a estimativa da população adulta mundial obesa é de 13% (WHO, 2016). No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF, 2008-2009) mostrou que 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres apresentavam obesidade (IBGE, 2010). Já a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) apontou que o percentual de obesidade, classificada pelo índice de massa corporal maior ou igual a 30 kg/m², foi de 18,7% no sexo masculino e de 20,7% no sexo feminino no ano de 2018 (BRASIL, 2019).

A obesidade é uma doença complexa de etiologia multifatorial caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo (TA), resultante de um desequilíbrio prolongado entre ingestão e dispêndio energético, envolvendo fatores genéticos, fisiológicos, sociais e ambientais, estando fortemente associada à alimentação e ao estilo de vida (SHI et al., 2017).

O desequilíbrio na ingestão de macronutrientes, tanto para o excesso quanto para a escassez, vem sendo estudada em larga escala, devido à grande porcentagem de contribuição para alterações metabólicas que podem acometer um indivíduo (BODEN et al., 2015; HARIRI; THIBAUT, 2010). Dentre as dietas excedentes em macronutrientes, muita relevância tem sido dada à dieta hiperlipídica (HFD, do inglês *high fat diet*), já descrita como potencial promotora do maior acúmulo de lipídeos corporal, aumentando a adiposidade, podendo levar a quadros de obesidade acompanhada de alterações metabólicas, como hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), e DHGNA em modelos experimentais e em humanos (HARIRI; THIBAUT, 2010; VELÁZQUEZ et al., 2019).

Deve-se sempre ressaltar, contudo, que a composição de ácidos graxos da dieta exerce potencial efeito na regulação do peso corporal, na celularidade do tecido adiposo (volume e número de células adiposas) e nas alterações metabólicas presentes na obesidade (AILHAUD et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2017; MOUSSAVI; GAVINO; RECEVEUR, 2008). Estudos realizados com seres humanos mostraram que os ácidos graxos saturados (SFA do

inglês, *saturated fatty acid*) são mais obesogênicos que os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA do inglês, *polyunsaturated fatty acid*) (KIEN; BUNN; UGRASBUL, 2005; LAWTON et al., 2000; PIERS et al., 2003). Estudos experimentais sustentam esta afirmativa, mostrando maior acúmulo de gordura corporal em animais que consumiram SFA (BELL; SPENCER; SHERRIFF, 1997; SHILLABEER; LAU, 1994; SILVA et al., 2006; YAQOUB et al., 1995). Adicionalmente, o tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos parece influenciar na deposição de TG nos adipócitos. Os ácidos graxos de cadeia curta (C2:0-C4:0) e de cadeia média (C6:0-C12:0) são transportados diretamente para o fígado através do sistema porta, não dependendo da carnitina para entrar nas mitocôndrias e portanto, são mais oxidados e menos depositados no TA quando comparados aos ácidos graxos de cadeia longa (C14:0-C24:0) (MOUSSAVI; GAVINO; RECEVEUR, 2008; SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2016; TAKEUCHI et al., 2008). Em modelo murino e em estudos com humanos, a HFD é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de DHGNA. Sabe-se que o consumo de banha de porco, rica em SFA, agrava a fibrose hepática, induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) enquanto o consumo de óleo de milho, rico em PUFAs, não acarretou o agravamento da doença hepática. O estudo proteômico demonstrou que a ingestão crônica de banha aumenta o estresse do retículo endoplasmático (ER do inglês, *endoplasmic reticulum*) e desequilibra a reação de transmetilação hepática (WANG et al., 2017).

O consumo excessivo de carboidratos simples também é um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, DM2 e DHGNA. Sabe-se que nos países que usam xarope de milho, que possui alto teor de frutose, em alimentos, há uma prevalência 20% maior de diabetes em comparação com os países que não o utilizam, independente da obesidade (GORAN; ULJASZEK; VENTURA, 2013). Já foi demonstrado que o consumo de frutose, mas não de bebidas adoçadas com glicose, promoveu aumento da adiposidade visceral, RI e aumento da lipogênese *de novo* (DNL, do inglês *de novo lipogenesis*) hepática (COX et al., 2012; SILBERNAGEL et al., 2011; STANHOPE et al., 2009). O mecanismo proposto é que os carboidratos da dieta, após digeridos, são absorvidos pelo intestino e, através da veia porta, chegam diretamente ao fígado. Mais de 90% da frutose é metabolizada pelo tecido hepático através do metabolismo de primeira passagem. A frutose pode regular diretamente os fatores transcricionais que regulam a DNL ou pode fazê-lo indiretamente, induzindo estresse do ER, RI e diminuição do metabolismo mitocondrial, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

Portanto, fatores ambientais, como a alimentação, estão intimamente associados com a adiposidade corporal, sendo esta um importante fator de risco para o desenvolvimento de

diversas alterações metabólicas patológicas, como a RI, a DHGNA e a síndrome metabólica (RICCARDI; GIACCO; RIVELLESE, 2004). Estudos de revisão têm demonstrado que fatores como a expansibilidade, a distribuição, a composição celular, a adipogênese, a vascularização, a inflamação, dentre outras alterações do TA são mecanismos de investigação essenciais para que seja possível determinar o risco cardiovascular (ANTHONY et al., 2019; FUSTER et al., 2016). Assim, os fenômenos de hipertrofia e de hiperplasia adipocítica, isoladamente, já não são suficientes para explicar as alterações metabólicas que podem acometer um indivíduo com elevado percentual de adiposidade (WEISBERG et al., 2003).

Desta forma, fica evidente a importância das funções endócrinas do TA, tendo em vista que o mesmo produz um grande número de adipocinas que exercem função autócrina e parácrina, que atuam a nível local, e endócrina, que atuam a nível sistêmico envolvidas em diversos processos metabólicos (GOOSSENS, 2008; HUTLEY; PRINS, 2005). Dentre as adipocinas produzidas pelo TA branco, destacam-se a leptina e a adiponectina, tendo em vista que equilíbrio gerado por estas adipocinas culmina na homeostase metabólica do TA.

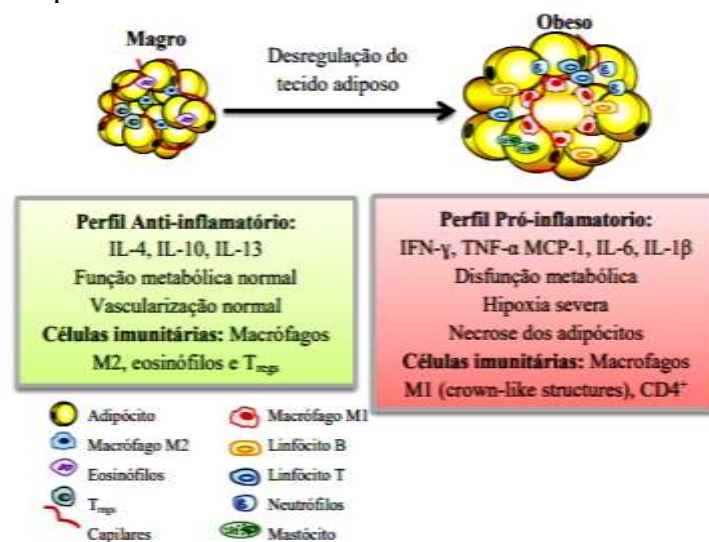
Em linhas gerais, quando o adipócito capta glicose há formação de TG, culminando na maior secreção de leptina. Assim, este hormônio fosforila AMPK, estimulando a lipólise e inibindo a lipogênese. O bloqueio da lipogênese favorece a diminuição da massa adipocitária, sendo, portanto, este mecanismo considerado protetor contra a lipotoxicidade provocada pelo excesso de TG nos adipócitos (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016). Já a adiponectina atua de forma favorável à regulação do metabolismo de glicose, estando associada não só a melhora da sensibilidade à insulina, como também a atenuação do estresse oxidativo e inflamação (KUBOTA et al., 2007; YANAI; YOSHIDA, 2019).

O processo de expansibilidade do TA na obesidade favorece a hiperleptinemia, aumento das concentrações séricas de leptina, podendo estar associada a alterações no seu receptor, fenômeno denominado resistência à leptina (ZHANG; SCARPACE, 2006). A resistência à leptina faz com que seu efeito supressor sobre a secreção pancreática de insulina pós-prandial seja comprometido, promovendo, portanto, alteração no eixo adipo-insular, ocasionando hiperleptinemia e hiperinsulinemia no indivíduo obeso (SEUFERT, 2004). Ademais, o indivíduo obeso também cursa com a hipoadiponectinemia, o que pode favorecer o aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (DI CHIARA et al., 2012). Assim, a somatização da resistência à leptina com a hipoadiponectinemia, consequências do acúmulo do TA, estão associadas ao aumento da lipogênese e à diminuição da lipólise, favorecendo os demais efeitos metabólicos adversos na obesidade, como: dislipidemias,

inflamação, estresse oxidativo, esteatose hepática, falha na cascata de sinalização de insulina (LAVOIE; GAUTHIER, 2006).

Nesse contexto, observa-se que o acúmulo excessivo de TA pode levar à desregulação da função deste tecido, favorecendo a alteração na produção de adipocinas para um perfil que pode desencadear resposta inflamatória a nível local (LEAL; MAFRA, 2013). O mecanismo principal que propicia este quadro é a alteração fenotípica dos macrófagos infiltrados no TA, que passam a ser predominantemente do tipo M1, os quais, além das alterações anteriormente citadas, promovem ainda o aumento da circulação da proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*). Estes monócitos, ao chegarem ao adipócito, se diferenciam em macrófagos (tipo M1), desenvolvendo, assim, um ciclo inflamatório no TA (Figura 1). Vale ressaltar que a infiltração de macrófagos se correlaciona diretamente com o grau de obesidade e com o tamanho dos adipócitos (LONGO et al., 2019).

Figura 1 - Esquema de desregulação do tecido adiposo.



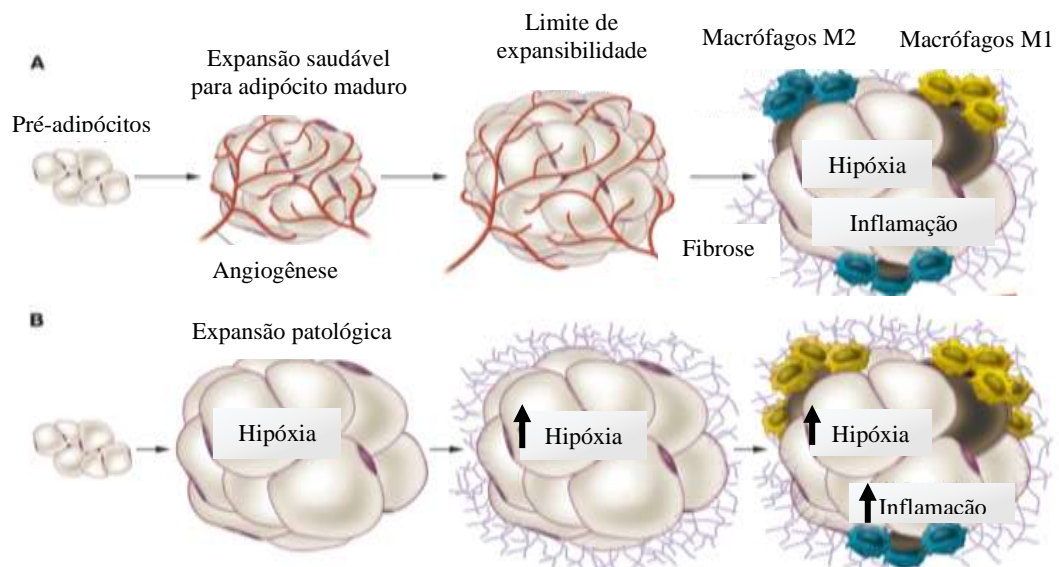
Legenda: Adipócitos “magros” acumulam lipídeos, regulam a homeostase metabólica e apresentam um perfil anti-inflamatório devido à presença de macrófagos de fenótipo tipo 2 (M2) que produzem, essencialmente, citocinas anti-inflamatórias. O aumento na deposição de TG favorece a expansão progressiva do TA, promovendo uma alteração na síntese de citocinas, produzindo uma elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos de fenótipo tipo 1 (M1).

Fonte: Adaptado de (CATALÁN et al., 2013).

O TA possui uma rede capilar relativamente densa com função de transportar os nutrientes e o oxigênio adequados para suprir o tecido. Indivíduos eutróficos apresentam maior vascularização do tecido, no qual os adipócitos se encontram delimitados por um ou mais capilares. Entretanto, aqueles que cursam com a obesidade apresentam TA com menor

vascularização devido à expansão dos adipócitos, o que pode induzir a hipóxia. Observa-se, ainda, que o TA de um indivíduo obeso apresenta vasos sanguíneos maiores, não implicando, no entanto, no aumento do fluxo sanguíneo para este tecido (SUN et al., 2011; TRAYHURN, 2013). A hipóxia também favorece o processo inflamatório no TA de maneira direta, ativando vias de sinalização nos adipócitos e nos macrófagos, como o fator nuclear kappa B (NFkB, do inglês *nuclear factor kappa B*) e o fator induzido por hipóxia alfa 1 (HIF-1 α , do inglês *hypoxia-inducible factor 1-alpha*), ou de maneira indireta, na qual a hipóxia induz a morte do adipócito (Figura 2) (YE, 2011).

Figura 2 - Expansão do tecido adiposo.



Legenda: Expansão do TA. (A) Expansão do TA “magro” através do recrutamento efetivo de células precursoras adipogênicas, juntamente com uma resposta angiogênica adequada e remodelamento da matriz extracelular (MEC). (B) A expansão do TA na obesidade consiste em aumento dos adipócitos existentes, angiogênese limitada e hipóxia subsequente. Como resultado, os macrófagos do tipo M1 prevalecem, levando a um fenótipo inflamatório fortemente associado à resistência à insulina.

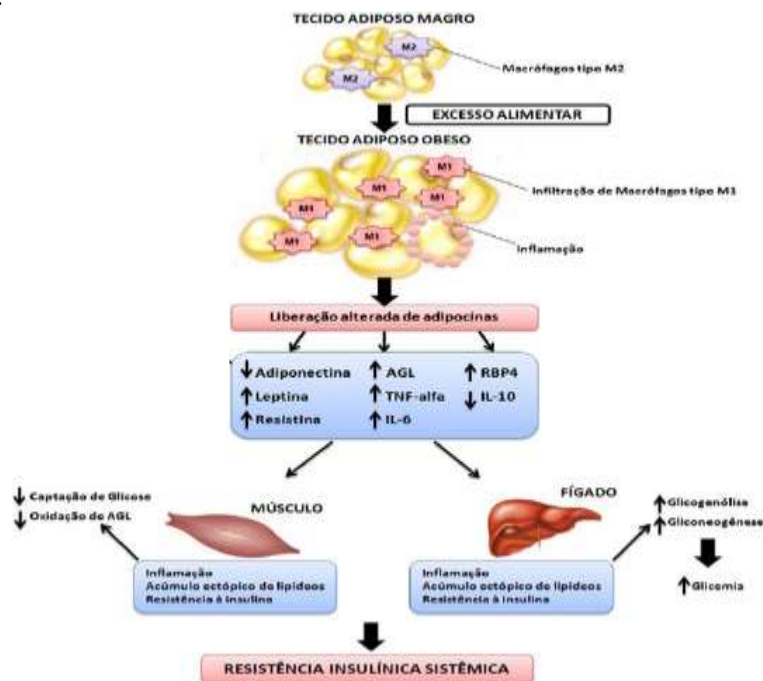
Fonte: Adaptado de (SUN et al., 2011).

Assim, a inflamação de baixo grau, a expansibilidade e o remodelamento do TA promovem o aumento de ácidos graxos livres (AGL) circulantes devido à perda da sua capacidade de armazenar lipídeos, fazendo com que haja acúmulo de lipídeos de forma ectópica, ou seja, em outros tecidos (Figura 3) (SAMUEL; SHULMAN, 2012; STINKENS et al., 2015). Neste caso, além da expansibilidade, a distribuição do TA parece ser de fundamental importância, uma vez que estudos apontam que a lipólise do TA visceral fornece mais AGL para o fígado, quando comparado ao TA subcutâneo, por exemplo (NIELSEN et al., 2004). Esse acúmulo ectópico de lipídeos promove RI em órgãos que também são insulino-dependentes, além de estar envolvido no comprometimento da função das células

hepáticas e das beta-pancreáticas, efeito conhecido como lipotoxicidade (TROUWBORST et al., 2018; VAN HERPEN; SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008). A lipotoxicidade promove alteração na cascata de sinalização da insulina, contribuindo, para o desenvolvimento da RI, por ativar proteínas quinase que fosforilam os substratos de receptor de insulina (IRS do inglês, *insulin receptor substrate*) em resíduos de serina que é de caráter inibitório à ação da insulina (EMANUELA et al., 2012; FESTUCCIA et al., 2014; OSBORN; OLEFSKY, 2012).

Assim, a somatização de todos os eventos metabólicos que acontecem pela expansibilidade e remodelamento do TA, dentre eles a alteração na síntese e na atuação de adipocinas, a alteração fenotípica de macrófagos, a inflamação e a hipóxia, culmina em alterações na cascata de sinalização da insulina, podendo ocasionar em resistência a este hormônio (Figura 3) (WEISBERG et al., 2003).

Figura 3 - Hipertrofia adipocítica induzindo alteração fenotípica de macrófagos em tecido adiposo.



Legenda: Hipertrofia do tecido adiposo induzindo a infiltração e a proliferação de macrófagos, além da alteração na secreção de adipocinas levando à inflamação crônica de baixa intensidade. Este quadro, associado ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, altera a homeostase de tecidos periféricos, como músculo e fígado, promovendo acúmulo ectópico de gordura, inflamação e resistência à insulina.

Fonte: Adaptado de (SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

1.1.2 Resistência à insulina

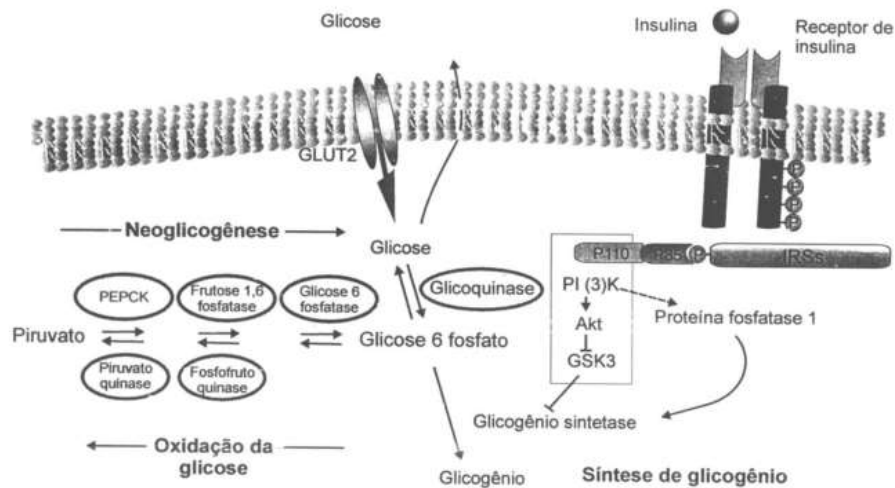
A insulina é um hormônio anabólico constituído por 2 cadeias de polipeptídios A e B unidas por ponte dissulfeto. Este hormônio é produzido pelas células β -pancreáticas e sua

síntese é estimulada por nutrientes, como glicose, aminoácidos e lipídeos (SALTIEL; KAHN, 2001). Para exercer sua função, a insulina precisa se ligar ao seu receptor, denominado receptor de insulina (IR do inglês, *insulin receptor*), constituído por uma proteína membranar formada por quatro subunidades, sendo duas subunidades α (extracelulares) e duas subunidades β (transmembranares), presentes em diversos tecidos, como hepático, adiposo, muscular e cardíaco (RAMALINGAM; OH; THURMOND, 2013; VAN OBBERGHEN, 1994).

O IR é do tipo tirosina quinase, assim, uma vez que a insulina se liga à subunidade α , automaticamente ocorre uma alteração conformacional neste receptor que favorece a fosforilação das subunidades β , devendo esta ocorrer nos resíduos de tirosina, haja vista que a fosforilação em resíduo de serina é de ação inibitória, modulando, portanto, de forma negativa a sinalização deste hormônio (SALTIEL; KAHN, 2001; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). O IR ativado, fosforila o substrato do receptor de insulina (IRS, do inglês *insulin receptor substrate*), que origina regiões de reconhecimento para moléculas intracelulares que contenham o domínio homólogo 2 ao Src (domínio SH2), intermediando a sinalização insulínica. Dentre estas moléculas, destacam-se as proteínas Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) e Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*), sendo a mais relevante a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (RAMALINGAM; OH; THURMOND, 2013). Assim, destaca-se a via de sinalização PI3K/AKT, essencial para o metabolismo glicídico regulado pela insulina, tendo em vista que a inibição desta via bloqueia quase todas as repostas metabólicas estimuladas pela insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; HUANG et al., 2018).

A PI3K possui uma subunidade regulatória (p85) com dois domínios SH2, os quais permitem sua ligação aos sítios fosforilados do IRS, ativando, assim, a subunidade catalítica (p110) que conseqüentemente estimula uma proteína serina/treonina quinase (AKT) (CZECH, 2017; HUANG et al., 2018). Esta proteína estimula a captação de glicose por meio da translocação dos transportadores de glicose (GLUT, do inglês, *glucose transporter*), que por sua vez favorecem a entrada de glicose nas células (HOLMAN, 2018; HUANG et al., 2018). O tipo do GLUT que sofrerá translocação para a membrana varia de acordo com o tecido. Desta forma, enquanto no tecido adiposo, no coração e no músculo estriado o transportador atuante é o GLUT4, no fígado e no pâncreas o responsável pela captação de glicose é o GLUT2 (HOLMAN, 2018).

Figura 4 - Regulação do metabolismo da glicose.



Legenda: A insulina estimula a utilização e o armazenamento de glicose como glicogênio e ainda inibe a síntese dessa hexose. Este hormônio estimula a expressão de genes da via glicolítica (quinases), enquanto inibe aqueles que codificam enzimas da via da gliconeogênese (PEPCK e fosfatases). A insulina também estimula a síntese de glicogênio através da inibição da GSK3 e da proteína fosfatase 1.

Fonte: Adaptado de (CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

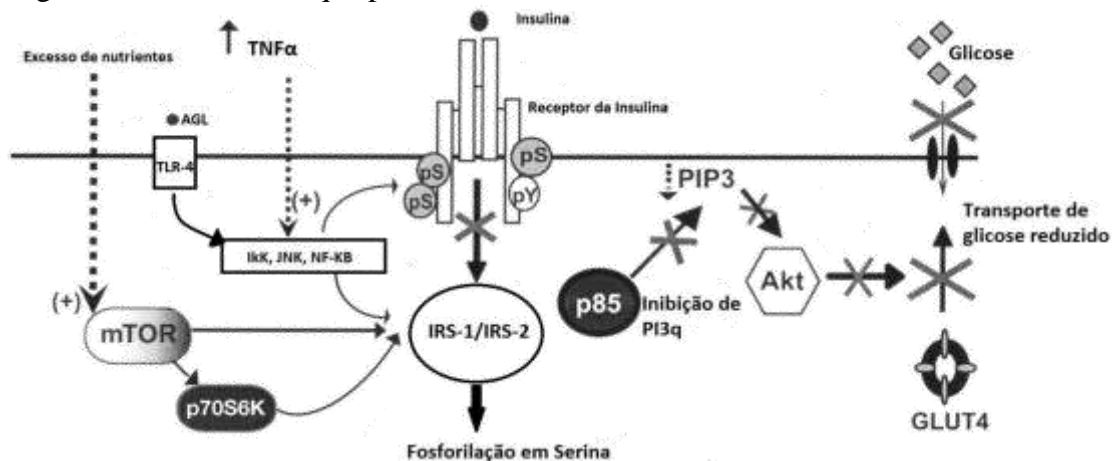
A insulina promove o armazenamento de glicose na forma de glicogênio, ativando a via da glicogênese, no tecido muscular e hepático, graças à ação da enzima glicogênio sintase que é inativada quando fosforilada pela glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) enquanto que, paralelamente, a proteína quinase 1 é ativada pela insulina, resultando na produção de glicogênio (Figura 4) (CROSS et al., 1995; HUANG et al., 2018; SALTIEL; KAHN, 2001). Este hormônio anabólico inibe ainda a expressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave no controle da gliconeogênese hepática, além de diminuir a transcrição de genes codificantes da frutose-1,6-bifosfatase e da glicose 6 fosfatase e de aumentar a transcrição de genes de enzimas glicolíticas (HUANG et al., 2018; SUTHERLAND, 1996). As vias de sinalização que regulam a transcrição desses genes envolvem a proteína AKT e o fator de transcrição *forkhead* (FoxO) (HUANG et al., 2018).

Desta forma, nota-se a importância da ação molecular da insulina no metabolismo da glicose, uma vez que estão associados aos mecanismos moleculares envolvidos na obesidade, tendo em vista que a mesma desempenha um papel central e aumenta a probabilidade de ocorrência de RI (KOTRONEN; YKI-JÄRVINEN, 2008; TOLMAN et al., 2004).

A RI é definida como uma resposta diminuída às ações biológicas deste hormônio, podendo ocasionar hiperinsulinemia, influenciando não só o metabolismo de carboidratos, como também o metabolismo de lipídeos (CZECH, 2017). No que concerne ao metabolismo de lipídeos, quando a deposição de TG ocorre de forma superior à β -oxidação, ocorre a hipertrofia adipocítica. Este fenômeno de expansibilidade favorece o quadro de inflamação

desencadeado pelo fator de transcrição NFkB, o que pode acarretar alteração na via de sinalização da insulina, impedindo a ligação deste hormônio ao seu receptor, afetando a fosforilação da subunidade AKT ou da subunidade IRS, diminuindo a expressão membranar do GLUT. As alterações na cascata de sinalização de insulina promovem a RI, com consequente hiperinsulinemia e hiperglicemia (Figura 5) (BUGIANESI et al., 2010). Cabe ressaltar que a RI pode acometer diversos órgãos, como o fígado, aumentando a gliconeogênese e a glicogenólise, podendo favorecer a progressão da DHGNA por induzir o estresse oxidativo e a inflamação hepática (BUGIANESI et al., 2010).

Figura 5 - Mecanismos que promovem a resistência à insulina.



Legenda: A inflamação promove alteração na via de sinalização de insulina, impedindo a ligação deste hormônio ao seu receptor, afetando a fosforilação da subunidade AKT ou da subunidade IRS, diminuindo a expressão membranar do GLUT, favorecendo a resistência à insulina.

Fonte: Adaptado de (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014).

1.1.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica

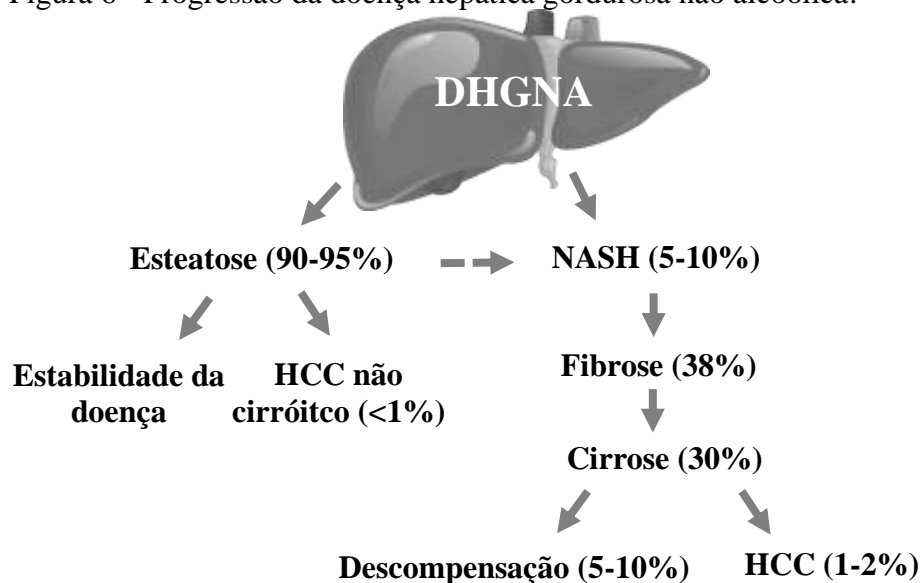
A DHGNA é definida como uma condição clínico-patológica relacionada à infiltração de lipídeos, principalmente TG, no citoplasma dos hepatócitos de indivíduos que não ingerem álcool de forma excessiva. Esta doença vem apresentando relevância científica, graças à maior ocorrência de número de casos a nível mundial (LOMAN et al., 2018).

De acordo com a *World Gastroenterology Organization*, a prevalência de DHGNA acomete entre 40 e 90% da população mundial com obesidade (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2012). No Brasil, os dados sobre a prevalência da DHGNA na população ainda são parcialmente negligenciados devido aos poucos estudos originais no país. Alguns trabalhos avaliaram a presença de esteatose hepática, utilizando o método clássico de diagnóstico: a ultrassonografia. Um estudo na Bahia observou critérios compatíveis para o diagnóstico de DHGNA em 65,4% dos pacientes (n=185), preferencialmente no gênero masculino (56,2%) e com idade média de 56 anos (MATTEONI

et al., 2011). Recentemente, Perazzo e colaboradores (2018) realizaram um estudo transversal analisando dados do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA), objetivando desenvolver um algoritmo não invasivo para o diagnóstico de esteatose hepática. Os autores inferem que testes não invasivos podem ser usados na seleção de indivíduos para triagem de fibrose hepática relacionada à DHGNA ou para o encaminhamento da modificação de hábitos de vida (PERAZZO et al., 2018). Vale ressaltar que esta doença é, na maioria dos casos, assintomática, o que pode contribuir para a não identificação precoce da mesma.

A DHGNA inclui um amplo espectro de anormalidades hepáticas, dentre as quais destaca-se a esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo superior a 5% de TG nos hepatócitos. A esteatose é o evento inicial desta doença, sendo classificada em três estágios: leve, quando o acúmulo de TG acomete de 0 a 33% dos hepatócitos; moderada com deposição de TG entre 34 a 66%; e grave quando o acúmulo é superior a 66%. A esteatose pode progredir para sua forma mais grave, a esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*), com potencial evolução para fibrose, cirrose e suas conseqüentes complicações como o hepatocarcinoma, havendo piora na qualidade de vida do indivíduo. Apesar da alta prevalência a progressão da DHGNA é lenta e apenas 5 a 10% evoluem para NASH (Figura 6) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

Figura 6 - Progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica.



Legenda: Progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica. DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; NASH, esteato-hepatite não alcoólica; HCC, hepatocarcinoma; (% prevalência/incidência). O termo DHGNA engloba um amplo espectro de condições, desde o simples acúmulo de gordura (fígado gorduroso ou esteatose) até esteato-hepatite (NASH), fibrose e cirrose, com suas conseqüências clínicas. Apesar da alta prevalência de DHGNA na população geral, a grande maioria dos pacientes apresenta esteatose simples, que não está associada à sobrevida comprometida. Fonte: Adaptado de (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

O mecanismo para o desenvolvimento e a progressão da DHGNA é complexo e multifatorial. A hipótese de *two hits* foi um dos mecanismos descritos que desencadeou a associação de eventos que favorecem o acúmulo hepático de lipídeos. De acordo com a mesma, este acúmulo ocorre devido ao estilo de vida sedentário, a HFD, a obesidade e a RI que atuam como o primeiro *hit*, sensibilizando o fígado para os demais insultos, que caracteriza o segundo *hit*. O segundo *hit*, por sua vez ativa cascatas relacionadas à inflamação e à fibrogênese (PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). No entanto, tornou-se rapidamente evidente que essa visão é limitada devido à complexidade da DHGNA. Assim, começaram a surgir evidências de que múltiplos fatores atuam sinergicamente em indivíduos geneticamente predispostos, corroborando para o desenvolvimento e a progressão da doença. Conseqüentemente, uma hipótese de múltiplos *hits* substituiu a hipótese de dois *hits* para a progressão da DHGNA. Assim, uma série de fatores complexos estão envolvidos na progressão da DHGNA, como: RI, obesidade e alterações no perfil microbiano intestinal. Estes fatores possuem uma íntima relação com fatores ambientais, como os hábitos alimentares e os fatores genéticos (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; POLYZOS et al., 2012).

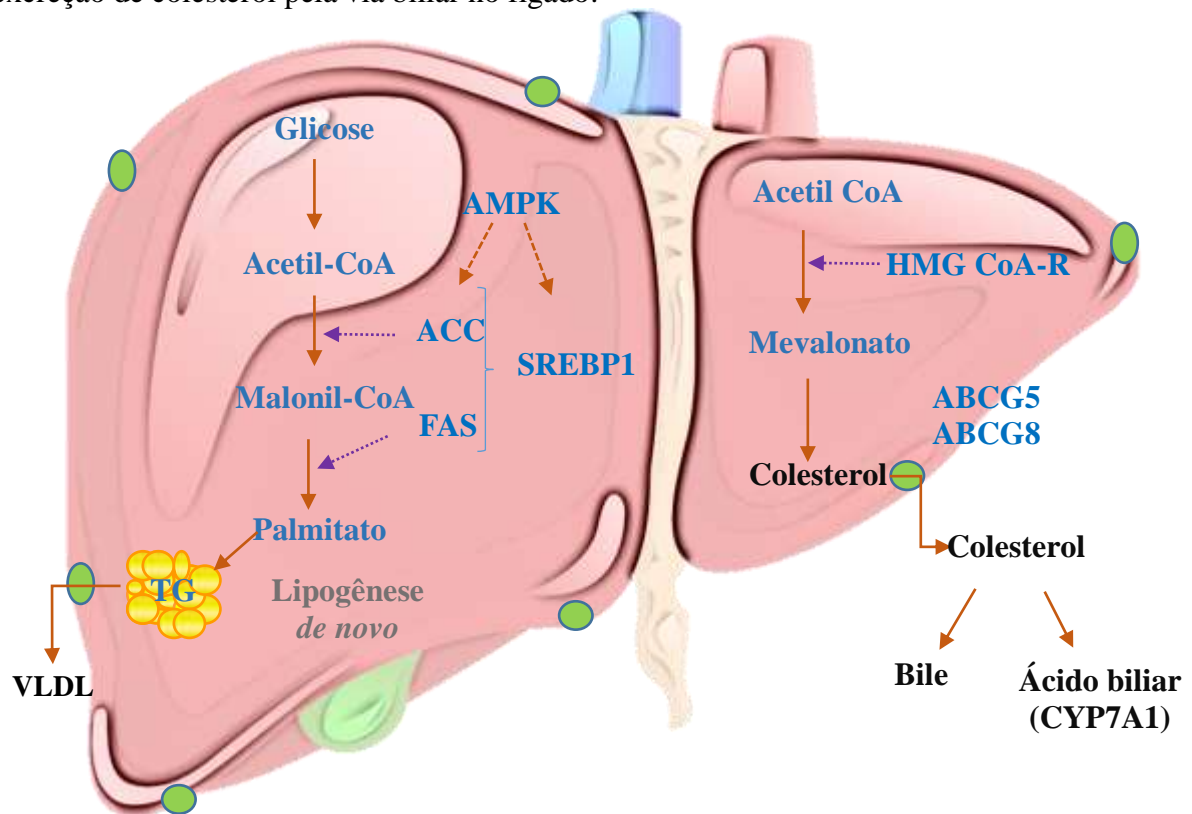
A RI tem sido relatada como etapa crucial para o desenvolvimento e a progressão da DHGNA. Sabe-se que a RI pode promover maior influxo de AGL para o fígado, uma vez que está associada à DNL e à maior lipólise no TA, podendo exceder a capacidade de depuração lipídica (oxidação) ou a capacidade de exportação de TG hepático. O importante papel desempenhado pela insulina é parcialmente explicado pela sua capacidade de estimular genes lipogênicos (BRADBURY; BERK, 2004; BUGIANESI et al., 2010).

A síntese e a oxidação hepática de lipídeos sofrem ação da enzima 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase (AMPK, do inglês *AMP-activated protein kinase*), uma proteína que possui um amplo espectro de ações biológicas. A fosforilação de AMPK reduz a expressão de SREBP1c e inativa enzimas envolvidas na lipogênese como a acetil co-A carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS, do inglês *fatty acid synthase*), inibindo assim a via da DNL (SRIVASTAVA et al., 2012).

A SREBP1c (do inglês, *sterol regulatory element-binding proteins*), um fator de transcrição que atua na regulação homeostática de lipídeos celular, modula a ativação de proteínas envolvidas na síntese de AG, como a ACC. Esta coenzima deve ser exportada da mitocôndria como citrato, sendo novamente convertida em acetil co-A (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002; MOUNIER; BOURAOUI; RASSART, 2014; POSTIC; GIRARD, 2008). Já no citoplasma, a conversão de acetil co-A em malonil co-A é realizada

pela enzima ACC, sendo este uma importante fonte de carbonos para síntese de AG. Os carbonos são unidos e reduzidos pela ação da FAS, também regulada pelo SREBP1c, formando palmitato, o principal produto da DNL, levando à formação de AG. O AG pode ser convertido a TG, se ligado a uma molécula de glicerol. O TG então formado pode ser excretado do fígado para a circulação na forma de VLDL (do inglês, *very low density lipoprotein*) ou ser oxidado pela mitocôndria para gerar energia (Figura 7) (LEAVENS; BIRNBAUM, 2011).

Figura 7 - Esquema simplificado da síntese de ácidos graxos, da síntese de colesterol e da excreção de colesterol pela via biliar no fígado.



Legenda: Setas tracejadas indicam modulação de proteínas em fatores de transcrição ou em enzimas, bem como a ação de enzimas nas vias da lipogênese de novo e na síntese de colesterol. Proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis (SREBP-1c) proteína acetil CoA carboxilase (ACC), proteína ácido graxo sintase (FAS). Transportadores da sub-família G (ABCG5 e ABCG8), enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA-R).

Fonte: Adaptado de (POSTIC; GIRARD, 2008).

Em quadros de RI já foi relatado modulação negativa do IRS-2, que atua como regulador de SREBP1c. Assim, se há menor expressão deste receptor, há superexpressão de SREBP1c, e a DNL está maximizada (SCHREUDER et al., 2008; STEFAN; KANTARTZIS; HÄRING, 2008).

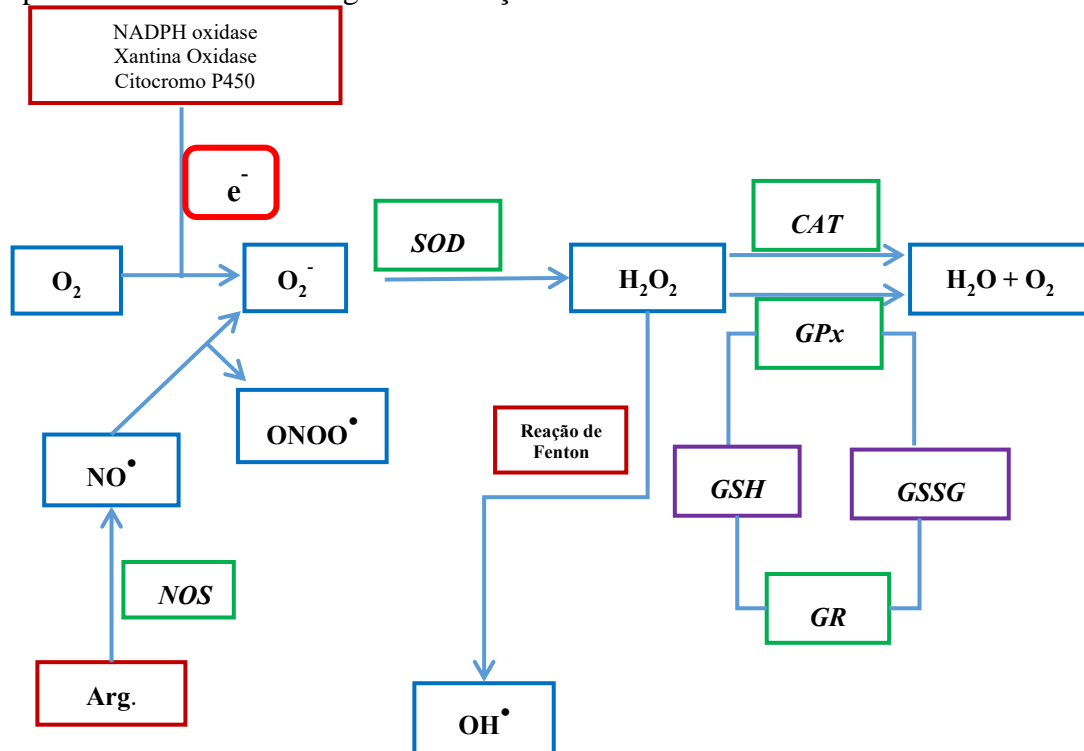
A síntese e a excreção de colesterol constituem outro ponto importante do metabolismo hepático de lipídeo, haja vista que o metabolismo desta molécula lipídica

influencia sua concentração plasmática e tecidual, que possui como ponto limitante a atuação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA-R) (YAMANE; KOBAYASHI-HATTORI; OISHI, 2011). A síntese de colesterol conta com uma via composta por cinco etapas. Inicialmente ocorre a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, originando acetoacetil-CoA, que, por sua vez, reage com uma terceira molécula de acetil-CoA, formando β -hidro- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Pela ação enzimática da HMG CoA-R, ocorre redução da HMG-CoA em mevalonato (Figura 6) que será posteriormente modificado para formar colesterol (BROWN; GOLDSTEIN, 1997). A fim de evitar o acúmulo de colesterol hepático, os transportadores da subfamília G (ABCG5 e ABCG8), expressos nos hepatócitos e nos enterócitos, atuam inibindo a absorção deste lipídeo, promovendo o efluxo de colesterol para a bile (Figura 7) (YU et al., 2014).

O acúmulo hepático de lipídeos é predominantemente constituído por TG e este armazenamento pode ocorrer em concomitância com a lipotoxicidade. O aumento dos níveis de lipídeo hepático faz com que haja maior estímulo a β -oxidação, gerando uma disfunção na cadeia respiratória mitocondrial. Este evento metabólico leva ao prejuízo na homeostase lipídica, geração de metabólitos tóxicos de lipídeos e superprodução de ROS. Assim, demonstra-se uma relação entre aumento de AGL, DHGNA e estresse oxidativo (BUGIANESI et al., 2010).

A fim de diminuir a reatividade destas espécies e, portanto, reestabelecer o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, o organismo humano se contrapõe ao desequilíbrio através do sistema de defesa antioxidante. Este sistema consiste em uma série de mecanismos que envolvem compostos com capacidade antioxidante, sejam eles endógenos (enzimas) ou exógenos (fonte dietética), que reagem com as ROS, neutralizando-as. O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), catalase (CAT), entre outras. A SOD constitui a primeira linha de defesa antioxidante e o maior sistema de defesa do organismo contra o ânion superóxido por catalisar a dismutação do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KURUTAS, 2016; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). O H_2O_2 formado pela dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ é convertido em água (H_2O) e O_2 pela CAT, uma enzima antioxidante localizada em peroxissomos celulares. Além da CAT, a GPx também remove H_2O_2 por acoplar sua redução com a oxidação da glutaciona reduzida (GSH) (Figura 8) (KURUTAS, 2016).

Figura 8 - Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir da molécula de oxigênio e atuação de enzimas antioxidantes.



Legenda: Redução do oxigênio, na presença de um elétron livre, gerando ânion superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}). Atuação de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). Além da importância da óxido nítrico sintase (NOS) no processo de formação do peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$).

Fonte: O autor, 2015.

1.1.4 Microbiota intestinal

O termo microbiota se refere à identificação taxonômica dos microrganismos em um ambiente. A comunidade de microrganismos que reside no intestino é denominada microbiota intestinal (MARCHESI; RAVEL, 2015; WHITESIDE et al., 2015). A microbiota intestinal é passível de sofrer modificações ao longo do tempo, haja vista que fatores genéticos e ambientais são capazes de modular os microrganismos colonizadores do intestino (BOULANGÉ et al., 2016; FASANO, 2017). Dentre os fatores ambientais, a alimentação atrelada à qualidade da dieta, principalmente as hiperlipídicas, tem sido descrita como um dos principais promotores de alterações na comunidade microbiana em conjunto com o aumento da permeabilidade intestinal (DANIEL et al., 2014; MOREIRA et al., 2012). A alteração tanto na comunidade microbiana quanto na integridade intestinal vem sendo relacionada como causa ou consequência de diversas DCNTs, como obesidade, DHGNA, diabetes e outras (BOULANGÉ et al., 2016; FASANO, 2017; VELÁZQUEZ et al., 2019).

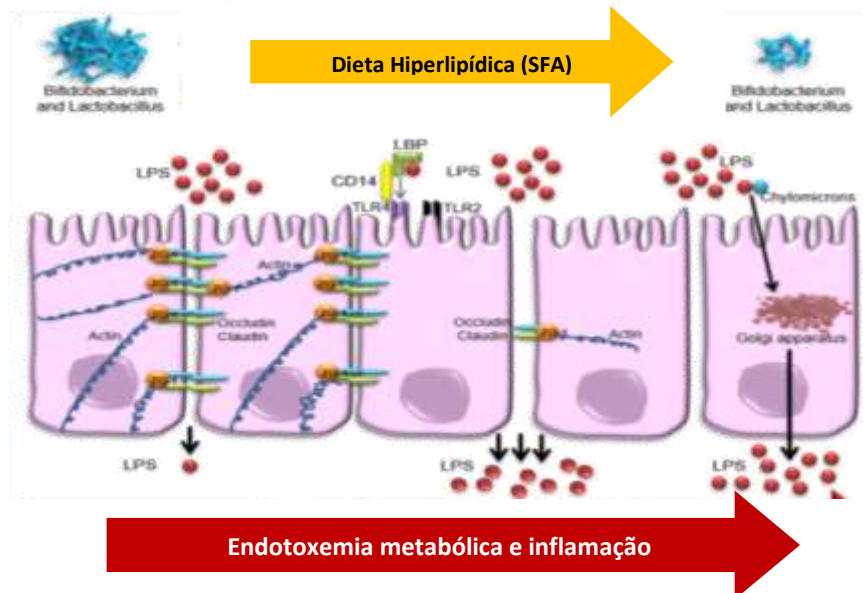
No que concerne à obesidade e suas alterações metabólicas, é sugerido a inibição da via da AMPK, que regula o metabolismo energético celular no tecido adiposo e no fígado, estando associada à menor β -oxidação e ao aumento da esteatose hepática (HUR et al., 2015; SMITH et al., 2016). Além disso, a microbiota intestinal alterada pode suprimir o fator adiposo induzido pelo jejum (FIAF, do inglês *fasting induced adipose factor*), promovendo aumento da atividade da lipoproteína lipase (LPL, do inglês *lipoprotein lipase*) favorecendo o maior acúmulo de TG nos adipócitos e nos hepatócitos (BÄCKHED et al., 2004; PASCALE et al., 2018).

Ademais, a microbiota intestinal possui uma interação bidirecional com o fígado, eixo intestino-fígado (TRIPATHI et al., 2018). Essa interação é estabelecida pela veia porta, que permite o transporte de produtos derivados do intestino diretamente para o fígado, e secreção de bile e de anticorpos para o intestino (ALBILLOS; DE GOTTARDI; RESCIGNO, 2020). O fígado recebe cerca de 70% do fluxo de sangue oriundo do intestino e a interface entre esses dois órgãos é feita pela barreira intestinal, constituída por células epiteliais responsáveis por manter a homeostase do intestino (ALBILLOS; DE GOTTARDI; RESCIGNO, 2020; COMPARE et al., 2012).

O consumo em excesso de lipídeos tem sido relacionado ao aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo, assim, a translocação de lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina produzida por bactérias gram negativas, para a circulação. Ao atingir a circulação, fenômeno denominado como endotoxemia metabólica, o LPS se infiltra em tecidos como o fígado ou tecido adiposo, desencadeando resposta imune inata (CANI et al., 2007; GHETTI et al., 2018). Um dos mecanismos descritos é a formação de um complexo, graças ao acoplamento do LPS à proteína de ligação ao LPS no plasma (LBP, do inglês *LPS binding protein*), que ativa a proteína receptora CD14 (do inglês, *cluster of differentiation 14*), localizada na membrana plasmática dos macrófagos, que no fígado denomina-se células de kupffer (DUSEJA; CHAWLA, 2014; JI et al., 2019). As células de kupffer, presentes no sinusóides hepáticos, expressam receptores *Toll-like 4* (TLR4, do inglês, *toll like receptors 4*) que são ativados pelo complexo LPS-LBP, acionando sinais de transdução favorecendo a ativação de fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, como o NF κ B (DUSEJA; CHAWLA, 2014; GHETTI et al., 2018; MOREIRA et al., 2012). A via deste fator de transcrição está associada ao aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*) e a interleucina 6 (IL-6, do inglês *interleukin 6*) (Figura 9) (MORAIS et al., 2016). Esta cascata de eventos metabólicos, que associam o aumento da permeabilidade intestinal com a inflamação

hepática, pode favorecer ainda a ativação de células estreladas que deixam de exercer sua principal função, armazenamento de vitamina A, para sintetizar colágeno tipo I e III (característica de miofibroblasto), favorecendo a fibrose hepática (JI et al., 2019; MENCIN; KLUWE; SCHWABE, 2009).

Figura 9 - Esquema simplificado do impacto do consumo de dieta hiperlipídica na microbiota intestinal.



Legenda: Impacto do consumo de dieta hiperlipídica na microbiota intestinal. SFA (*saturated fat acids*); LPS (lipopolissacarídeo), LBP, CD14. Fonte: Adaptado de (MORAIS et al., 2016).

A somatização dos desfechos que acometem as alterações na microbiota e nos parâmetros metabólicos pode promover uma falha na cascata de sinalização de insulina, levando à resistência à ação deste hormônio, sendo este mais um fator que corrobora para a participação da microbiota, mesmo que indiretamente, na patogênese da obesidade e de comorbidades associadas, como a DHGNA (BOULANGÉ et al., 2016; MOREIRA et al., 2012).

Além de promover endotoxemia metabólica, ocasionada por um aumento na permeabilidade intestinal, o consumo de HFD tem sido relacionada a alterações no perfil microbiano intestinal (CANI et al., 2007; MOREIRA et al., 2012). A HFD promove uma diminuição de *Bacteroidetes* e um aumento em *Firmicutes* e *Proteobacteria* (HILDEBRANDT et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Adicionalmente, o aumento do percentual de adiposidade corporal já foi associado negativamente à abundância de *Akkermansia sp.* (filó *Verrucomicrobia*) e positivamente à abundância relativa de

Lactococcus de filo *Firmicutes* e ao gênero *Allobaculum* (filo *Bacteroidetes*) (EVERARD et al., 2013).

As bactérias intestinais são capazes de fermentar carboidratos não digeríveis oriundos da dieta, gerando metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês *short chain fatty acid*) (DEN BESTEN et al., 2013). Dentre os SCFA, destacam-se o acetato e o propionato produzidos, sobretudo, pelo filo *Bacteroidetes*, além do butirato produzido pelo filo *Firmicutes* (BAOTHMAN et al., 2016). Estudos que descreveram os mecanismos moleculares dos SCFA enfatizam sua ligação aos receptores acoplados à proteína G (Gpr, do inglês *G-protein coupled receptor*), também conhecidos como receptores de ácidos graxo (FFAR, do inglês *free fatty acid receptor*), tais como Gpr41 (FFAR3), preferencialmente ativado pelo acetato e Gpr43 (FFAR2), principalmente ativado pelo butirato, sendo este receptor já associado à ativação de peptídeo-1 do tipo glucagon (GLP-1 do inglês, *glucagon like peptide*), incretina sintetizada no intestino que possui como principais funções: estimular a secreção de insulina, suprimir a liberação do glucagon, retardar o esvaziamento gástrico, melhorar a sensibilidade à insulina (BAGGIO; DRUCKER, 2007; DRUCKER; NAUCK, 2006; GÉRARD, 2016; KASUBUCHI et al., 2015).

Desta forma, evidencia-se a importância da alimentação, tanto pelo consumo de dietas hiperlipídicas quanto pelo consumo de carboidratos não digeríveis, como promotora da regulação ou da desregulação da homeostase intestinal através de modulação da microbiota intestinal, o que influenciará diretamente nos metabólitos gerados por bactérias colonizadoras do intestino.

1.2 Papel da nutrição no controle e no tratamento da obesidade e comorbidades

A importância da nutrição para o controle e o tratamento de doenças crônicas é bem difundida academicamente (OMS, 2015). A dieta ocidental, caracterizada pelo excesso de alguns nutrientes específicos, como gordura saturada ou carboidratos simples, e pela alta densidade energética, tem sido associada ao desenvolvimento da RI, obesidade, doenças cardiovasculares e doenças do sistema imune, além de estarem associados com estresse oxidativo e com o aumento de biomarcadores inflamatórios, mesmo em indivíduos saudáveis (EGGER; DIXON, 2014; LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2014; MANZEL et al., 2014). Assim, tendo em vista que a alimentação é um fator ambiental ao qual o ser humano é exposto diariamente, novas estratégias nutricionais vêm sendo investigadas a fim de controlar ou tratar

a obesidade, sendo estas proporcionais ao aumento do conhecimento acerca dos mecanismos de ação exercidos por nutrientes (KONINGS et al., 2014; MOST et al., 2014).

Desta forma, o tipo e a qualidade dos alimentos ingeridos são de extrema importância, não apenas pelo seu valor nutricional, mas também pela capacidade de seus nutrientes e CBAs em interagirem com o genoma. A indicação de uma alimentação diversificada em frutas, legumes e verduras atualmente vai além dos micronutrientes essenciais como as vitaminas e os minerais que são encontrados nestes alimentos. Os compostos bioativos, presentes nestes, ganham cada vez mais destaque na literatura, por meio de seus promissores efeitos benéficos à saúde (MANGANARIS et al., 2014; SHI et al., 2017).

A identificação de que os CBAs são capazes de atuar como moduladores de vias de sinalização através da expressão de genes vem sendo cada vez mais investigada. Diversos trabalhos científicos evidenciam o importante papel da atuação dos CBAs, principalmente os compostos fenólicos, como ativadores ou supressores de vias metabólicas envolvidas na gênese da obesidade, DM, HAS, DHGNA, dentre outras DCNTs (DE OLIVEIRA et al., 2015; ZHAO et al., 2017).

Dentre os compostos fenólicos estudados, Moon e colaboradores (2013) evidenciaram que o tratamento com um extrato rico em quercetina, obtido da casca da cebola, promoveu redução do acúmulo lipídico e do conteúdo de TG nas células 3T3-L1, e redução do peso corporal em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Esses efeitos foram parcialmente atribuídos à regulação da expressão de mRNAs de genes envolvidos em vias metabólicas, como a adipogênese, lipólise, β -oxidação e termogênese em adipócitos e tecido adiposo (MOON et al., 2013).

Um extrato obtido da alface roxa foi capaz de melhorar o metabolismo da glicose, demonstrando efeito antidiabético, além de atenuar o acúmulo lipídico hepático em modelo experimental de obesidade (linhagem C57BL6) induzida por dieta hiperlipídica (CHENG et al., 2014). Utilizando o mesmo modelo animal, Baldwin e colaboradores (2016) demonstraram que os compostos fenólicos presentes no extrato da uva diminuíram o percentual de gordura, melhoraram a tolerância à glicose, a deposição de TG hepático, diminuíram a expressão de proteína C reativa, demonstrando que os fenólicos do extrato utilizado podem atenuar alterações metabólicas oriundas do consumo de HFD (BALDWIN et al., 2016).

O consumo de compostos fenólicos presentes em diferentes matrizes alimentares como cranberry (ANHÊ et al., 2015), *canarium album* (ZHANG et al., 2018), ervilha (FORGIE et al., 2019), uva (COLLINS et al., 2016), framboesa preta (GU et al., 2019) e, até mesmo,

compostos fenólicos isolados como o resveratrol (YIN et al., 2020) podem atuar na microbiota intestinal, demonstrando que parte dos efeitos benéficos locais e sistêmicos observados são atribuídos à restauração da comunidade microbiana e da integridade intestinal em modelos de obesidade induzida por dieta. A relação *Firmicutes/Bacteroidetes* é um dos principais indícios dos efeitos benéficos apresentados, possivelmente por serem os filos de maior predominância no intestino (RINNINELLA et al., 2019). De maneira geral, os estudos que observaram menor razão *Firmicutes/Bacteroidetes* encontraram melhora na sensibilidade à insulina, menor adiposidade, diminuição de concentrações séricas de citocinas inflamatórias e atenuação da esteatose hepática qualitativamente ou quantitativamente (ANHÊ et al., 2018; ROOPCHAND et al., 2015). Adicionalmente, estudos que utilizam o sequenciamento permitem avaliar a maior ou menor abundância relativa de algumas famílias ou gêneros de filos, possibilitando ampliação do conhecimento acerca da influência dos fenólicos na comunidade microbiana e seus desfechos metabólicos (JANDHYALA et al., 2015). Desta forma, cabe a ressalva de que apesar, da maioria dos estudos evidenciarem a menor razão *Firmicutes/Bacteroidetes*, nem todos os membros do filo *Firmicutes* parece conferir um efeito maléfico ao hospedeiro, como no caso da família *Lachnospiraceae* que tem sido associada à maior produção de butirato, embora mais estudos sejam necessários para elucidar o papel de membros do filo *Firmicutes* (VACCA et al., 2020).

Ainda no que concerne ao efeito dos compostos fenólicos sobre a comunidade microbiana, outros filos como o *Verrucomicrobia* vêm sendo cada vez mais investigados devido à maior abundância relativa de *Akkermansia muciniphila*, bactéria gram-negativa, degradadora de muco que já foi associada, por exemplo, à redução da aterosclerose e à melhora da hipertrigliceridemia, em camundongos *Apoe^{-/-}* (MATZIOURIDOU et al., 2016).

São vastos os efeitos benéficos atribuídos ao consumo dos compostos fenólicos. Contudo, os trabalhos recentes têm atribuído estes efeitos, não somente às suas formas intactas encontradas no alimento, mas especialmente aos seus metabólitos formados ao longo do processo de digestão (AURA, 2008; SELMA et al., 2018; TOMÁS-BARBERÁN et al., 2017). Assim, estudos têm investigado a influência do trato gastrointestinal, mais especificamente da microbiota colônica, no metabolismo destes compostos. Os desfechos sugerem uma extensa metabolização colônica gerando metabólitos de baixo peso molecular, que são então absorvidos e, assim, contribuem para o aumento da biodisponibilidade dos compostos fenólicos (CARDONA et al., 2013; WILLIAMSON; CLIFFORD, 2010). Metabólitos de antocianinas foram relatados como potencial estimulador da colonização intestinal por bactérias benéficas, principalmente *Bifidobacterium spp* (BOTO-ORDÓÑEZ et

al., 2014). As urolitinas, metabólitos dos elagitaninos e do ácido elágico, foram capazes de diminuir o acúmulo de TG e de aumentar a oxidação de ácidos graxos em linhagem de adipócitos e de hepatócitos (KANG et al., 2016b), além de inibir ativação de vias inflamatórias como a do NFκB e do MAPK em cultura de células de fibroblasto do cólon (CCD18-Co) (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2010). Cisneros-Zevallos e colaboradores (2020) demonstraram que as urolitinas A e B atenuam de forma diferenciada o acúmulo de lipídeos (urolitina A) e a inflamação (urolitinas A e B) em adipócitos maduros (linhagem 3T3-L1) (CISNEROS-ZEVALLOS; BANG; DELGADILLO-PUGA, 2020).

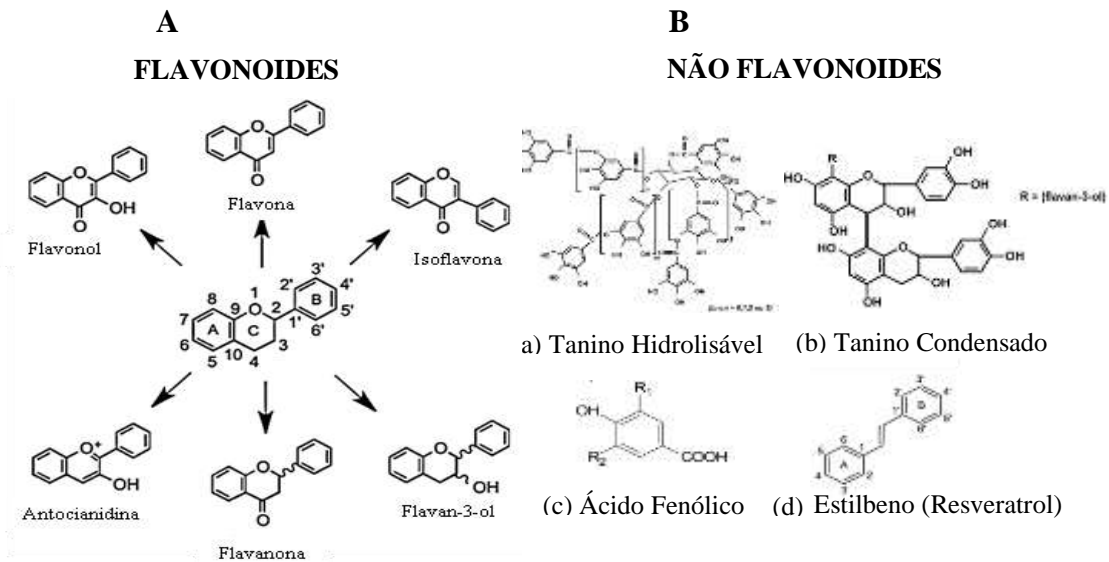
Desta forma, nota-se o quão relevante o consumo de compostos fenólicos vem se tornando, frente aos efeitos promissores que podem evidenciar o papel da nutrição no controle e no tratamento da obesidade (AURA, 2008).

1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas que estão envolvidos na defesa contra adversidades do meio ambiente, tais como organismos patogênicos, raios ultravioletas, precipitações pluviométricas, dentre outras. Sua presença nos alimentos está, geralmente, relacionada à sua cor e aos atributos sensoriais de adstringência e amargor (MANGANARIS et al., 2014). Quimicamente, estes compostos são definidos como substâncias que possuem o grupamento fenol, podendo ser encontrados um ou mais anéis aromáticos com graus variáveis de hidroxilação (acrécimo ou substituição de hidroxila em uma molécula), metilação (ligação ou substituição de um grupamento metila em outros substratos) e glicosilação (adição de um ou mais carboidratos a outras moléculas) (FRAGA et al., 2010). Cerca de 10.000 compostos já foram identificados e, de acordo com sua estrutura química, são classificados em flavonoides ou não flavonoides, e estes grupos podem, ainda, ser divididos em subclasses (LI et al., 2014).

Os flavonóides possuem estrutura química $C_6-C_3-C_6$, sendo constituído por dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma cadeia de três carbonos, normalmente, organizados com um anel heterocíclico oxigenado (anel C). As subclasses do grupo dos flavonóides são divididas de acordo com o grau de oxidação do anel heterocíclico, sendo os flavanóis, as flavanonas, as flavonas, os flavonóis, as isoflavonas, e as antocianidinas os mais presentes nos alimentos (Figura 10A) (FRAGA et al., 2010).

Figura 10 -Estrutura química dos compostos fenólicos.



Legenda: **A**- fórmulas estruturais da classe dos flavonoides e suas subclasses; **B**- fórmulas estruturais da classe dos não-flavonoides (a) tanino hidrolisável; (b) tanino condensado; (c) ácido fenólico; (d) estilbeno. Fonte: **A**- adaptado de: (DEL RIO et al., 2013); **B**- (a) (b) (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004); (c) (ANGELO; JORGE, 2007); (d) (FRAGA et al., 2010).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos principais derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (Figura 10 B). Os ácidos hidroxibenzóicos possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os fenólicos que possuem estrutura química mais simples. Podem ser encontrados em alimentos como cebola e frutas vermelhas. São exemplos desta subclasse de compostos fenólicos, o ácido gálico e o elágico. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3) e são exemplos desta subclasse, os ácidos cafeico, *p*-cumárico e clorogênico (KUMAR; GOEL, 2019).

Os estilbenos possuem uma estrutura comum $C_6-C_2-C_6$, que consiste em dois anéis aromáticos ligados através de uma ponte de dois átomos de carbono com uma ligação dupla (Figura 10 B). O composto majoritário dessa família é o resveratrol, que ocorre: i) em configurações *trans* e *cis*; ii) como formas livres (agliconas) e glicosídeos; e iii) como monômeros, oligômeros e polímeros (viniferina) (FRAGA et al., 2010).

A oligomerização e a polimerização dos flavonóides podem ocorrer em alguns casos, e seus respectivos produtos são chamados de taninos que podem ser fracionados ou não por hidrólise (KHANBABAEE; REE, 2001). Taninos hidrolisáveis são polímeros que, ao sofrerem hidrólise, originam os seguintes componentes: um núcleo central constituído por um polioliol (um açúcar ou um flavonoide, como a catequina) e um ácido fenólico carboxílico que esterifica parcial ou totalmente a molécula nuclear. Estes taninos são classificados de acordo com os ácidos fenólicos carboxílicos presentes, os quais podem ser o ácido gálico (galotaninos) ou o ácido elágico (elagitaninos) (Figura 10 B) (FRAGA et al., 2010). Os

taninos que resistem à hidrólise e apresentam solubilidade em solventes orgânicos são chamados de proantocianidinas oligoméricas e poliméricas não hidrolisáveis, sendo classificados como taninos condensados (KHANBABAEI; REE, 2001). Suas estruturas químicas são definidas não apenas pelo tipo de monômero, mas também pelo tipo de ligação entre eles (Figura 10 B) (FRAGA et al., 2010).

Estes compostos podem estar presentes nos alimentos nas formas solúvel e insolúvel, os quais estão ligados covalentemente a componentes da parede celular da planta. Ao se realizar hidrólise (ácida ou alcalina) há liberação desses compostos fenólicos da matriz alimentar. A hidrólise ácida rompe principalmente ligações glicosídicas e solubiliza os açúcares. A hidrólise alcalina rompe as ligações éster de compostos fenólicos conjugados a constituintes da parede celular, como os polissacarídeos (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

1.4 Jaboticaba

A jaboticabeira (*Myrciaria* sp.) é uma árvore nativa da mata atlântica, pertencente à família Myrtaceae e ao gênero *Myrciaria*. Ela é originária do Centro, Sul e Sudeste do Brasil, sendo encontrada também em outros países da América Latina e da América Central. Somente três espécies são naturalmente encontradas no Brasil: *Myrciaria trunciflora* (Berg) Mattos (jaboticaba-de-cabinho); *Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg (jaboticaba-paulista, ponhema ou assu) e *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg (jaboticaba-sabará), sendo esta a mais cultivada e conhecida. A fruta da jaboticabeira, a jaboticaba amadurece em torno de 40 a 60 dias, possui de 2 a 3 cm de diâmetro e de 1 a 4 sementes. Sua casca possui coloração escura e sua polpa apresenta cor branca (GURAK et al., 2014; WU et al., 2013). Esta fruta apresenta grande potencial de comercialização, tanto pelo seu consumo *in natura*, quanto pelos seus produtos (geleias, licor, dentre outros) (ALEZANDRO et al., 2013). No entanto, grande parte da produção da mesma é descartada, devido à elevada perecibilidade, o que prejudica a sua comercialização (DE LIMA et al., 2008; WU et al., 2012).

A jaboticaba é uma das frutas nativas brasileiras que apresentam expressivas quantidade de compostos fenólicos. Diversos compostos fenólicos já foram identificados na jaboticaba, sendo as antocianinas responsáveis pela coloração da casca. Dentre as antocianinas já foram identificadas: peonidina, peonidina-3-*O*-glicosídeo, piranocianina B, cianidina-3-*O*-glicosídeo e delphinidina-3-*O*-glicosídeo, sendo as duas últimas presentes em maior teor. Adicionalmente, a jaboticaba é uma das frutas da família Myrtaceae com maior conteúdo de elagitaninos e ácido elágico (ALEZANDRO et al., 2013). Outros compostos

fenólicos pertencentes à classe dos flavonoides, ácidos fenólicos, galotaninos e elagitaninos também foram identificados na fruta, sendo estes dois últimos encontrados em quantidades consideráveis em relação a outras frutas da mesma família (INADA et al., 2015; PIMENTA INADA et al., 2020; WU et al., 2012, 2013). Os fenólicos presentes na jabuticaba encontram-se majoritariamente na casca e na semente desta fruta, partes comumente não consumidas (INADA et al., 2015; PIMENTA INADA et al., 2020). Desta forma, a obtenção de uma farinha obtida a partir da casca e da semente da jabuticaba (JPSP, do inglês *jabuticaba peel and seed powder*) pode contribuir para diminuição das perdas da fruta.

Adicionalmente a obtenção de JPSP pode ser incorporada a preparações, visando o enriquecimento das mesmas com compostos fenólicos. Em estudo piloto com humanos, Inada e colaboradores (2019) utilizaram uma gelatina enriquecida com JPSP, a fim de investigar o metabolismo de elagitaninos da jabuticaba em indivíduos com sobrepeso/obesos e eutróficos. Os autores observaram grande inter-variabilidade no metabolismo de elagitaninos e na excreção de urolitinas A, o que foi atribuído a possíveis diferenças na composição da microbiota intestinal (INADA et al., 2019).

Dessa forma, a investigação acerca do metabolismo de elagitaninos vem evidenciando não só a importância da microbiota na formação de metabólitos, bem como demonstrando que as urolitinas, principal classe de metabólitos dos elagitaninos, podem exercer potencial efeito benéfico na saúde do hospedeiro (KUJAWSKA et al., 2020; SAVI et al., 2017). Isso porque os elagitaninos apresentam baixa biodisponibilidade em relação aos seus metabólitos, por serem compostos com alto peso molecular e polaridade relativamente alta, evidenciado pela escassez de estudos que demonstram a presença destes compostos no sangue ou na urina (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014).

Ao longo de sua passagem pelo trato gastrointestinal, os elagitaninos sofrem modificações em sua estrutura tornando-a menos complexa. Quando expostos a ácidos ou bases as ligações ésteres destes taninos são hidrolisadas e o ácido hexahidroxidifênico se rearranja em ácido elágico. Ao chegar no intestino, o ácido elágico e elagitaninos remanescentes são metabolizados por bactérias que promovem uma série de desidroxilações, ao longo de sua passagem pelo trato gastrointestinal, produzindo as urolitinas D, C, A e B, respectivamente (LANDETE, 2011; LIPÍNSKA; KLEWICKA; SÓJKA, 2014). As urolitinas A e B são os principais metabólitos detectados no plasma e na urina, embora alguns derivados de trihidroxi dibenzopirano (hidroxiurolitina A) ou glucuronídeo de éter dimetílico, também tenham sido detectados em quantidades menores (TOMÁS-BARBERAN; ESPÍN; GARCÍA-CONESA, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Estratégias nutricionais vêm sendo estabelecidas com propósito de auxiliar o manejo do tratamento da obesidade, com adoção de diretrizes que estabelecem a inclusão de diferentes matrizes alimentares vegetais. A utilização de JPSP, rica em compostos fenólicos, pode apresentar um grande potencial preventivo/terapêutico, uma vez que diversos estudos epidemiológicos sugerem que o consumo destes compostos reduz a incidência de DCNTs. Portanto, a incorporação de JPSP na dieta pode vir a auxiliar na redução de agravos relacionados à obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do consumo de JPSP frente à modulação de marcadores metabólicos e à composição da microbiota intestinal em modelo de obesidade murino induzido por dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência do consumo de farinha de jabuticaba nos parâmetros de ingestão de ração e evolução ponderal dos animais;
- b) Avaliar a produção de metabólitos urinários do ácido elágico após o consumo de farinha de jabuticaba;
- c) Avaliar a influência do consumo de farinha de jabuticaba em parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e citocinas inflamatórias;
- d) Determinar a influência do consumo de farinha de jabuticaba sobre o estresse oxidativo hepático;
- e) Investigar a influência do consumo de farinha de jabuticaba no remodelamento hepático;
- f) Determinar a influência do consumo de farinha de jabuticaba na composição da microbiota intestinal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Rações experimentais

As rações utilizadas para realização do experimento foram elaboradas pela empresa Prag Soluções Biociências Com. e Serv. Ltda, seguindo as recomendações para roedores *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A farinha de jabuticaba (JPSP, do inglês *jabuticaba peel and seed powder*) foi obtida após liofilização e moagem da casca e da semente da jabuticaba. A composição centesimal de JPSP está disposta na tabela 1. O conteúdo de fibra das rações experimentais foi ajustado para que todas possuíssem a mesma quantidade deste importante ingrediente que pode interferir na digestibilidade de nutrientes e na biodisponibilidade de compostos bioativos (Tabela 2). Desta forma, o teor de fibras encontrado na farinha de jabuticaba foi subtraído do teor de fibra das rações experimentais, conforme a quantidade de farinha a ser adicionada nas rações. Ademais, o teor de amido de milho foi ajustado. Assim, as dietas hiperlipídicas foram balanceadas, a fim de se atingir as necessidades nutricionais dos roedores, sendo isocalóricas e isoproteicas (Tabela 3).

Tabela 1 - Composição centesimal da farinha da jabuticaba.

Componentes	Teor expresso em base seca
Umidade (%)	75
Carboidrato (g/100 g)	65,1
Lipídeos (g/100 g)	0,4
Proteína (g/100 g)	5,2
Cinzas (g/100 g)	4,8
Fibras totais (g/100 g)	24,5

Tabela 2 - Composição das dietas ofertadas aos animais.

Ingredientes (g/kg de dieta)	Grupos experimentais				
	Controle ¹	HF ¹	HF-J5	HF-J10	HF-J15
Amido de milho	465,7	232,7	245,0	257,2	269,5
Amido dextrinizado	155,0	115,0	115,0	115,0	115,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Caseína	140,0	175,0	175,0	175,0	175,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Banha de porco	0,0	238,0	238,0	238,0	238,0
Celulose	50,0	50,0	37,8	25,5	13,3
Mineral	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Vitamina	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
JPSP	0,0	0,0	50,0	100,0	150,0
TOTAL	1000,0	1000,0	1050	1100	1150

Legenda: HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. ¹Composição das dietas oferecida pela PRAG Soluções®.

Tabela 3 - Distribuição de macronutrientes e de energia das dietas ofertadas aos animais.

	Controle	HF	HF-J5	HF-J10	HF-J15
Proteína (g/kg de dieta)	140,0	175,0	175,0	175,0	175,0
Carboidrato (g/kg de dieta)	770,7	497,7	497,7	497,7	497,7
Lipídeo (g/kg de dieta)	40,0	278,0	278,0	278,0	278,0
KJ/g	16,7	21,7	21,7	21,7	21,7

Legenda: HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP; KJ - kilojoule.

4.2 Perfil de compostos fenólicos das rações experimentais

As rações adicionadas de JPSP foram trituradas e analisadas quanto ao perfil de compostos fenólicos solúveis e insolúveis. Para a análise de compostos fenólicos solúveis, cerca de 1 g da amostra foi extraída com solução etanol:água (80:20, v/v). Para a análise de compostos fenólicos insolúveis foi realizado hidrólise alcalina e hidrólise ácida, com hidróxido de sódio a 10 M e ácido clorídrico concentrado, respectivamente (INADA et al., 2015).

Após a extração, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), em cromatógrafo da marca Shimadzu, equipado com: duas bombas LC-20AD, desgaseificador (DGU-20A5), detector com arranjo de diodos (SDP-MD20A), controlador (CBM-20A) e injetor automático (SIL-20AHT). Os dados foram obtidos pelo software LabSolutions (Shimadzu Corp., versão 5.82, 2015). A separação cromatográfica dos compostos fenólicos (antocianinas e não antocianinas) foi realizada em coluna de fase reversa (C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex®). A fase móvel foi constituída de ácido fórmico (0,3%) e acetonitrila (1%) em água milli-Q (eluente A), e acetonitrila (1%) em metanol (eluente B) para a separação dos compostos fenólicos não antociânicos. Para a separação cromatográfica das antocianinas, a fase móvel foi constituída de ácido fórmico (1%) e acetonitrila (2%) em água milli-Q (eluente A), e ácido fórmico (1%) e acetonitrila (2%) em metanol (eluente B). O fluxo utilizado para ambas análises foi de 1 mL/min. Antes da injeção para separação cromatográfica dos compostos não antociânicos, a coluna foi equilibrada com 18% B. Após a injeção da amostra, a composição do solvente mudou para 20% B em 1 min, 43% B em 18 min, 85% em 23 min e mantida constante até 30 min. Entre as injeções, intervalos de 10 min foram feitos para reequilibrar a coluna com 18% de B. Já para análise de antocianinas a composição do solvente, foi mantida constante até 2 minutos, aumentou para 32% de B em 6 minutos e para 52% de B em 8 minutos e depois diminuiu para 18% de B em 18 minutos. Entre as injeções,

foram permitidos intervalos de 10 minutos para reequilibrar a coluna com 18% de B, conforme descrito por Inada et al., 2015. Os compostos fenólicos foram monitorados por DAD entre 190 e 550 nm.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada por calibração externa a partir da comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das amostras com os tempos de retenção dos padrões comerciais, juntamente com a comparação de seus respectivos espectros de absorção. Os resultados foram expressos em mg do composto por kg de dieta. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3 Experimento *in vivo*

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, N° CEUA 51/2016) (Anexo I).

Para este estudo foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem C57BL/6. Os animais foram adquiridos após desmame (21 dias) no Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e alocados no Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, UERJ. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura média de 23 °C (\pm 2 °C) e umidade de 60% (\pm 10%) controlada. O ciclo de sono-vigília foi de 12 h, com presença de luz a partir das 7:00 h da manhã.

Aos 90 dias, fase adulta, os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle e hiperlipídico, ingerindo durante nove semanas as seguintes dietas: grupo controle ($n = 16$): animais que receberam dieta padrão de manutenção (AIN93-M) e grupo HF ($n = 64$): animais que receberam dieta hiperlipídica (50% da energia oriunda de lipídeos, sendo 40% da energia em banha de porco e 10% em óleo de soja).

Após a 9ª semana de experimento, os animais do grupo HF foram subdivididos formando três novos grupos para que houvesse a intervenção com JPSP durante quatro semanas (Figura 11). Os grupos foram os seguintes:

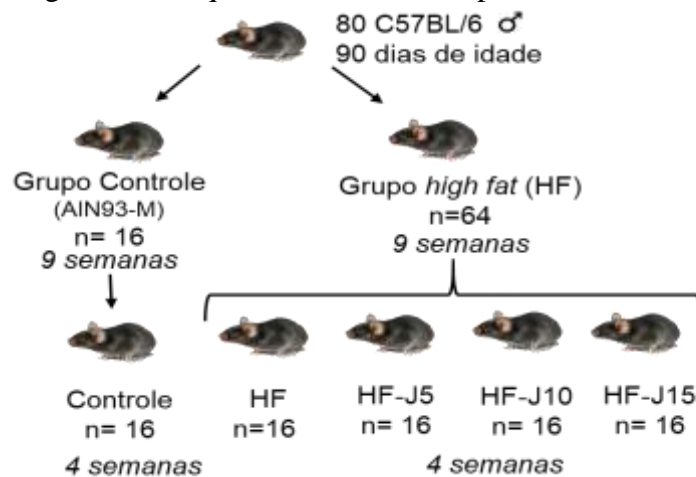
- a) Grupo HF-J5 ($n = 16$): animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 5% de JPSP.
- b) Grupo HF-J10 ($n = 16$): animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 10% de JPSP.

- c) Grupo HF-J15 ($n = 16$): animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 15% de JPSP.

Ao final do experimento *in vivo*, o projeto contou com cinco grupos experimentais, a saber:

- a) Grupo controle ($n = 16$)
 b) Grupo HF ($n = 16$)
 c) Grupo HF-J5 ($n = 16$)
 d) Grupo HF-J10 ($n = 16$)
 e) Grupo HF-J15 ($n = 16$)

Figura 11 - Esquema do desenho experimental.



Legenda: Desenho experimental do estudo. HF: animais que receberam dieta hiperlipídica (50% da energia oriunda de lipídeos, sendo 40% da energia em banha de porco e 10% em óleo de soja); HF-J5: animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 5% de JPSP; HF-J10: animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 10% de JPSP; HF-J15: animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 15% de JPSP.

4.3.1 Consumo de ração, marcadores de consumo de compostos fenólicos e evolução ponderal

A determinação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais foram mensurados em balança analítica (Shimadzu® UX 4200H). A ingestão alimentar dos animais foi acompanhada a cada dois dias, e o consumo mensurado através da subtração do resto da quantidade ofertada para cada grupo experimental. O consumo de energia foi calculado levando em consideração o consumo médio de ração em gramas e o valor energético das rações experimentais, conforme demonstrado na tabela 2. Os dados foram expressos em kilojoules (KJ). A determinação do consumo de compostos fenólicos foi realizada a partir do

consumo de ração em gramas, relacionando-o com o teor de compostos fenólicos totais ofertado nas rações experimentais, sendo os valores expressos em mg por dia por animal. A massa corpórea foi avaliada semanalmente.

A excreção de metabólitos urinários de compostos fenólicos foi avaliada como um marcador de consumo da JPSP e colaboração com o pesquisador Francisco A. Tomás-Barberán (CEBAS-CSIC, Murcia, Espanha). As amostras de urina foram coletadas em *pool* de aproximadamente 5 animais por grupo, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Antes da análise, as amostras foram reconstituídas com água Milli-Q, agitadas em vortex, centrifugadas a 14.324g por 10 min a 10°C (Sigma 1-16 K, Sigma Laborzentrifugen, Osterode e Harz, alemão) e filtradas através de um filtro PVDF de 0,22 µm (Millipore).

Os compostos foram analisados por HPLC-DAD-MS, conforme descrito por Inada et al., 2019. O sistema de cromatografia líquida incluiu um HPLC Agilent 1200, equipado com um detector de arranjo de diodos, e um espectrômetro de massas quadrupolo (6120 Quadrupole, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A separação cromatográfica dos metabólitos foi realizada usando coluna Poroshell 120 EC-C18 (2,7 µm, 100 mm × 3 mm, Agilent Technologies) acoplada a um forno a 25 °C. A fase móvel consistiu em um gradiente de ácido fórmico aquoso a 0,5% (eluente A) e acetonitrila (eluente B), com fluxo de 0,5 mL/min. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 5% do eluente B. Após a injeção da amostra, o eluente B aumentou para 18% aos 7 min, 28% aos 17 min, 50% aos 22 min e 90% aos 27 min, que foi mantido até 28 min. As condições iniciais foram restabelecidas aos 29 min e mantidas em condições isocráticas por até 33 min. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram o modo de ionização electrospray (ESI) usando nitrogênio como gás nebulizador: tensão capilar 3500 V; fluxo de gás de secagem 10 L/min; pressão do nebulizador 45 psi, temperatura de secagem 300°C. Os espectros de MS foram adquiridos no modo de ionização negativa e avaliados no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês, *selective ion monitoring*). A identificação de todos os compostos foi realizada por suas propriedades espectrais e massas moleculares. A confirmação dos metabólitos urinários derivados do ácido elágico, foi realizada por HPLC-MS/MS (*ion trap*). Após a confirmação, os metabólitos foram detectados e quantificados por HPLC-DAD a 360 nm. Os resultados foram expressos em milimol (mmol).

4.3.2 Teste oral e tolerância a glicose e eutanásia

O teste oral de tolerância a glicose (TOTG) consiste na dosagem de glicemia basal a cada 15 minutos, num período total de 2 horas após ingestão de solução glicosada. Na última

semana do período experimental, após 6 h de jejum, com início às 06:30 da manhã, os animais foram gavados com solução glicosada (0,25 g/mL). O volume de solução glicosada administrada nos animais variou em função do peso dos mesmos. As amostras de sangue foram coletadas da extremidade da cauda do camundongo e a leitura realizada com o auxílio de um medidor automático (ACCU CHEC-Active, Roche®), baseado na reação glicose-glicose oxidase. Os valores foram expressos em mg/dL.

Ao final de 13 semanas os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (thiopental, intraperitoneal, na dose de 60 mg/kg de massa corporal) para retirada de sangue, em seringa heparinizada, por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em tubo de coleta heparinizado, centrifugado, e o plasma coletado, aliquotado e armazenado a -80°C até o momento de sua utilização. Uma incisão foi realizada para retirada do fígado, além do ceco com conteúdo fecal. O fígado foi seccionado com parte fixado em formalina 10% e outra parte congelada em nitrogênio líquido, assim como o ceco com conteúdo fecal. Após congelamento em nitrogênio líquido, ambos os tecidos foram armazenados a -80°C até o momento da realização das análises.

4.3.3 Parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e citocinas inflamatórias

A avaliação dos parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e de citocinas inflamatórias foi realizada por kits comerciais, de acordo com instruções do fabricante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A homeostase da glicose foi determinada utilizando como parâmetros a glicemia de jejum (mg/dL) e a concentração sérica de insulina (*Insulin 125I Ria Kit (MP Biomedicals®*, LLC, Orangeburg, NY)). O resultado foi expresso pg/mL. A RI foi calculada pelo índice de HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) através da fórmula $HOMA-IR = ((\text{insulina de jejum (mU/mL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)}) / 405)$.

As concentrações séricas de colesterol total, TG, lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), além das enzimas hepáticas AST e ALT foram determinados por ensaios colorimétricos (Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil). A leitura foi realizada a 535 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland), sendo os resultados expressos em mg/dL.

As citocinas inflamatórias interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) foram investigadas por ensaios de ELISA (*Mouse*

IL-6 ELISA Kit PicoKine™ Info At A Glance e Mouse TNF Alpha ELISA Kit PicoKine™ Info At A Glance). O resultado de ambas as citocinas foi expresso pg/mL.

O LPS também foi avaliado por ensaio de ELISA (*mouse lipopolysaccharides ELISA* - CUSABIO technology LLC, Houston, Texas, EUA), com o resultado expresso em EU/mL.

4.3.4 Marcadores de dano oxidativo

4.3.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. O MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por DRAPER et al., 1993 e adaptada para avaliação em fígado.

Foram utilizados 200 µL de homogenato de fígado para 400 µL de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio e adicionou 500 µL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100 °C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura a 532 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

4.3.4.2 Carbonilação de proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para gerar produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH). O conteúdo de carbonil é determinado usando um coeficiente 22.0000 Molar⁻¹em nmol/mg de proteínas (LEVINE et al., 1990).

De forma sucinta, foram utilizados duas alíquotas de 100 µL do homogenato do tecido hepático. Para cada uma das alíquotas, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 2000 rpm e temperatura de

28°C, sendo o sobrenadante descartado. Uma parte das amostras (série A) foi incubada com 500 µL de DNPH e outra parte (série B) incubada com 500 µL de HCl 2 M por 10 minutos a 28°C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de TCA 10% em ambas as séries de amostras e as mesmas foram centrifugadas por 2 minutos a 2000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Os *pelletes* foram então lavados com solução de etanol:acetato de etila (1:1; v/v) e centrifugados por 2 minutos a 2000 rpm e temperatura de 28°C. Após descarte do sobrenadante, as etapas de lavagem com solução de etanol:acetato de etila e subsequente centrifugação foram repetidas mais duas vezes. Todas as amostras foram adicionadas de 1 mL de guanidina 6 M, com posterior centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos a 28°C. A leitura foi realizada a 370 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

4.3.5 Atividade antioxidante enzimática

4.3.5.1 Atividade da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formando oxigênio molecular e água. A atividade enzimática foi avaliada pelo consumo de H₂O₂ feito pela enzima obtida do lisado das células, por espectrofotometria no comprimento de onda de 240 nm (Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk). Foram utilizados 60 µL de amostra de homogenato de fígado em cubetas de quartzo separadas. As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H₂O₂ (0,16%). A concentração de H₂O₂ foi avaliada durante 60 segundos (GREENE et al., 1999).

4.3.5.2 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A GPx é uma enzima selênio-dependente, localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial, que catalisa a redução do H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H₂O e álcool, usando a glutathiona (GSH) como doadora de elétrons (BURGOYNE et al., 2013). A atividade da GPx foi medida em função da taxa de decaimento da NADPH, por espectrofotometria (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

Foram utilizados 20 µL de amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas. Em cada cubeta, foi adicionado 1800 µL de tampão fosfato (PBS), glutathiona reduzida (GSH;

2 mM), glutationa redutase (GR; 0,11 mg/mL), azida sódica (0,065 mg/mL). Cada cubeta foi incubada por 10 minutos e, em seguida, foram adicionados 200 µL de NADPH (10 nM) e novamente cada cubeta foi incubada por 3 minutos. Posterior a este tempo, foram pipetados 200 µL de peróxido de hidrogênio H₂O₂ e cada cubeta lida por 5 minutos a 340 nm (Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk).

4.3.6 Concentração de triglicerídeos e colesterol hepático

O conteúdo total de TG e colesterol hepáticos foi avaliado por adaptação da metodologia previamente descrita por FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957. Resumidamente, 50 mg de fígado foram homogeneizados em álcool isopropílico (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugados. O conteúdo de TG e de colesterol do sobrenadante foi quantificado com kit colorimétrico de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin, BH, MG, Brasil). A leitura foi realizada a 490–540 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland).

4.3.7 Histologia do tecido hepático

Amostras de fígado de cinco camundongos foram fixadas em formalina (1,27 mol/L formaldeído 0,1 M tampão fosfato-salina, pH 7,2) e embebidos em parafina para realização de cortes não seriados de 5 µm. Os cortes foram alocados em lâminas histológicas para a coloração com hematoxilina/eosina (BANCROFT; STEVENS, 1991). A presença de fibrose hepática foi avaliada pela coloração com Picrosirius red (Sigma-Aldrich, Saint Louis USA). Foram capturadas 15 fotografias aleatórias por animal para avaliar a esteatose e a arquitetura do fígado. Todas as imagens foram escolhidas ao acaso (formato JPG, cor 36-bit, 1360x1024 pixels) com câmera Olympus DP71 e com microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japão). O percentual de esteatose hepática e o de binucleação foram quantificados nos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, utilizando o software Stepanizer, utilizando o sistema de 36 pontos. O v/v de esteatose foi determinado através do número de pontos que marcavam gotículas de gordura dividido pelo número de pontos totais x 100. Já o percentual de binucleação foram contabilizados o número de núcleos totais e binucleações.

Para imunofluorescência, as lâminas silanizadas foram incubadas em tampão de citrato (pH 6,0, 60°C, 20 min), bloqueadas com tampão de glicina (2% de glicina em PBS/BSA) e incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo primário de α-actina (Biotecnologia Santa

Cruz) 1:50 em 1% de PBS/BSA. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico conjugado aos fluorocromos IgG-Alexa 546 (anti-mouse) (Invitrogen, CA, EUA). As lâminas foram lavadas com PBS, montadas com *Slow Fade Antifade* (Invitrogen[®], Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA); analisados e fotografados usando um microscópio confocal de varredura a laser (LEICA[®], TCS, SPE, LEICA Microsystems, USA).

4.3.8 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal do conteúdo cecal dos animais foi avaliada em colaboração com o pesquisador Benjamim P. Willing (Universidade de Alberta, Canadá). O DNA total foi extraído usando o kit QIAamp PowerFecal DNA (QIAGEN, Valencia, CA), seguindo instruções do fabricante. O sequenciamento de extremidade pareada foi realizado usando a Plataforma Illumina MiSeq (2 x 300 ciclos; Illumina Inc San Diego, CA), conforme descrito anteriormente (FORGIE et al., 2019). Em linhas gerais, bibliotecas de amplicons foram construídas de acordo com o protocolo de Illumina (preparação de biblioteca para sequenciamento metagenômico 16S) que amplifica a região V3-V4 do gene de rRNA 16S (iniciadores: *forward*: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAC GGGNGGCWGCAG-3'; *reverse*: 5'-3 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC AGGACTACHVGGGTATCTAATCC'). A qualidade das leituras foi avaliada pelo o FastQC, sendo o FASTTX-Toolkit utilizado para aparar e filtrar leituras de baixa qualidade. O algoritmo PANDAsq foi usado para mesclar leituras de sequência de extremidade de par. As sequências mescladas foram desreplicadas, e os *singletons* removidos com VSEARCH e filtrados para quimeras usando USEARCH (banco de dados "gold.fa"), criando um banco de dados de referência (EDGAR et al., 2011; ROGNES et al., 2016). As leituras mescladas originais foram mapeadas para esse banco de dados de referência usando o comando `usearch_global` (VSEARCH) com 97% de identidade e a tabela OTU (do inglês *operational taxonomia unit*) foi criada usando o script "uc2otutab.py". A taxonomia foi atribuída usando a configuração padrão do kit de ferramentas QIIME 1.9.1 (*Quantitative Insight into Microbial Ecology*) (CAPORASO et al., 2010; MCDONALD et al., 2012; WANG et al., 2007). As análises de diversidade foram feitas através do comando 'core_diversity_analyses.py' e normalizadas para uma profundidade de amostragem definida pela amostra com o menor número de leituras (> 1500). *PD whole tree* (distância taxonômica), índices alfa de diversidade Chao1 (riqueza de espécies menos abundantes), Simpson (uniformidade das espécies) e Shannon (riqueza das espécies) calculados com 'alpha_diverstiy.py' e plotados

com R usando ggplot2. A significância estatística para a diversidade alfa foi determinada no QIIME usando o teste t padrão de duas amostras com permutações de Monte Carlo (999) para calcular o valor P não paramétrico.

A beta diversidade foi calculada usando a métrica de distância UniFrac. As variantes *weighted* (quantitativa) e *unweighted* (qualitativa) do UniFrac são amplamente utilizadas na ecologia microbiana, onde a primeira é responsável pela abundância de organismos observados, enquanto a última considera apenas sua presença ou ausência. Além disso, uma análise de coordenadas de princípio (PCoA) foi plotada usando o pacote phoseoseq em R (MCMURDIE; HOLMES, 2013). A significância do cluster foi determinada usando a função 'betadisper' para dispersão e a função 'pairwiseAdonis.dm' para orientação, conforme determinado pelas distâncias de UniFrac (ANDERSON, 2006; MARTINEZ, 2017). O *heatmap* da abundância foi visualizado em R com a função 'pheatmap' e diferenças significativas de gênero foram determinadas por ANOVAs permutacionais corrigidas com a função 'Tukey' para múltiplas comparações.

O PCR em tempo real foi realizado utilizando o PercfeCTa SYBR Green Supermix (Quantabio®) com os *primers* em um sistema em tempo real ABI StepOne™, de acordo com ciclos de tempo e temperatura pré-estabelecidos. Os *primers* para bactérias totais (Tabela 4) foram usados para quantificar a carga bacteriana do ceco e foram normalizados com o peso do conteúdo cecal usado para isolar o DNA bacteriano.

Tabela 4: Lista de *primers* para PCR em tempo real.

Genes alvos	Sequências oligonucleotídicas (5' – 3')	Comprimento do produto
Bactéria total	F: CGGYCCAGACTCCTACGGG R: TTACCGCGGCTGCTGGCAC	179-210 ¹

Nota: A temperatura de anelamento usada para todos os genes foi de 60°C. ¹Referência: (LEE; ZO; KIM, 1996).

4.4 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Na determinação da evolução ponderal até a 9ª semana de experimento foi utilizado o teste t para determinar as diferenças de massa corporal entre os grupos controle e hiperlipídico. Para análise de dados referente aos cinco grupos experimentais, a análise de variância *one-way* ANOVA foi utilizada com significância estatística para $p < 0,05$. As diferenças entre os grupos, quando aplicáveis, foram avaliadas pelo pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software GraphPadPrism versão 6 (La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de compostos fenólicos das rações adicionadas de farinha de jabuticaba

Oito compostos fenólicos foram identificados e quantificados nas rações experimentais (Tabela 5). Como esperado, o teor de compostos fenólicos presentes nas rações foi proporcional ao aumento do percentual de acréscimo da farinha de jabuticaba. O ácido gálico e o elágico foram os compostos fenólicos mais abundantes, correspondendo, em média, a 47,5% e a 48,5% do teor total.

Tabela 5 - Perfil de compostos fenólicos nas rações experimentais adicionadas de farinha de jabuticaba.

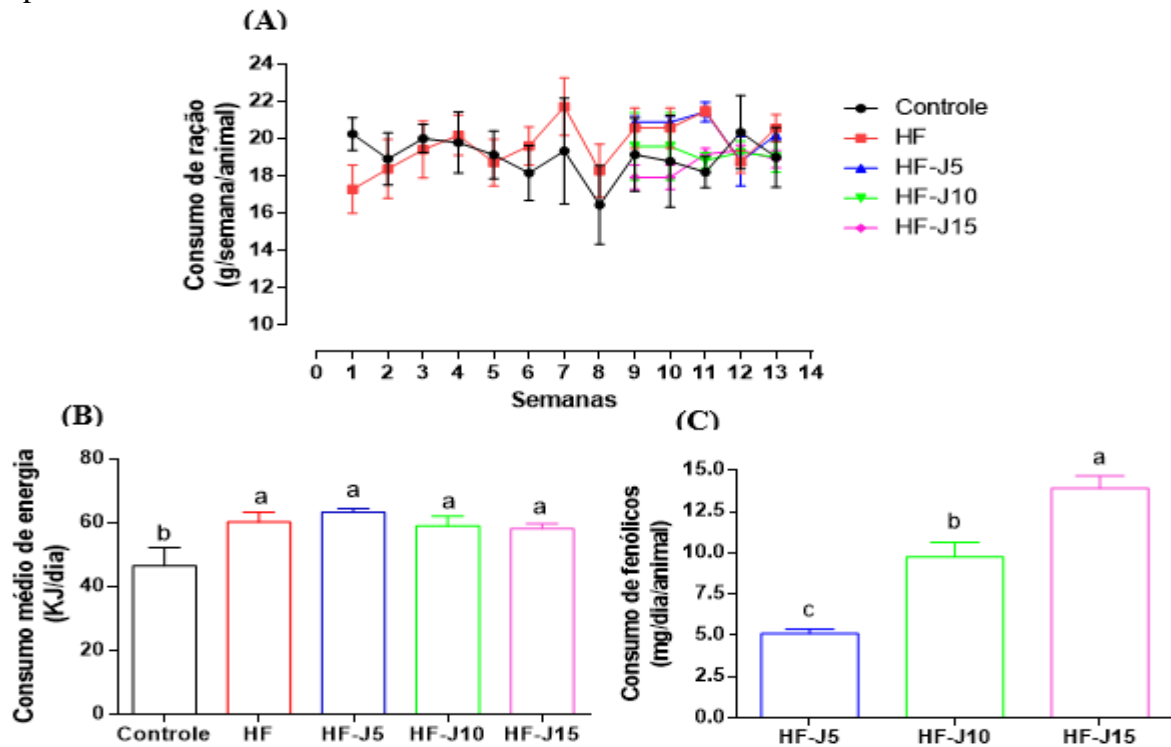
Composto (mg/kg de dieta)	Grupos experimentais		
	HF-J5	HF-J10	HF-J15
Ácido gálico	824,7	1783,7	2276,0
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	27,3	53,2	65,7
Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	8,3	11,2	24,8
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	29,7	36,8	51,5
Ácido elágico	833,0	1532,0	2799,4
Quercetina	1,6	4,6	5,9
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	5,4	24,8	49,9
Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,0	2,7	4,8
Total	1730,3	3449,2	5278,2

Legenda: HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP.

5.2 Consumo de ração e marcadores de consumo de ácido elágico

Ao longo do período experimental os animais consumiram em torno de 2,73 g de ração por dia (Figura 12A), sem diferença significativa ao longo das treze semanas. No entanto, o consumo energético dos animais que receberam HFD foi cerca de 30% superior quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 12B). O consumo diário de compostos fenólicos variou de 5,1 mg (HF-J5) a 13,9 mg (HF-J15) (Figura 12C), sendo o consumo proporcional à adição de JPSP nas rações ($p < 0,0001$).

Figura 12 - Consumo de ração em gramas, energia (KJ) e compostos fenólicos nos grupos experimentais.



Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão ($n=10$). (A) consumo semanal de ração, (B) Consumo médio diário de energia, (C) Consumo diário de compostos fenólicos. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

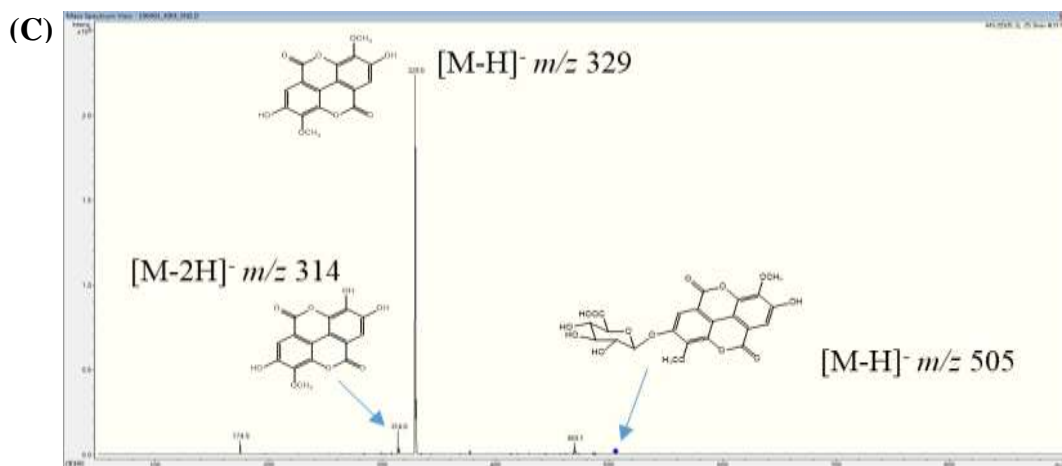
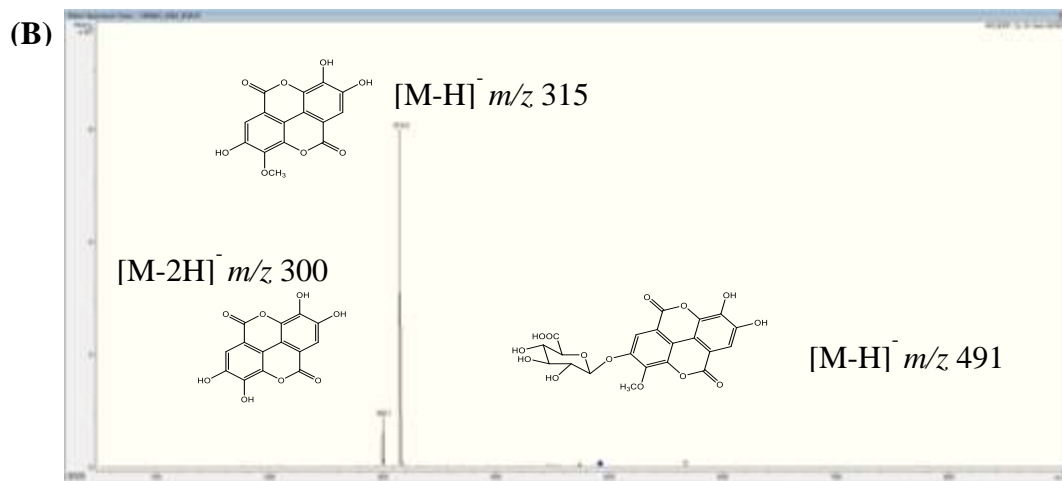
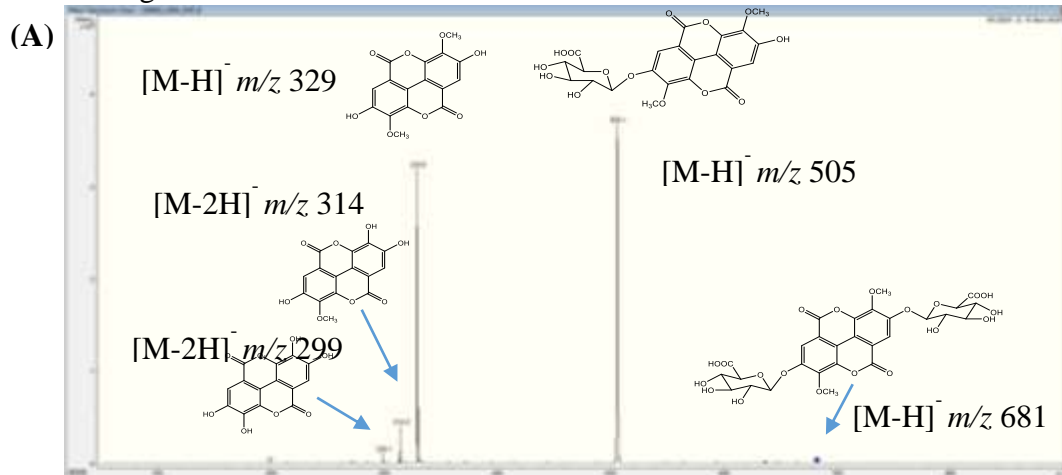
Os metabólitos do ácido elágico identificados na urina dos animais foram avaliados como marcador do metabolismo destes nos grupos experimentais. Como esperado, não foram detectados metabólitos urinários derivados do ácido elágico nos grupos controle e HF. Após o consumo de JPSP foram identificados cinco metabólitos derivados do ácido elágico (Tabela 6 e Figuras 13 e 14) nos três grupos experimentais. A excreção de metabólitos totais do ácido elágico nos grupos HF-J10 e HF-J15 foi aproximadamente 3 vezes superior quando comparado ao grupo HF-J5 ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 6 - Identificação dos metabólitos urinários dos compostos fenólicos derivados do ácido elágico.

Metabólitos urinários	Tempo de retenção (DAD) ¹	λ_{\max} ² (nm)	Massa do composto (m/z)	Fragmentos (MS/MS)
Ácido elágico dimetil diglucuronídeo	7,478	246,364	681	505, 329 , 314, 299
Ácido elágico metil glucuronídeo (isômero 1)	10,718	250,364	491	315 , 300
Ácido elágico metil glucuronídeo (isômero 2)	11,201	246,372	491	315 , 300
Ácido elágico dimetil glucuronídeo (isômero 1)	11,584	248,370	505	329 , 314
Ácido elágico dimetil glucuronídeo (isômero 2)	11,896	242,360	505	329 , 314

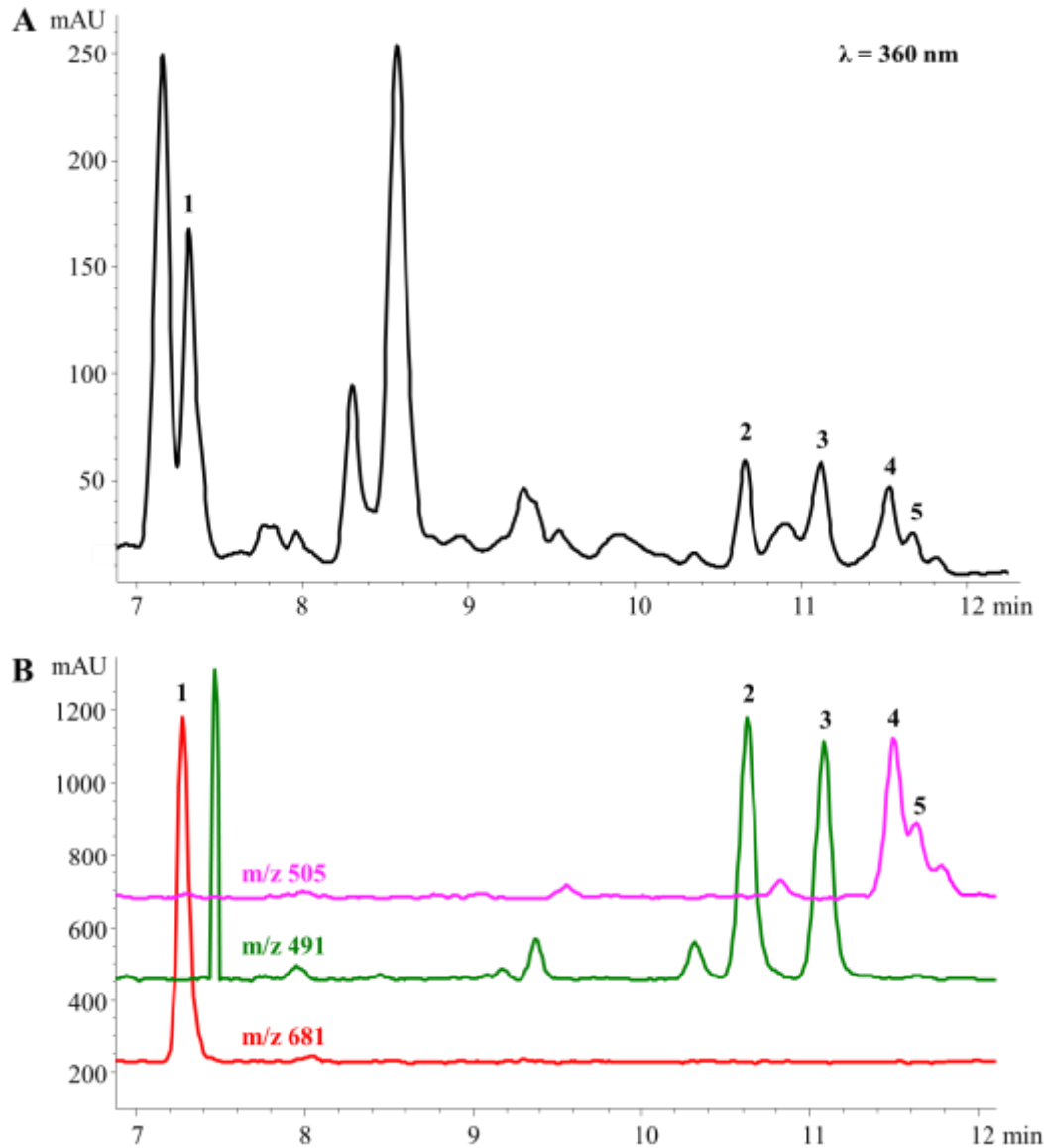
Legenda: ¹ detector de arranjo de diodo; ² comprimento de onda máximo. Os principais fragmentos (MS/MS) estão destacados em negrito.

Figura 13 - Padrão de fragmentação MS² de metabólitos urinários de derivados de ácido elágico.



Legenda: Compostos identificados: (A) ácido elágico dimetil diglucuronídeo ($m/z = 681$); (B) ácido elágico metil glucuronídeo ($m/z = 491$), (C) ácido elágico dimetil glucuronídeo ($m/z = 505$).

Figura 14 - Cromatograma representativo dos metabólitos urinários derivados do ácido elágico.



Legenda: (A) cromatograma (HPLC-DAD) e (B) cromatograma (HPLC-MS) de uma amostra representativa de urina. Compostos identificados: (1) ácido elágico dimetil diglucuronídeo, (2) ácido elágico metil glucuronídeo (isômero 1), (3) ácido elágico metil glucuronídeo (isômero 2), (4) ácido elágico dimetil glucuronídeo (isômero 1), (5) ácido elágico dimetil glucuronídeo (isômero 2).

Tabela 7 - Metabólitos urinários derivados do ácido elágico nos grupos experimentais.

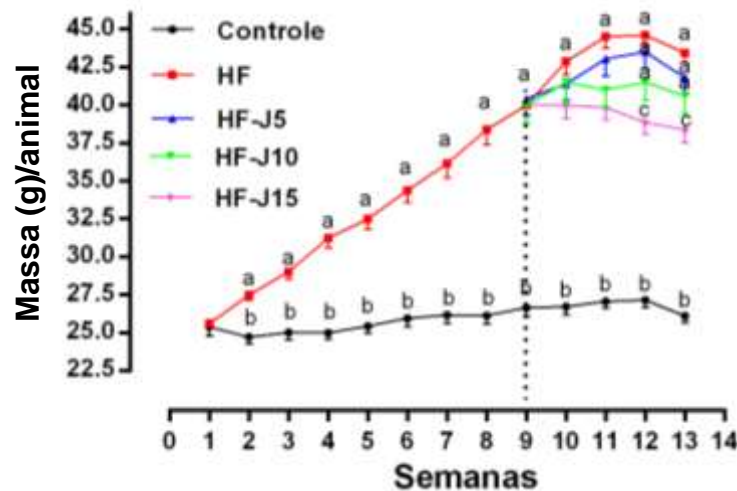
Metabólitos urinários (mmol)	Controle	HF	HF-J5	HF-J10	HF-J15
Ácido elágico dimetil diglucuronídeo	ND ¹	ND	0,72 ± 0,02 ^c	4,90 ± 0,43 ^a	1,85 ± 0,27 ^b
Ácido elágico metil glucuronídeo (isômero 1)	ND	ND	0,41 ± 0,18 ^b	2,35 ± 0,38 ^a	2,51 ± 0,43 ^a
Ácido elágico metil glucuronídeo (isômero 2)	ND	ND	1,54 ± 0,15 ^c	2,57 ± 0,34 ^b	3,04 ± 0,03 ^a
Ácido elágico dimetil glucuronídeo (isômero 1)	ND	ND	1,15 ± 0,64 ^b	3,37 ± 0,23 ^a	3,47 ± 0,12 ^a
Ácido elágico dimetil glucuronídeo (isômero 2)	ND	ND	0,10 ± 0,07 ^b	0,78 ± 0,05 ^a	0,81 ± 0,15 ^a
Somatório de metabólitos totais	ND	ND	3,83 ± 0,77 ^b	13,96 ± 0,67 ^a	11,69 ± 0,4 ^a

Legenda: ¹ ND = não detectado. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.3 Efeito do consumo da farinha de jabuticaba sobre a evolução ponderal

No início do período experimental os animais não apresentaram diferença estatística em sua massa corporal (Figura 15). No entanto, a partir da 2ª semana até o término do período experimental (13ª semana), a massa corporal do grupo HF foi significativamente maior quando comparada ao controle, representando aumento de 11,1% (2ª semana; $p < 0,05$) e 66,3% (13ª semana; $p < 0,0001$). Os grupos HF-J5 e HF-J10 não apresentaram atenuação do ganho de massa corpórea dos animais, sendo o ganho de massa igual ao do grupo HF. No entanto, ao final do período experimental, observou-se que o grupo HF-J15 apresentou menor percentual (11%) de ganho de massa corporal em relação ao grupo HF.

Figura 15 - Evolução ponderal dos grupos experimentais.



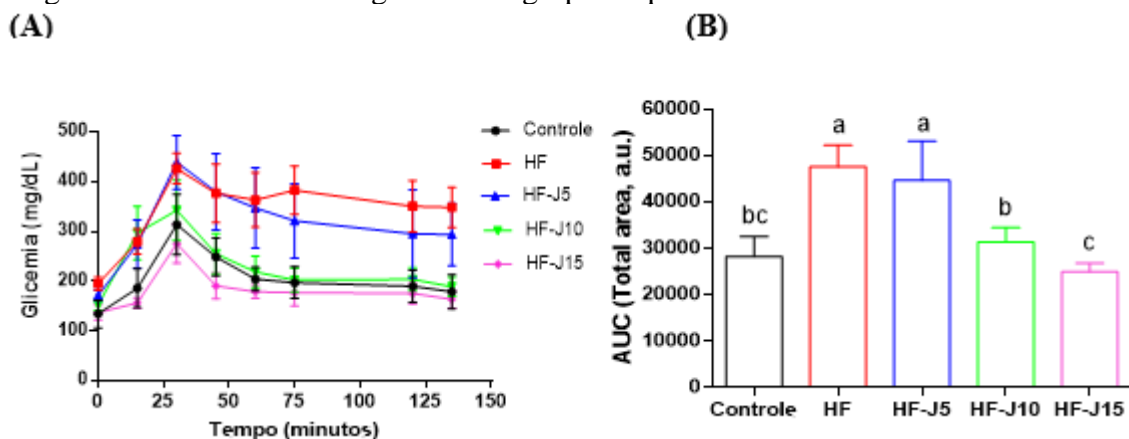
Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=10). HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais. Até a 9ª semana de experimento foi utilizado teste t para comparação dos grupos controle e HF. A partir da 10ª utilizou-se *one-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.4 Efeito do consumo de JPSP sobre tolerância a glicose

Os grupos experimentais apresentaram comportamentos distintos em relação a tolerância oral à glicose ao longo do tempo de 120 min (Figura 16). Observou-se que os grupos HF e HF-J5 apresentaram maior intolerância oral à glicose em relação ao grupo controle, perdurando até 120 minutos após administração da solução glicosada ($p < 0,001$). Por outro lado, os grupos HF-J10 e HF-J15 foram capazes de manter as concentrações séricas de

glicose similares a do grupo controle em todos os tempos avaliados (Figura 16A). Ressalta-se a similaridade da área sob a curva (AUC do inglês, *area under the curve*) entre os grupos HF-J10 e HF-J15 com o grupo controle (Figura 16B). Os grupos HF e HF-J5 apresentaram a maior AUC entre os grupos experimentais, sendo esses valores significativamente maiores quando comparado ao grupo controle (68,3% e 57,9%, respectivamente). Ao comparar a AUC dos grupos HF-J10 e HF-J15 com o grupo HF observou-se menores valores (34% e 47,5%, respectivamente). O mesmo comportamento, de menor AUC, foi observado ao comparar os grupos HF-J10 e HF-J15 com o grupo HF-J5 (29,7% e 44,0%, respectivamente) (Figura 16B).

Figura 16 - Sensibilidade a glicose nos grupos experimentais.



Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=10). (A) glicemia (mg/dL) pelo tempo (minutos), (B) área sob a curva do teste oral de tolerância a glicose. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.5 Efeito do consumo da farinha de jabuticaba sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos, de lipídeos e marcadores inflamatórios

O grupo HF apresentou desequilíbrio na homeostase da glicose, apresentando maiores concentrações séricas de glicose (45%), insulina (80,7%) e do indicador HOMA IR (163%) em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 8). Quando comparado com o grupo HF, a concentração de glicose sérica foi menor nos grupos HF-J5 (11,2%), HF-J10 (21,8%) e HF-J15 (29,7%). Adicionalmente, observou-se menor concentração de insulina nos grupos HF-J5, HF-J10 e HF-J15 (28,8%, 34,2% e 26,6%, respectivamente) quando comparados ao grupo HF, bem como menores valores de HOMA-IR (36,8%, 48,8% e 48,4%, respectivamente). Vale ressaltar que o grupo controle apresentou os menores valores de insulina sérica e que os grupos HF-J10 e HF-J15 apresentaram resultados similares ao do grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e citocinas inflamatórias nos grupos experimentais.

	Controle	HF	HF-J5	HF-J10	HF-J15
Homeostase da glicose					
Glicemia (mg/dL)	134,2 ± 20,9 ^c	194,7 ± 13,3 ^a	172,9 ± 11,3 ^b	152,2 ± 10,6 ^c	136,8 ± 15,3 ^c
Insulina (pg/mL)	454,2 ± 50,7 ^c	821,0 ± 110,1 ^a	584,3 ± 46,1 ^{bc}	540,1 ± 48,6 ^{bc}	602,2 ± 71,9 ^b
HOMA-IR	0,98 ± 0,2 ^d	2,58 ± 0,18 ^a	1,63 ± 0,11 ^b	1,32 ± 0,09 ^c	1,33 ± 0,15 ^c
Metabolismo lipídico					
Triglicerídeos (mg/dL)	46,6 ± 9,6	44,7 ± 12,0	33,0 ± 14,4	43,1 ± 12,8	44,9 ± 14,4
Colesterol (mg/dL)	70,1 ± 19,1 ^c	166,9 ± 17,9 ^a	174,5 ± 16,7 ^a	162,2 ± 26,3 ^{ab}	138,5 ± 13,9 ^b
LDL-c (mg/dL)	16,8 ± 4,8 ^{ab}	18,9 ± 3,9 ^a	16,4 ± 4,1 ^{ab}	10,8 ± 4,0 ^b	10,3 ± 2,6 ^b
Citocinas inflamatórias					
IL-6 (pg/mL)	16,07 ± 4,2 ^c	70,23 ± 8,3 ^a	30,59 ± 4,1 ^b	14,83 ± 2,5 ^c	14,84 ± 3,4 ^c
TNF-α (pg/mL)	3340 ± 1053 ^b	8441 ± 1573 ^a	6107 ± 1018 ^a	3727 ± 941,7 ^b	3643 ± 1187 ^b

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão (n=5-8). HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Ao avaliar os marcadores bioquímicos do metabolismo de lipídeos, observou-se que o grupo HF apresentou maior concentração de colesterol total (138%; $p < 0,0001$) em relação ao grupo controle (Tabela 8). Apenas o grupo HF-J15 apresentou menor concentração de colesterol total quando comparado aos grupos HF e HF-J5 (17% e 20,6%, respectivamente; $p < 0,05$). No entanto, esses valores não se igualaram aos do grupo controle. Em relação à concentração de LDL-c, os grupos HF-J10 e HF-J15 apresentaram concentrações plasmáticas reduzidas em relação ao grupo HF (42,8% e 45,5%, respectivamente, $p < 0,001$).

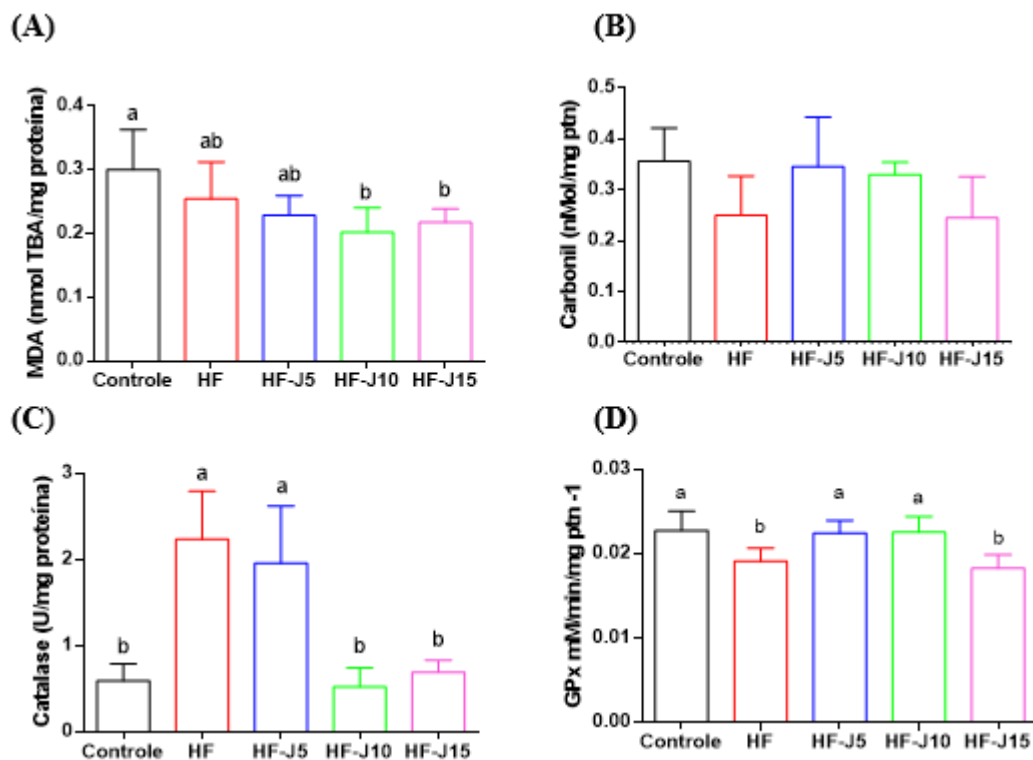
O grupo HF apresentou maiores concentrações séricas de IL-6 (337%) e TNF-α (152%) em relação ao grupo controle. Os grupos HF-J5, HF-J10 e HF-J15 apresentaram menores concentrações plasmáticas de IL-6 (56,4%, 78,8% e 78,8%, respectivamente; $p < 0,001$) quando comparado ao grupo HF (Tabela 8). Os valores de IL-6 dos grupos HF-J10 e HF-J15 se igualaram aos valores do grupo controle. Menores concentrações plasmáticas de TNF-α foram observadas somente nos grupos HF-J10 e HF-J15 (55,8% e 56,8%, respectivamente) em relação ao grupo HF ($p < 0,01$), sendo que esses valores se equipararam com os do grupo controle.

5.6 Efeito do consumo da farinha de jabuticaba sobre marcadores de estresse oxidativo hepático

A avaliação de marcadores de dano oxidativo hepático demonstrou que os grupos HF-J10 e HF-J15 apresentaram menores concentrações de malondialdeído quando comparado ao grupo controle (33,3% e 30%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 17A). No entanto, esses

valores foram similares aos do grupo HF e HF-J5. Não foi observada diferença em relação à carbonilação de proteínas (Figura 17B). Em relação à atividade enzimática antioxidante, observou-se que a atividade da catalase foi maior nos grupos HF e HF-J5 quando comparados aos grupos controle (26,4% e 30,2%, respectivamente). Observou-se menor atividade de catalase nos grupos HF-J10 (23,2% e 26,5%, respectivamente) e HF-J15 (30,8% e 35,2%, respectivamente) quando comparados ao grupo HF (Figura 17C). Contudo, a atividade da GPx foi 16% menor no grupo HF quando comparado ao grupo controle, ao passo que os grupos HF-J5 e HF-J10 apresentaram maior atividade antioxidante desta enzima em relação ao grupo HF (17,4% e 18,1%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 17D), sendo similares ao grupo controle.

Figura 17 - Marcadores de estresse oxidativo hepático nos grupos experimentais.



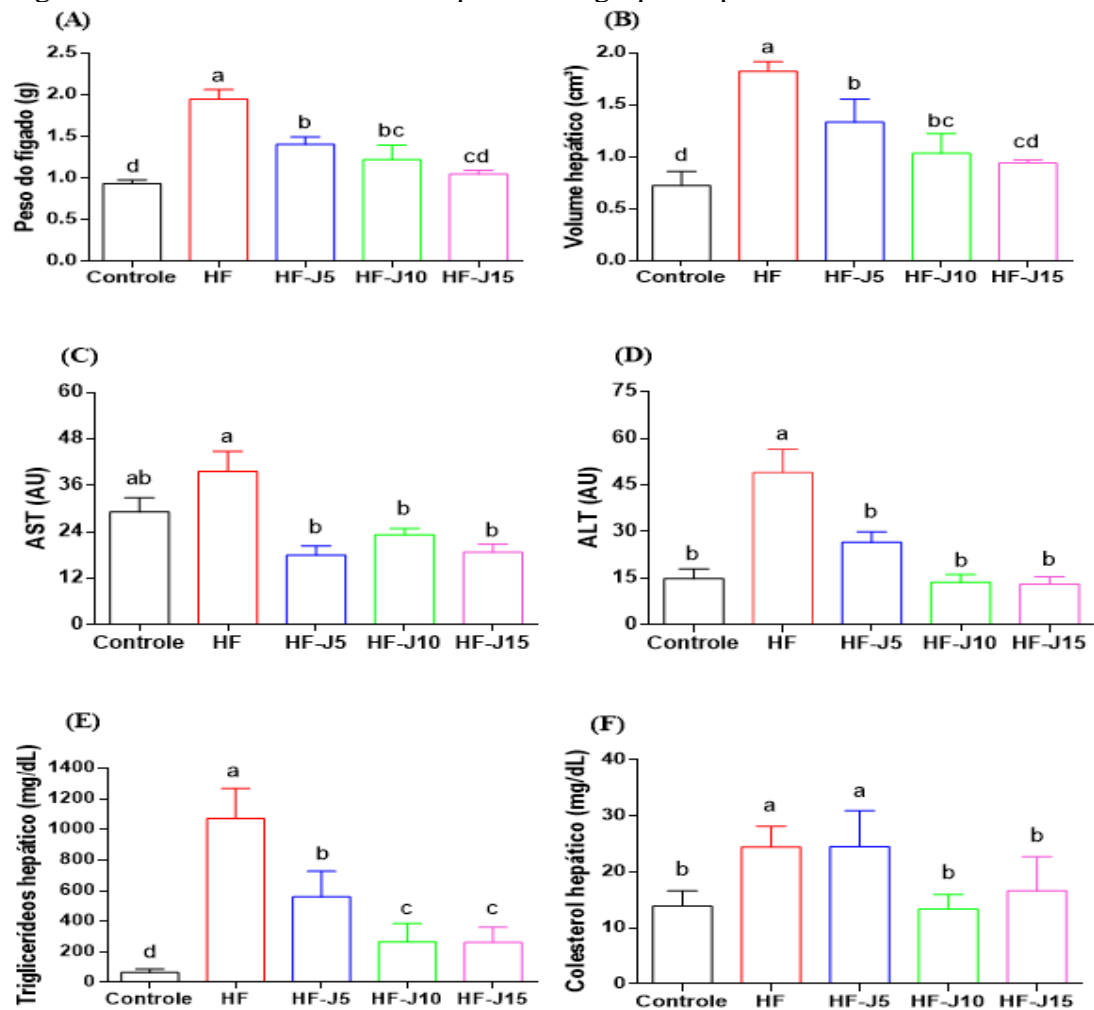
Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=8). (A) Peroxidação lipídica, (B) Carbonilação de proteína, (C) Catalase e (D) Glutationa peroxidase (GPx). HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.7 Efeito do consumo da farinha de jabuticaba no remodelamento hepático

A avaliação de parâmetros envolvidos no dano hepático mostrou que o consumo de HFD (grupo HF) ocasionou maior peso (108,7%) e volume hepático (151,8%), aumento de

enzimas marcadores de lesão hepática AST (35,6%) e ALT (229,3%), além de ter propiciado o maior acúmulo de lipídeos no fígado (TG (1.500%) e colesterol (76,0%)), quando comparado ao grupo controle (Figura 18). Após consumo de JPSP os grupos HF-J5, HF-J10 e HF-J15 tiveram menor peso (27,8%, 37,2%, 46,2%, respectivamente) e volume hepático (26,8%, 43,2% e 48,3%, respectivamente) em relação ao grupo HF (Figura 18A e B). Observou-se, ainda, menor concentração de enzimas hepáticas AST nos grupos HF-J5 (54,4%), HF-J10 (41,2%), HF-J15 (52,5%) e ALT nos grupos HF-J5 (45,8%), HF-J10 (71,9%), HF-J15 (73,2%) em relação ao grupo HF (Figura 18C e D). Seguindo a mesma tendência, a concentração de TG e colesterol hepático foi menor nos grupos HF-J5 (47,7%), HF-J10 (75,2%) e HF-J15 (75,5%); e HF-J10 (45,3%) e HF-J15 (31,9%), respectivamente, em relação ao grupo HF (Figura 17E e F).

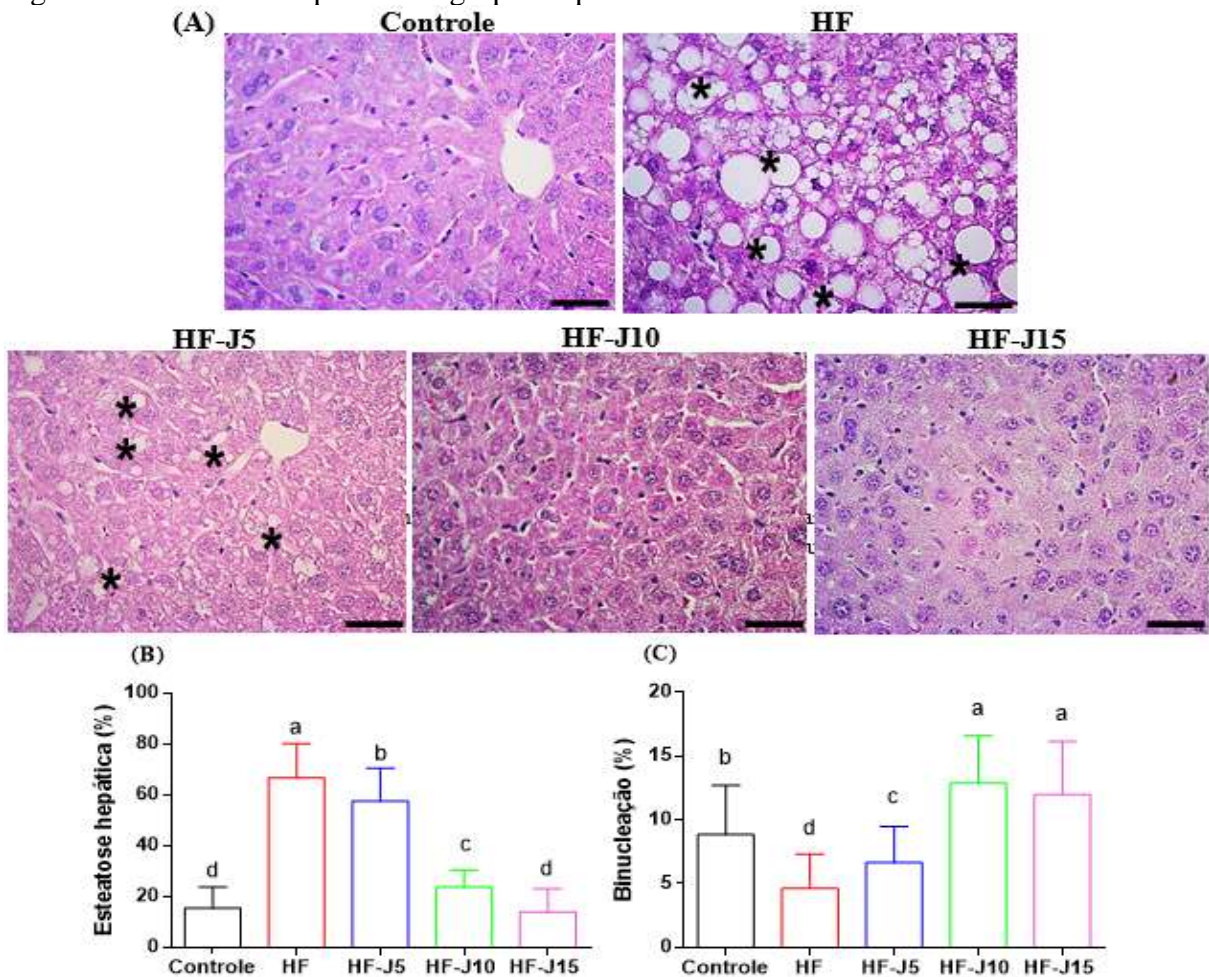
Figura 18 - Marcadores de dano hepático nos grupos experimentais.



Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=5-8). (A) peso do fígado, (B) volume hepático, (C) AST, (D) ALT, (E) triglicerídeos hepáticos, (F) colesterol hepático. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

O tecido hepático do grupo HF apresentou características morfológicas de maior acúmulo lipídico, com presença de macro e microvesículas e parênquima hepático desorganizado, ocasionando perda da estrutura do tecido (Figura 19A). O grupo HF-J5 apresentou microvesículas de gordura, porém com um parênquima hepático mais organizado quando comparado ao HF. Já nos grupos HF-J10 e HF-J15, praticamente não foi observado deposição de lipídeo, acrescido de uma arquitetura hepática semelhante ao grupo controle (Figura 19A). O consumo de JPSP durante 4 semanas foi capaz de atenuar o acúmulo de lipídeos hepáticos em comparação com o grupo HF, diminuindo a porcentagem de esteatose hepática nos grupos HF-J5 (19,3%), HF-J10 (66,3%) e HF-J15 (81,5%) (Figura 19B). A porcentagem de binucleação aumentou nos grupos HF-J5 (43,3%), HF-J10 (177%) e HF-J15 (157,7%) em comparação ao grupo HF (Figura 19C).

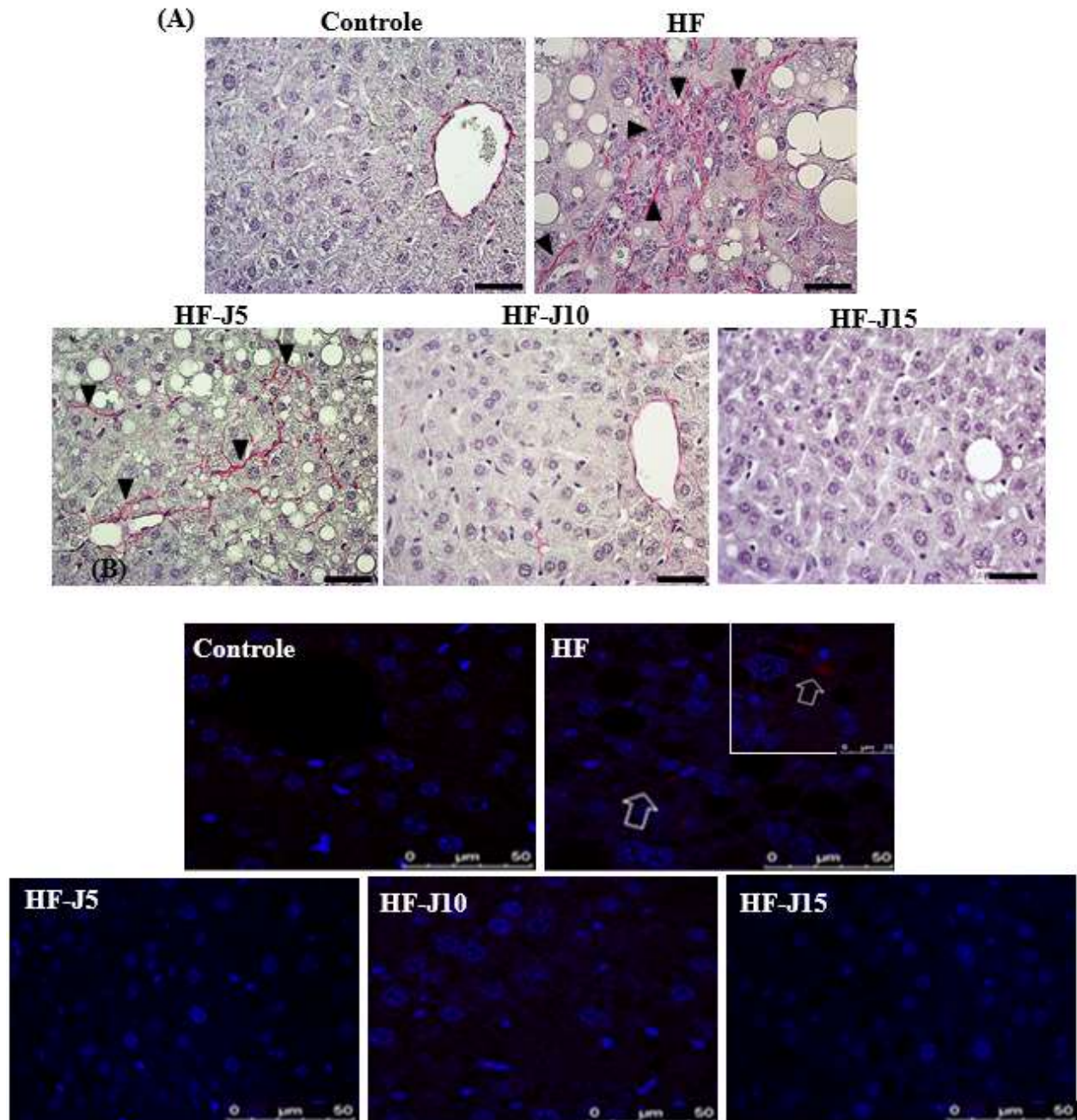
Figura 19 - Esteatose hepática nos grupos experimentais.



Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=5). (A) Prancha de cortes histológicos do tecido hepático (asterisco indica presença de gotículas de gordura), barra de calibração = 40 μ m, (B) percentual de esteatose hepática, (C) percentual de binucleação. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Houve maior deposição de fibras de colágeno no grupo HF quando comparado aos grupos HF-J10 e HF-J15 pela coloração picosirius (Figura 20A), corroborando com o resultado da imunofluorescência que apresentou marcação de α -actina evidenciada no grupo HF, o que indica deposição de colágeno no tecido hepático desse grupo (Figura 20B).

Figura 20 - Fibrose hepática nos grupos experimentais.

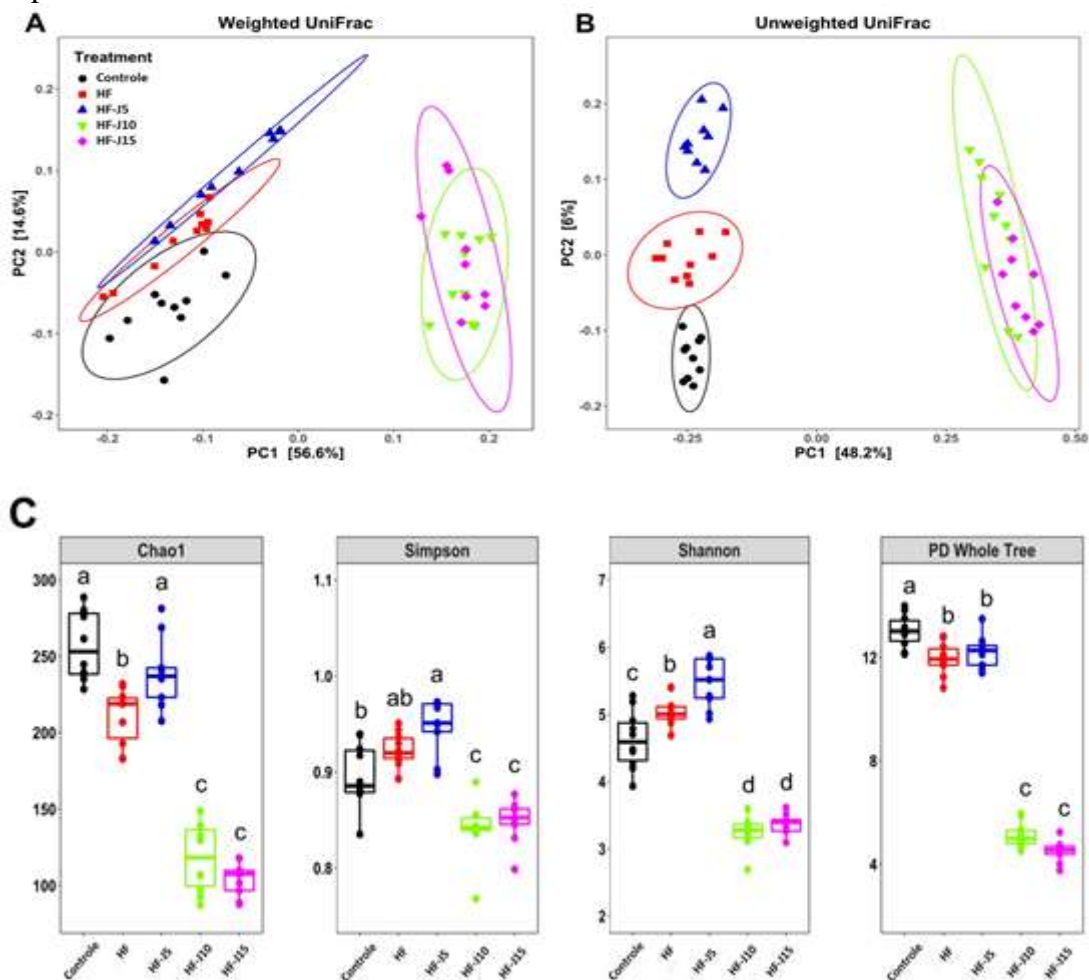


Legenda: (A) Prancha de picosirius (Cabeça de seta indica deposição de fibras de colágeno). (B) Prancha de cortes histológicos para avaliação de fibrose hepática (Setas representam marcação de para alfa-actina de músculo liso indicando fibrose por ativação de células estreladas). HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP.

5.9 Efeito do consumo da farinha de jabuticaba na composição da microbiota intestinal

A figura 21 apresenta os gráficos de análise de coordenadas da métrica de distância UniFrac e suas variantes *weighted* e *unweighted*, em que a primeira é responsável pela abundância de organismos observados, enquanto a última considera apenas sua presença ou ausência. Desta forma, as variantes indicam agrupamentos distintos de comunidades microbianas dependentes da intervenção alimentar. Os índices de alfa diversidade Chao 1 que avalia a riqueza das espécies menos abundantes, Simpson que remete a uniformidade de espécies encontradas, Shannon que avalia a riqueza das espécies e a diversidade filogenética (*PD whole tree*) mostram uma diminuição não só na riqueza e na uniformidade das espécies, mas também nas distâncias taxonômicas, principalmente nos grupos HF-J10 e HF-J15.

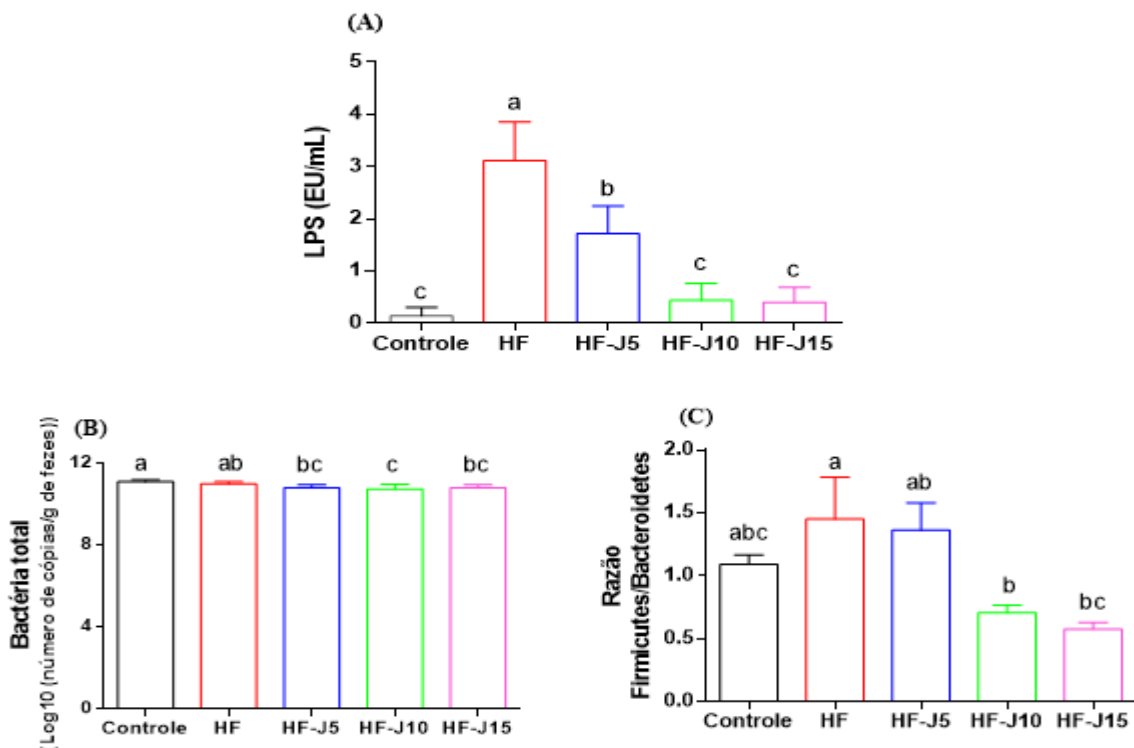
Figura 21 - Análise de coordenadas principais e índices de alfa diversidade nos grupos experimentais.



Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão ($n=8$). (A) *weighted* e (B) *unweighted*, (C) índices de alfa diversidade (Chao 1, Simpson e Shannon) e *PD whole tree*. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Adicionalmente, observou-se que a concentração de LPS foi aproximadamente 3x vezes maior no grupo HF quando comparado ao grupo controle. O consumo de JPSP promoveu menor concentração desta endotoxina nos grupos HF-J5 (44,8%), HF-J10 (85,8%) e HF-J15 (87,1%) quando comparado ao grupo HF (Figura 22A), sendo que os grupos HF-J10 e HF-J15 apresentaram concentrações séricas de LPS semelhantes ao grupo controle. Foi também observada redução (2,2%) no número de bactérias totais no grupo HF-J10 em comparação com o grupo HF (Figura 22B). A razão entre os filos *Firmicutes/Bacteroidetes* foi semelhante estatisticamente entre os grupos HF e controle. Já os grupos HF-J10 e HF-J15 apresentaram menor razão entre estes dois filos microbianos (51,1% e 60%, respectivamente) quando comparados ao grupo HF, demonstrando maior abundância de *Bacteroidetes* em detrimento de *Firmicutes* (Figura 22C).

Figura 22 - LPS plasmático, número de bactérias totais e razão firmicutes/bacteroidetes nos grupos experimentais.

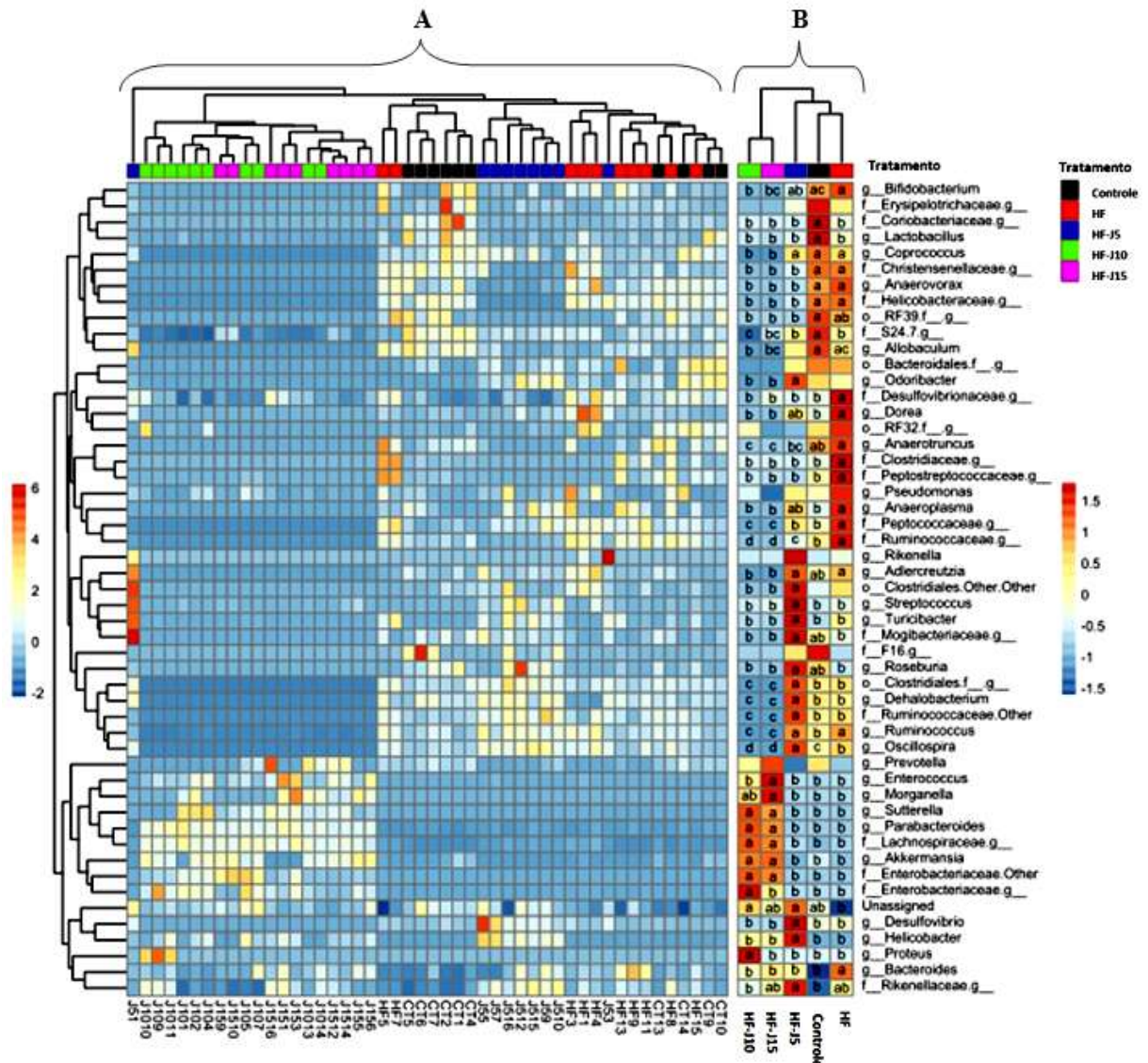


Legenda: Dados expressos em média \pm desvio padrão ($n=8$). (A) LPS, (B) bactéria total e (C) razão *firmicutes/bacteroidetes*. HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais (*One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

O nível de abundância das bactérias está destacado, sendo as mais abundantes em vermelho e as menos abundantes em azul (Figura 23). A beta diversidade evidenciou o impacto do consumo da JPSP na estrutura da comunidade microbiana, principalmente nos grupos HF-J10 e HF-J15. De maneira complementar, os dados descritos na tabela 9 apresentam as análises estatísticas da beta diversidade, na qual destaca-se seis filos

predominantes: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*. O agrupamento de HF-J10 e HF-J15 corresponde à redução de membros de algumas famílias, principalmente *Bifidobacteriaceae*, *S24-7*, *Mogibacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Clostridiaceae*, *Dehalobacteriaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Helicobacteraceae*, *Anaeroplasmataceae*, em relação ao grupo HF. Em contraste, as famílias *Lachnospiraceae* e *Enterobacteriaceae*, além dos gêneros *Parabacteroides sp*, *Sutterella sp*, *Allobaculum sp*, *Akkermansia sp*, apresentaram aumento em seu percentual nos grupos HF-J10 e HF-J15 quando comparados ao grupo HF ($p<0,05$).

Figura 23: Heat map do conteúdo cecal nos grupos experimentais.



Legenda: A coluna a direita (**B**) representa a média dos animais em cada grupo experimental ($n=8-9$). A escala de cores representa a abundância relativa da classificação taxonômica, onde maior abundância (tons mais quentes, vermelho) e menor abundância (tons mais frios, azul). CT: controle; HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos experimentais ($p<0,05$).

Tabela 9 - Perfil microbiano do conteúdo cecal nos grupos experimentais.

Taxonomia		Controle		HF		HF-J5		HF-J10		HF-J15		p-valor
Filo	Ordem/Família	(%)	sem	(%)	sem	(%)	sem	(%)	sem	(%)	sem	
<i>f__Actinobacteria</i>		0,61 *	0,19	0,24	0,03	0,10	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
	<i>f__Bifidobacteriaceae</i>	0,10	0,05	0,13	0,02	0,03	0,01	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Coriobacteriaceae</i>	0,50	0,15	0,11	0,01	0,07	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
<i>f__Bacteroidetes</i>		35,06	1,68	34,00	3,38	37,28	3,61	41,18	2,14	46,03 *	2,95	0,670
	<i>o__Bacteroidales;f__</i>	2,16	0,76	1,94	0,97	1,37	0,30	0,01	0,00	0,01	0,00	0,093
	<i>f__[Odoribacteraceae]</i>	1,54	0,68	1,01	0,31	2,14	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,027
	<i>f__[Paraprevotellaceae]</i>	2,13	0,26	0,80	0,29	0,33	0,21	1,84	0,94	2,97	1,68	1,000
	<i>f__Bacteroidaceae</i>	2,46 *	0,43	7,22	1,67	5,54	1,18	5,15	0,88	5,86	0,85	0,771
	<i>f__Porphyromonadaceae</i>	1,84	0,39	1,92	0,30	1,74	0,26	24,47 *	2,00	21,18 *	1,60	0,000
	<i>f__Rikenellaceae</i>	3,52	0,60	8,13	1,09	12,82	1,38	6,53	1,60	7,82	1,53	0,111
	<i>f__S24-7</i>	21,40 *	1,98	12,98	1,06	13,32	0,87	3,17 *	0,49	8,18	1,48	0,000
<i>f__Firmicutes</i>		37,33	1,62	39,79	3,15	45,59	3,37	28,24 *	1,55	25,87 *	1,73	0,000
	<i>f__Lactobacillaceae</i>	0,40 *	0,09	0,09	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,000
	<i>f__Turicibacteraceae</i>	0,00	0,00	0,19	0,07	0,45	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,001
	<i>o__Clostridiales;f__</i>	12,33	0,85	13,82	1,10	20,65	2,10	0,01	0,00	0,01	0,00	0,000
	<i>f__[Mogibacteriaceae]</i>	0,07	0,01	0,08	0,01	0,03 *	0,01	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Christensenellaceae</i>	0,08	0,01	0,08	0,02	0,02*	0,01	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Clostridiaceae</i>	0,05 *	0,01	0,43	0,14	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Dehalobacteriaceae</i>	0,22	0,02	0,19	0,04	0,36 *	0,03	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Lachnospiraceae</i>	3,95	0,36	5,64	0,86	6,99	0,44	28,11 *	1,54	25,74 *	1,72	0,000
	<i>f__Peptococcaceae</i>	0,09 *	0,01	0,23	0,03	0,14 *	0,03	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Peptostreptococcaceae</i>	0,05 *	0,01	0,17	0,06	0,00 *	0,00	0,01 *	0,00	0,00 *	0,00	0,003
	<i>f__Ruminococcaceae</i>	6,56 *	0,54	11,09	0,78	9,31	0,66	0,05 *	0,02	0,06 *	0,02	0,000
	<i>o__Clostridiales;Other</i>	0,01	0,00	0,02	0,01	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,008
	<i>f__Erysipelotrichaceae</i>	13,50	2,37	7,75	1,93	7,51	3,14	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
<i>f__Proteobacteria</i>		23,34	1,98	24,96	1,55	16,28 *	3,46	15,44 *	1,66	12,33 *	1,29	0,015
	<i>f__Alcaligenaceae</i>	0,06	0,02	0,01	0,00	0,02	0,01	4,22 *	1,32	3,42 *	0,63	0,001
	<i>f__Desulfovibrionaceae</i>	2,20	0,15	3,37	0,34	6,86 *	1,47	0,93	0,14	1,14	0,19	0,000
	<i>f__Helicobacteraceae</i>	20,97	1,90	21,45	1,41	9,36 *	2,75	4,28 *	0,91	3,39 *	0,39	0,000
	<i>f__Enterobacteriaceae</i>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	5,96 *	0,78	4,38 *	0,86	0,000
<i>f__Tenericutes</i>		0,10 *	0,05	0,39	0,11	0,25	0,10	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>f__Anaeroplasmataceae</i>	0,08 *	0,05	0,39	0,11	0,25	0,10	0,00 *	0,00	0,00 *	0,00	0,000
	<i>o__RF39;f__</i>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
<i>f__Verrucomicrobia</i>		3,02	0,81	0,43	0,18	0,02	0,01	14,83	1,89	15,50	4,11	0,001
	<i>f__Verrucomicrobiaceae</i>	3,02	0,81	0,43	0,18	0,02	0,01	14,83 *	1,89	15,50 *	4,11	0,006
<i>f__Não classificados¹</i>		0,25	0,04	0,17	0,02	0,32	0,04	0,30	0,03	0,26	0,02	0,184

Legenda: Resultados apresentados como percentual da abundância média da taxonomia atribuída nos filios e no nível de ordem ou família de acordo com a identificação taxonômica realizada pelo sequenciamento (n=8-9/grupo). HF: hiperlipídico; HF-J5: hiperlipídico com 5% de JPSP; HF-J10: hiperlipídico com 10% de JPSP; HF-J15 hiperlipídico com 15% de JPSP. Membros da comunidade microbiana que foram <0,1% foram removidos. Asterisco indica significância de $p < 0,05$ comparada ao grupo HF, com teste de Tukey. ¹Ordem ou família não classificados.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a indução da obesidade foi realizada a partir da HFD enriquecida com banha de porco (rica em ácidos graxos saturados), correspondendo a 50% da energia total derivada de lipídeos. Nesse sentido, o balanço energético positivo estimulou o ganho de massa corporal, ocasionou a hiperglicemia e a RI, além de aumentar o colesterol total e o LDL-c e citocinas inflamatórias. Adicionalmente, este modelo foi utilizado como promotor da DHGNA, sendo observado maior deposição de lipídeos no tecido hepático, além de fibras de colágeno. Estas alterações fisiopatológicas estão associadas ao maior influxo de ácidos graxos livres (AGL) na circulação, derivados do remodelamento do TA (SAMUEL; SHULMAN, 2012; STINKENS et al., 2015). Assim, esses resultados mostram o estabelecimento de parâmetros metabólicos alterados em camundongos obesos induzidos por dieta, estando de acordo com estudos que utilizaram modelo experimental semelhante (DA SILVA et al., 2018; HU et al., 2020).

Produtos à base de plantas, incluindo aqueles obtidos a partir de frutas brasileiras, já foram associados a efeitos benéficos à saúde em diferentes modelos experimentais *in vivo* de obesidade induzida por dieta (DA SILVA-MAIA et al., 2019; DA SILVA et al., 2018; DRAGANO et al., 2013). Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar a influência do tratamento da casca e da semente de jabuticaba em modelo murino de obesidade (C57BL6) induzida por dieta associando suas implicações metabólicas com a microbiota intestinal.

No ensaio experimental o tratamento com 15% de farinha de jabuticaba atenuou o ganho de massa corporal dos animais. Observou-se, ainda, que o consumo de JPSP promoveu melhora significativa em parâmetros metabólicos associados à obesidade, como a inflamação, a dislipidemia e a RI. Além disso, a intervenção com JPSP diminuiu a concentração de MDA e aumentou a atividade da enzima antioxidante GPx. Ademais, observou-se o efeito benéfico do consumo de JPSP sobre o remodelamento hepático, com menor percentual de esteatose hepática e menor deposição de fibras de colágeno nos camundongos, possivelmente relacionados não só a redução da massa e do volume hepático, bem como menor concentração de TG e colesterol. Associados às análises descritas anteriormente, a menor concentração plasmática de AST e ALT demonstrou que o consumo de JPSP não promoveu toxicidade hepática, mesmo em sua maior concentração. Adicionalmente, a determinação dos metabólitos urinários derivados do ácido elágico consistiu um importante marcador do consumo de fenólicos evidenciando cinco metabólitos derivados do ácido elágico conjugados

ao ácido glucurônico. Observou-se ainda o efeito antimicrobiano e alterações na comunidade microbiana, bem como diminuição na concentração de LPS plasmático, principalmente nos grupos que consumiram 10% e 15% de JPSP.

A similaridade na ingestão de ração entre os grupos HF e os grupos que consumiram a farinha de jabuticaba sugere que a atenuação do ganho de peso no grupo HF-J15 é um efeito do consumo da farinha de jabuticaba, dado que foi o grupo que recebeu a maior concentração de fenólicos. O consumo de compostos fenólicos pode levar ao menor aproveitamento energético da dieta, prevenindo ou atenuando o ganho de massa corporal em animais que consumiram HFD, ocasionando, conseqüentemente, maior excreção fecal de lipídeos (BATISTA et al., 2013; DA SILVA et al., 2018; MOURA et al., 2018).

Matrizes alimentares ricas em compostos fenólicos já foram descritas como benéficas sobre a lipotoxicidade, ocasionada pelo remodelamento do TA, diminuindo a inflamação, a RI e a dislipidemia, atuando, portanto, em parâmetros que predis põe DHGNA, diabetes, doenças cardiovasculares e outras (RABADAN-CHÁVEZ et al., 2016; SHI et al., 2017). O consumo de JPSP diminuiu a concentração de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) no plasma, mesmo com consumo concomitante de HFD. Um dos mecanismos pelo qual este desfecho pode ser explicado é pela habilidade dos compostos fenólicos atuar de maneira direta em vias de sinalização como a do NF κ B, fator de transcrição envolvido na produção de citocinas inflamatórias, modulando de forma negativa a via, diminuindo a transcrição e tradução destas citocinas (WU et al., 2016; YIN; WU, 2017).

A RI é uma etapa crucial no desenvolvimento e progressão da DHGNA por promover maior influxo de AGL no fígado, sendo associada ao aumento do DNL, maior lipólise no TA, excedendo a capacidade de exportação de TG ou β -oxidação hepática, favorecendo o acúmulo de TG nos hepatócitos e remodelamento hepático (BRADBURY; BERK, 2004; BUGIANESI et al., 2010; CHAO et al., 2019). No presente estudo, observou-se menores concentrações plasmáticas de colesterol (HF-J15) e LDL-c (HF-J10 e HF-J15), bem como de colesterol e TG hepáticos nesses mesmos grupos experimentais, sugerindo que a farinha de jabuticaba possui ação hipolipemiante. Estes achados podem estar associados não apenas à diminuição de peso e volume hepático, mas também à diminuição do percentual de esteatose hepática (HF-J10 e HF-J15). Além disso, o consumo de JPSP aumentou a porcentagem de binucleação, sugerindo potencial auto-regeneração hepática (MIYAOKA et al., 2012; MIYAOKA; MIYAJIMA, 2013). Estes resultados corroboram com a literatura, a qual já evidencia que a intervenção com a casca de jabuticaba e/ou com o extrato da casca de jabuticaba apresentou efeito

benéfico sobre a esteatose hepática e no processo inflamatório (BATISTA et al., 2018; LAMAS et al., 2018; LENQUISTE et al., 2019).

A presença de colesterol no fígado já foi descrita como um indicador de inflamação, que associado à DHGNA, pode culminar na ativação de células estreladas, promovendo maior deposição de fibras de colágeno no fígado, um marcador da progressão da DHGNA (WOUTERS et al., 2008). A presença de fibras colágenas, evidenciadas nos cortes histológicos hepáticos do grupo HF, foi atenuada pelo tratamento com JPSP (HF-J10 e HF-J15), corroborando com estudo que utilizou extrato do caroço do açaí, rico em compostos fenólicos (SOARES et al., 2017), como tratamento para animais obesos (ROMÃO et al., 2020). Assim, os resultados acerca do remodelamento hepático demonstram o potencial efeito da JPSP, rica em compostos fenólicos no controle da DHGNA, comorbidade associada à obesidade.

O estresse oxidativo é um dos múltiplos *hits* associados à progressão da DHGNA, uma vez que o estímulo excessivo à β -oxidação favorece a superprodução de ROS, diminuindo a atividade enzimática antioxidante e promovendo maior dano oxidativo (YANG et al., 2019). Assim, o estresse oxidativo hepático também foi avaliado, sendo observado que o consumo da HFD não ocasionou maior dano oxidativo neste tecido. Entretanto, a intervenção com 10% e 15% de JPSP diminuiu a concentração de MDA, marcador de dano em lipídeos, em relação ao grupo controle. Adicionalmente, observou-se que o consumo de JPSP não influenciou a atividade de CAT, mas promoveu aumento na atividade de GPx (HF-J5 e HF-J10). Frente ao impacto do consumo da HFD, esperava-se encontrar a ocorrência do estresse oxidativo hepático, seguido do reestabelecimento da homeostase redox, promovido pela intervenção com JPSP com ou sem envolvimento no mecanismo de defesa antioxidante enzimático conforme demonstrado por alguns autores (BATISTA et al., 2018; LENQUISTE et al., 2015; QUATRIN et al., 2018).

Altas concentrações séricas de AST e ALT referem-se à injúria nos hepatócitos, além de serem considerados biomarcadores de hepatotoxicidade (KANG, 2013; WANG et al., 2019). O consumo de JPSP promoveu menor concentração destes marcadores de alteração hepática, indicando menor lesão nos hepatócitos e a não toxicidade hepática. Estes resultados vão ao encontro da literatura, que também desmontaram níveis séricos reduzidos destas enzimas hepáticas em animais tratados com compostos fenólicos (DA SILVA-MAIA et al., 2019; DA SILVA et al., 2018; FREITAS et al., 2016).

Ainda no cenário de parâmetros metabólicos alterados pela obesidade induzida por HFD, a hiperglicemia e a RI também são uma consequência da lipotoxicidade (VIRTUE;

VIDAL-PUIG, 2010). Estudo paralelo, em nosso grupo de pesquisa, aponta que a hiperleptinemia e a hipoadiponectinemia causada pelo consumo da HFD foi normalizada pelo consumo de JPSP (dados não publicados). As alterações metabólicas, em decorrência do tecido adiposo disfuncional, têm sido associadas à supressão da ação da insulina (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016; YADAV et al., 2013). Desta forma, associa-se a normalização dos níveis plasmáticos destas adipocinas à restauração da homeostase da glicose, pelo consumo de JPSP, com consequente normalização dos níveis de glicose e restauração da sensibilidade à insulina, além de uma possível modulação sobre a regulação do apetite, a termogênese e o gasto energético (YADAV et al., 2013). Adicionalmente, o consumo de casca de jabuticaba já foi associado à modulação de proteínas da via de sinalização de insulina, tais como IR/IRS-1/AKT/FoxO, a nível hepático e de tecido adiposo, porém sem efeito na tolerância à glicose (DRAGANO et al., 2013). Já Lamas e colaboradores (2018) observaram aumento na expressão de p-IRS-1, a nível hepático, com maior tolerância à glicose em camundongos idosos tratados com casca de jabuticaba (LAMAS et al., 2018).

Coletivamente, os desfechos encontrados sugerem que o consumo de JPSP possui interação molecular atuando em vias do metabolismo de lipídeos e de carboidratos, promovendo atenuação de alterações metabólicas comumente associadas à obesidade como inflamação, RI, dislipidemia e DHGNA. Os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos de compostos fenólicos na DHGNA já foram associados à menor expressão de proteínas envolvidas na via DNL (SREBP1c, FAS e ACC) em estudos que utilizaram farinha de semente de açaí (DA SILVA et al., 2018), extrato de semente de açaí (DE OLIVEIRA et al., 2015) e, até mesmo, o ácido elágico na sua forma isolada (ZHANG et al., 2019a). Adicionalmente, as mesmas matrizes alimentares já foram associadas a menor expressão da enzima HMG CoA-R, considerada um ponto limitante na síntese do colesterol e maior expressão dos transportadores ABCG5 e ABCG8, cuja função é remover o excesso de colesterol corporal (DA SILVA et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2015). Sugere-se, então, que os compostos fenólicos presente na JPSP possam exercer mecanismos moleculares semelhantes aos descritos na literatura, culminando nos desfechos metabólicos até então apresentados.

A compreensão acerca da biodisponibilidade dos compostos fenólicos e de seus metabólitos vem se tornando cada vez mais relevante para a completa elucidação de suas funções fisiológicas (LAVEFVE; HOWARD; CARBONERO, 2020). A investigação acerca da metabolização de compostos fenólicos de JPSP neste modelo experimental foi realizada pela primeira vez no presente trabalho. Os metabólitos encontrados após consumo de JPSP

indicam associação entero-hepática, haja vista que todos os metabólitos foram derivados do ácido glucurônico, corroborando com estudos que identificaram estes metabólitos não só na urina, como também no plasma em diferentes modelos animais (ESPÍN et al., 2007; MILALA et al., 2017). O ácido elágico livre pode ser parcialmente absorvido na porção inicial do intestino delgado, sendo rapidamente metabolizado para fornecer éteres metílicos e dimetílicos e conjugados do ácido glucurônico (KANG et al., 2016a; TOMÁS-BARBERAN; ESPÍN; GARCÍA-CONESA, 2009).

Adicionalmente, estudo recente realizado por Inada e colaboradores (2019) descreveu, pela primeira vez, o metabolismo dos compostos fenólicos após o consumo da JPSP em seres humanos (INADA et al., 2019). Os autores demonstraram diferenças na metabolização desses compostos decorrentes do estado nutricional (indivíduos com sobrepeso/obesidade *versus* eutróficos). O principal achado é que os indivíduos com sobrepeso/obesidade apresentaram menor prevalência do metabotipo zero (não produtor de urolitinas) e maior prevalência do metabotipo B (excretor de urolitina B) em comparação aos indivíduos eutróficos. Essas diferenças na distribuição de metabotipo estão provavelmente associadas à composição da microbiota intestinal. No presente estudo não foram identificadas urolitinas, principal classe de metabólitos do ácido elágico em humanos, na urina dos animais. No entanto, outros cinco metabólitos derivados do ácido elágico foram identificados e quantificados. Apesar de ainda não terem sido completamente identificados os microrganismos responsáveis pela completa biotransformação dos elagitânicos em urolitinas (urolitinas A e B), algumas espécies bacterianas intestinais já foram descritas como produtoras de urolitinas intermediárias como a *Gordonibacter urolithinifaciens* e a *Gordonibacter pamelaee*, pertencentes ao filo *Actinobacteria*, em humanos (SELMA et al., 2014a, 2014b). Desta forma, a baixa abundância relativa deste filo sugere que não houve colonização do intestino por estas bactérias, o que pode estar associada à ausência de urolitinas no presente estudo.

A microbiota intestinal, mais precisamente as alterações que afetam a composição do microbioma do intestino, é um fator que tem sido associado à fisiopatologia da DHGNA. Já foi observado que portadores de DHGNA apresentam aumento significativo da permeabilidade intestinal favorecendo a translocação de LPS do lúmen intestinal para a circulação, promovendo a endotoxemia metabólica (JI et al., 2019; MIELE et al., 2009). A melhora da integridade da barreira intestinal já foi associada ao aumento da abundância relativa de *Akkermansia muciniphila* (PIERRE et al., 2013) que pode ser promovida pela ingestão de matrizes alimentares ricas em compostos fenólicos (ANHÊ et al., 2016; BALDWIN et al., 2016). Desta forma, a maior abundância da *Akkermansia sp.*, nos grupos

HF-J10 e HF-J15, pode estar associada à menor circulação de LPS, ocasionando menor concentração plasmática desta endotoxina, atenuando, assim, o remodelamento hepático, por menor ativação de células de Kupffer e células estreladas, intimamente associadas à inflamação e a fibrose hepática, respectivamente (JI et al., 2019). Assim, o consumo de JPSP pode ter contribuído para os potenciais efeitos benéficos como a diminuição da RI, da dislipidemia, de citocinas inflamatórias, do remodelamento hepático e da endotoxemia metabólica, por alterações na comunidade do microbioma intestinal (ANHÊ et al., 2015; EVERARD et al., 2013; ROOPCHAND et al., 2015; SHIN et al., 2014).

Compostos fenólicos oriundos de diferentes matrizes alimentares já foram descritos com potencial efeito antimicrobiano, sendo capazes, portanto, de atuar na comunidade microbiana presente no hospedeiro (FORGIE et al., 2019; JURGOŃSKI et al., 2017). A atividade antimicrobiana exercida por compostos fenólicos afeta diretamente a composição da microbiota por inibição de grupos bacterianos individuais (ENGELS; SCHIEBER; GÄNZLE, 2011), o que pode estar associado à redução da alfa diversidade após consumo de JPSP (HF-J10 e HF-J15), ao agrupamento distinto de HF-J10 e HF-J15 na métrica UniFrac (*weighted* e *unweighted*), indicando alteração na beta diversidade.

No presente estudo a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* foi determinada como parâmetro do status da obesidade e da alteração da microbiota do trato intestinal (CHENG et al., 2018). O aumento desta razão já foi demonstrado em modelo experimental de obesidade (ANHÊ et al., 2018; FORGIE et al., 2019), e, apesar de ainda controverso, um dos possíveis mecanismos que favorece o ganho de peso nesta comorbidade é o maior aproveitamento energético da dieta (SANMIGUEL; GUPTA; MAYER, 2015; TU et al., 2020; TURNBAUGH et al., 2006). A menor razão entre estes dois filos nos grupos que consumiram JPSP (HF-J10 e HF-J15), refere-se a um aumento na abundância relativa de *Bacteroidetes* (família *Porphyromonadaceae*) em detrimento do filo *Firmicutes*, principalmente da ordem *Clostridiales* e das famílias *Ruminococcaceae* e *Erysipelotrichaceae*, corroborando com estudos que utilizaram compostos fenólicos como forma de intervenção (JIN et al., 2018; ROOPCHAND et al., 2015). Ademais, a diminuição desta razão reforça a implicação de que o consumo de fenólicos da matriz alimentar estudada pode proporcionar menor aproveitamento energético da dieta, contribuindo para atenuação do ganho de peso no HF-J15, grupo que consumiu maior teor destes compostos.

Cabe ressaltar, que apesar da elucidação incompleta das funções de membros do filo *Firmicutes*, existem evidências que indicam a presença de bactérias produtoras de butirato, utilizado, preferencialmente, para nutrição dos colonócitos, como a família *Lachnospiraceae*

que teve maior abundância nos grupos tratados com JPSP (HF-J10 e HF-J15) (TAN et al., 2014; VACCA et al., 2020; ZHANG et al., 2019b). Por outro lado, os membros do filo *Bacteroidetes*, mais abundante nos grupos HF-J10 e HF-J15, estão associados à produção de acetato e proprionato (BAOTHMAN et al., 2016; TAN et al., 2014). Assim, pela maior abundância relativa de classificações taxonômicas associadas à produção de SCFA após consumo de JPSP, em conjunto com o aumento na concentração de SCFA já demonstrado pelo consumo de casca de jabuticaba (BATISTA et al., 2018), sugere-se que JPSP possa contribuir para formação de SCFA nos grupos HF-J10 e HF-J15. Um dos mecanismos propostos para os efeitos benéficos promovidos pela formação de SCFA é o seu potencial de atuar na proteína AMPK, aumentando sua atividade, afetando assim o metabolismo de hepático de lipídeo e de glicose (DEN BESTEN et al., 2013; HERNÁNDEZ et al., 2019).

CONCLUSÃO

O consumo de farinha de jabuticaba, rica em compostos fenólicos, promoveu alterações na diversidade da microbiota intestinal de camundongos obesos, além de ter favorecido a diminuição da endotoxemia metabólica, a atenuação do remodelamento hepático, à melhora na homeostase da glicose, da dislipidemia e da inflamação, sem conferir hepatotoxicidade. Desta forma, a mudança observada na comunidade microbiana intestinal e os efeitos locais e sistêmicos associados ao consumo da farinha de jabuticaba são consistentes com a proteção de alterações dos parâmetros metabólicos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.
- AFSHIN, A. et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 2017.
- AILHAUD, G. et al. Temporal changes in dietary fats: Role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 3, p. 203–236, 2006.
- ALBILLOS, A.; DE GOTTARDI, A.; RESCIGNO, M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. **Journal of Hepatology**, v. 72, n. 3, p. 558–577, 2020.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboricaba: *Myrciaria jaboricaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, 2013.
- ANDERSON, M. J. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. **Biometrics**, v. 62, n. 1, p. 245–253, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANHÊ, F. F. et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. **Gut**, v. 64, n. 6, p. 872–883, 2015.
- ANHÊ, F. F. et al. Triggering *Akkermansia* with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? **Gut microbes**, v. 7, n. 2, p. 146–153, 2016.
- ANHÊ, F. F. et al. Arctic berry extracts target the gut–liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. **Diabetologia**, v. 61, n. 4, p. 919–931, 2018.
- ANTHONY, S. R. et al. Mechanisms linking adipose tissue inflammation to cardiac hypertrophy and fibrosis. **Clinical Science**, v. 133, n. 22, p. 2329–2344, 2019.
- ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, n. 1, p. 321–350, 2018.
- AURA, A. M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 3, p. 407–429, 2008.
- BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131–2157, 2007.

- BALDWIN, J. et al. Table grape consumption reduces adiposity and markers of hepatic lipogenesis and alters gut microbiota in butter fat-fed mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 27, p. 123–135, jan. 2016.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. Theory and practice of histological techniques, 3rd ed. **The Journal of Pathology**, v. 163, n. 3, jul. 1991.
- BAOTHMAN, O. A. et al. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.
- BATISTA, Â. G. et al. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) peel improved triglycerides excretion and hepatic lipid peroxidation in high-fat-fed rats. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 5, p. 571–581, 2013.
- BATISTA, Â. G. et al. Jaboticaba berry peel intake increases short chain fatty acids production and prevent hepatic steatosis in mice fed high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 48, n. December 2017, p. 266–274, 2018.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de Taninos e Tanases em alimentos. **Alimentação Nutricional**, v. 15, n. 1, p. 63–72, 2004.
- BELL, R. R.; SPENCER, M. J.; SHERRIFF, J. L. Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 10, p. 2006–10, 1997.
- BODEN, G. et al. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 304re7-304re7, 9 set. 2015.
- BOTO-ORDÓÑEZ, M. et al. High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: A randomized clinical trial. **Food and Function**, v. 5, n. 8, p. 1932–1938, 2014.
- BOULANGÉ, C. L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2016.
- BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E581–E591, 2009.
- BRADBURY, M. W.; BERK, P. D. Lipid metabolism in hepatic steatosis. **Clinics in Liver Disease**, v. 8, n. 3, p. 639–671, 2004.
- BRASIL. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**. [s.l: s.n.].
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 331–340, 1997.
- BUGIANESI, E. et al. Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 17, p. 1941–1951, 2010.
- BURGOYNE, J. R. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 9, p. 1042–1052, 2013.

- BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016.
- CANI, P. D. et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, 1 jul. 2007.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 11 maio 2010.
- CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.
- CATALÁN, V. et al. Adipose tissue immunity and cancer. **Frontiers in physiology**, v. 4, n. October, p. 275, 2013.
- CAVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização de insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, p. 419–425, 2002.
- CHAO, H. W. et al. Homeostasis of glucose and lipid in non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2019.
- CHENG, D. M. et al. Polyphenol-rich Rutgers Scarlet Lettuce improves glucose metabolism and liver lipid accumulation in diet-induced obese C57BL/6 mice. **Nutrition**, v. 30, n. 7- 8 SUPPL., 2014.
- CHENG, M. et al. A metagenomics approach to the intestinal microbiome structure and function in high fat diet-induced obesity mice fed with oolong tea polyphenols. **Food and Function**, v. 9, n. 2, p. 1079–1087, 2018.
- CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BANG, W. Y.; DELGADILLO-PUGA, C. Ellagic acid and urolithins A and B differentially regulate fat accumulation and inflammation in 3T3-L1 adipocytes while not affecting adipogenesis and insulin sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.
- COLLINS, B. et al. A polyphenol-rich fraction obtained from table grapes decreases adiposity, insulin resistance and markers of inflammation and impacts gut microbiota in high-fat-fed mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 31, p. 150–165, 2016.
- COMPARE, D. et al. Gut-liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 22, n. 6, p. 471–476, 2012.
- COX, C. L. et al. Consumption of fructose- but not glucose-sweetened beverages for 10 weeks increases circulating concentrations of uric acid, retinol binding protein-4, and gamma-glutamyl transferase activity in overweight/obese humans. **Nutrition and Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.
- CROSS, D. A. E. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785–789, 28 dez. 1995.
- CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 804–814, 1 jul. 2017.
- DA SILVA-MAIA, J. K. et al. Aqueous extract of berry (*Plinia jaboticaba*) byproduct

modulates gut microbiota and maintains the balance on antioxidant defense system in rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 1–11, 2019.

DA SILVA, R. C. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed flour prevents obesity-induced hepatic steatosis regulating lipid metabolism by increasing cholesterol excretion in high-fat diet-fed mice. **Food Research International**, v. 111, p. 408–415, 2018.

DANIEL, H. et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. **ISME Journal**, v. 8, n. 2, p. 295–308, 2014.

DE LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 416–421, 2008.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. *Euterpe oleracea* Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PloS one**, v. 10, n. 12, 2015.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2013.

DENG, J. et al. **Technological aspects and stability of polyphenols**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

DI CHIARA, T. et al. Hypoadiponectinemia: A link between visceral obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

DRAGANO, N. R. V. et al. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 447–455, 2013.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 4, p. 353–363, 1993.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696–1705, 2006.

DUSEJA, A.; CHAWLA, Y. K. Obesity and NAFLD. The role of bacteria and microbiota. **Clinics in Liver Disease**, v. 18, n. 1, p. 59–71, 2014.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EGGER, G.; DIXON, J. Beyond obesity and lifestyle: A review of 21st century chronic disease determinants. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

EMANUELA, F. et al. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. **J Nutr Metab**, v. 2012, p. doi: 10.1155/2012/476380., 2012.

- ENGELS, C.; SCHIEBER, A.; GÄNZLE, M. G. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2215–2223, 2011.
- ESPÍN, J. C. et al. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10476–10485, 2007.
- EVERARD, A. et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.
- FASANO, A. Gut permeability, obesity, and metabolic disorders: Who is the chicken and who is the egg? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 3–4, 2017.
- FESTUCCIA, W. T. et al. PPAR activation attenuates glucose intolerance induced by mTOR inhibition with rapamycin in rats. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 9, p. E1046–E1054, 2014.
- FIGUEIREDO, P. S. et al. Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1–32, 2017.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, n. July, p. 114–120, 1984.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. v. 55, n. 5, p. 999–1033, 1957.
- FORGIE, A. J. et al. Pea polyphenolics and hydrolysis processing alter microbial community structure and early pathogen colonization in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 67, p. 101–110, 2019.
- FRAGA, C. G. et al. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 435–445, 2010.
- FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à Insulina Associada à Obesidade: Efeitos Anti-Inflamatórios do Exercício Físico. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139–147, 2014.
- FREITAS, R. B. et al. *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- FUSTER, J. J. et al. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1786–1807, 27 maio 2016.
- GARCIA-MUÑOZ, C.; VAILLANT, F. Metabolic Fate of Ellagitannins: Implications for Health, and Research Perspectives for Innovative Functional Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 12, p. 1584–1598, 2014.
- GÉRARD, P. Gut microbiota and obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 147–162, 2016.

- GHETTI, F. F. et al. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 861–876, 5 abr. 2018.
- GONZÁLEZ-SARRÍAS, A. et al. NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 4, p. 503–512, 2010.
- GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 206–218, 2008.
- GORAN, M. I.; ULJASZEK, S. J.; VENTURA, E. E. High fructose corn syrup and diabetes prevalence: A global perspective. **Global Public Health**, v. 8, n. 1, p. 55–64, 2013.
- GREENE, D. A. et al. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **European journal of pharmacology**, v. 375, n. 1–3, p. 217–23, 1999.
- GU, J. et al. Dietary Black Raspberries Impact the Colonic Microbiome and Phytochemical Metabolites in Mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 63, n. 8, p. 1–9, 2019.
- GURAK, P. D. et al. Jaboticaba pomace powder obtained as a co-product of juice extraction: A comparative study of powder obtained from peel and whole fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 786–792, 2014.
- HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–299, 2010.
- HERNÁNDEZ, M. A. G. et al. The short-chain fatty acid acetate in body weight control and insulin sensitivity. **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019.
- HILDEBRANDT, M. A. et al. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1716- 1724.e2, nov. 2009.
- HOLMAN, G. D. Chemical biology probes of mammalian GLUT structure and function. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 22, p. 3511–3534, 2018.
- HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 1 maio 2002.
- HU, Y. et al. Acerola polysaccharides ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease through reduction of lipogenesis and improvement of mitochondrial functions in mice. **Food and Function**, v. 11, n. 1, p. 1037–1048, 2020.
- HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1483–1496, 2018.
- HUR, W. et al. Downregulation of microRNA-451 in non-alcoholic steatohepatitis inhibits fatty acid-induced proinflammatory cytokine production through the AMPK/AKT pathway. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 64, p. 265–276, 2015.
- HUTLEY, L.; PRINS, J. B. Fat as an endocrine organ: Relationship to the metabolic syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 330, n. 6, p. 280–289, 2005.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos e Familiares 2008-2009**. [s.l: s.n.]. v. 36

INADA, K. O. P. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422–433, 2015.

INADA, K. O. P. et al. Metabolism of ellagitannins from jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) in normoweight, overweight and obese Brazilians: Unexpected laxative effects influence urolithins urinary excretion and metabotype distribution. **Journal of Functional Foods**, v. 57, n. December 2019, p. 299–308, 2019.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

Jl, Y. et al. Gut microbiota-derived components and metabolites in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019.

JIN, G. et al. Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Modulates Intestinal Microbiota in Ovariectomized Mice. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 1149–1152, 2018.

JURGOŃSKI, A. et al. Metabolism of strawberry mono- and dimeric ellagitannins in rats fed a diet containing fructo-oligosaccharides. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 853–864, 2017.

KANG, I. et al. Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 961–972, 2016a.

KANG, I. et al. Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 5, p. 1129–1138, maio 2016b.

KANG, K. S. Abnormality on liver function test. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition**, v. 16, n. 4, p. 225–232, 2013.

KASUBUCHI, M. et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2839–2849, 2015.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1464–1469, 2010.

KHANBABAEE, K.; REE, T. VAN. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641–649, 2001.

KIEN, C. L.; BUNN, J. Y.; UGRASBUL, F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 2, p. 320–326, 2005.

KONINGS, E. et al. The effects of 30 days resveratrol supplementation on adipose tissue morphology and gene expression patterns in obese men. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 3, p. 470–473, 2014.

KOTRONEN, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Fatty liver: A novel component of the metabolic

- syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 1, p. 27–38, 2008.
- KUBOTA, N. et al. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 55–68, 2007.
- KUJAWSKA, M. et al. Neuroprotective effects of pomegranate juice against parkinson's disease and presence of ellagitannins-derived metabolite—urolithin A—in the brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020.
- KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.
- KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2016.
- LAMAS, C. A. et al. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n. May, p. 434–446, 2018.
- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150–1160, 2011.
- LAVEFVE, L.; HOWARD, L. R.; CARBONERO, F. Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health. **Food and Function**, v. 11, n. 1, p. 45–65, 2020.
- LAVOIE, J. M.; GAUTHIER, M. S. Regulation of fat metabolism in the liver: Link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1393–1409, 2006.
- LAWTON, C. L. et al. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. **Br J Nutr**, v. 83, n. 5, p. 473–82, 2000.
- LEAL, V. DE O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87–94, 2013.
- LEAVENS, K. F.; BIRNBAUM, M. J. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 200–215, 2011.
- LEE, D. H.; ZO, Y. G.; KIM, S. J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3112–3120, 1996.
- LENQUISTE, S. A. et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, p. 162–170, 2015.
- LENQUISTE, S. A. et al. Jaboticaba peel powder and jaboticaba peel aqueous extract reduces obesity, insulin resistance and hepatic fat accumulation in rats. **Food Research International**, v. 120, p. 880–887, 2019.
- LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1983, p. 464–478, 1990.

- LI, C. et al. Imine resveratrol analogues: Molecular design, Nrf2 activation and SAR analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- LIPÍŃSKA, L.; KLEWICKA, E.; SÓJKA, M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: A general review. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 289–299, 2014.
- LOMAN, B. R. et al. Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition Reviews**, n. August, p. 1–18, 2018.
- LONGO, M. et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- LÓPEZ-ALARCÓN, M. et al. Excessive refined carbohydrates and scarce micronutrients intakes increase inflammatory mediators and insulin resistance in prepubertal and pubertal obese children independently of obesity. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- MANGANARIS, G. A. et al. Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 825–833, 2014.
- MANZEL, A. et al. Role of “Western Diet” in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 1, p. 404, 15 jan. 2014.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 2015.
- MATTEONI, L. et al. Doença Hepática Gordurosa Não - Alcoólica: Importância Da Ultra-Sonografia Abdominal No Diagnóstico. p. 10–12, 2011.
- MATZIOURIDOU, C. et al. Lingonberries reduce atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice in association with altered gut microbiota composition and improved lipid profile. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 60, n. 5, p. 1150–1160, 2016.
- MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–618, 2012.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- MENCIN, A.; KLUWE, J.; SCHWABE, R. F. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. **Gut**, v. 58, n. 5, p. 704–720, 2009.
- MIELE, L. et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 1877–1887, 2009.
- MILALA, J. et al. Ellagitannins from Strawberries with Different Degrees of Polymerization Showed Different Metabolism through Gastrointestinal Tract of Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 49, p. 10738–10748, 2017.
- MIYAOKA, Y. et al. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. **Current biology : CB**, v. 22, n. 13, p. 1166–1175, 2012.
- MIYAOKA, Y.; MIYAJIMA, A. To divide or not to divide: Revisiting liver regeneration. **Cell Division**, v. 8, n. 1, p. 1, 2013.

- MOON, J. et al. Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 347–354, 2013.
- MORAIS, C. A. et al. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 1–7, 2016.
- MOREIRA, A. P. B. et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801–809, 2012.
- MOST, J. et al. Short-term supplementation with a specific combination of dietary polyphenols increases energy expenditure and alters substrate metabolism in overweight subjects. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 5, p. 698–706, 2014.
- MOUNIER, C.; BOURAOUI, L.; RASSART, E. Lipogenesis in cancer progression (review). **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 2, p. 485–492, 2014.
- MOURA, M. H. C. et al. Phenolic-rich jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) extracts prevent high-fat-sucrose diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Food Research International**, v. 107, n. 2017, p. 48–60, 2018.
- MOUSSAVI, N.; GAVINO, V.; RECEVEUR, O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity. **Obesity**, v. 16, n. 1, p. 7–15, 2008.
- NIELSEN, S. et al. Splanchnic lipolysis in human obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 11, p. 1582–1588, 1 jun. 2004.
- OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 363–374, 2012.
- PASCALE, A. et al. Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, v. 61, n. 3, p. 357–371, 2018.
- PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 3–11, 2010.
- PERAZZO, H. et al. Prediction of Liver Steatosis Applying a New Score in Subjects from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 00, n. 00, p. 1, 2018.
- PEVERILL, W.; POWELL, L. W.; SKOIJEN, R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: Beyond steatosis and inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8591–8638, 2014.
- PIERRE, J. F. et al. Cranberry proanthocyanidins improve the gut mucous layer morphology and function in mice receiving elemental enteral nutrition. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 401–409, 2013.
- PIERS, L. S. et al. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. **British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 03, p. 717, 2003.

PIMENTA INADA, K. O. et al. Effect of high hydrostatic pressure and drying methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125794, 2020.

POLYZOS, S. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, n. 4, p. 272–284, 2012.

POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 829–838, 3 mar. 2008.

QUATRIN, A. et al. The Hepatoprotective Effect of Jaboticaba Peel Powder in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Involves the Modulation of Thiol/Disulfide Redox State through the Upregulation of Glutathione Synthesis. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2018, 2018.

RABADAN-CHÁVEZ, G. et al. Cocoa powder, cocoa extract and epicatechin attenuate hypercaloric diet-induced obesity through enhanced β -oxidation and energy expenditure in white adipose tissue. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 54–67, 2016.

RAMALINGAM, L.; OH, E.; THURMOND, D. C. Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 16, p. 2815–2834, 10 ago. 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A. A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 447–456, 2004.

RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 2019.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 2016, n. 10, p. 1–22, 2016.

ROMÃO, M. H. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract protects against hepatic steatosis and fibrosis in high-fat diet-fed mice: Role of local renin-angiotensin system, oxidative stress and inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, n. December 2019, p. 103726, 2020.

ROOPCHAND, D. E. et al. Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 64, n. 8, p. 2847–2858, 2015.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852–871, mar. 2012.

SANMIGUEL, C.; GUPTA, A.; MAYER, E. A. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. **Current obesity reports**, v. 4, n. 2, p. 250–261, 2015.

SAVI, M. et al. In vivo administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2017.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 6, p. 943–954, 2016.

SCHREUDER, T. C. H. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: An overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 16, p. 2474–2486, 2008.

SELMA, M. V. et al. *Gordonibacter urolithinifaciens* sp. nov., a urolithin-producing bacterium isolated from the human gut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 7, p. 2346–2352, 2014a.

SELMA, M. V. et al. Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. **Food and Function**, v. 5, n. 8, p. 1779–1784, 2014b.

SELMA, M. V. et al. The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 897–905, 2018.

SEUFERT, J. Leptin Effects on Pancreatic β -Cell Gene Expression and Function. **Diabetes**, v. 53, n. SUPPL. 1, 2004.

SHI, M. et al. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 16–29, 2017.

SHILLABEER, G.; LAU, D. C. Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. **Journal of lipid research**, v. 35, n. 4, p. 592–600, 1994.

SHIN, N.-R. et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 727–735, maio 2014.

SILBERNAGEL, G. et al. Effects of 4-week very-high-fructose/glucose diets on insulin sensitivity, visceral fat and intrahepatic lipids: An exploratory trial. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 1, p. 79–86, 2011.

SILVA, A. P. S. et al. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. **Lipids**, v. 41, n. 6, p. 535–541, 2006.

SMITH, B. K. et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Role of AMPK. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 311, n. 4, p. E730–E740, 2016.

SOARES, E. R. et al. Up-regulation of Nrf2-antioxidant signaling by Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract prevents oxidative stress in human endothelial cells. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 107–115, 2017.

- SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 5, p. 1282–1293, 2016.
- SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. D. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014.
- SRIVASTAVA, R. A. K. et al. AMP-activated protein kinase: An emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 12, p. 2490–2514, 2012.
- STANHOPE, K. L. et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1322–1334, 2009.
- STEFAN, N.; KANTARTZIS, K.; HÄRING, H. U. Causes and metabolic consequences of fatty liver. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 939–960, 2008.
- STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 770–784, 2016.
- STINKENS, R. et al. Targeting fatty acid metabolism to improve glucose metabolism. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 9, p. 715–757, 2015.
- SUN, K. et al. Adipose tissue remodeling and obesity Find the latest version : Review series Adipose tissue remodeling and obesity. v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011.
- SUTHERLAND, C. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1336, p. 191–199, 1996.
- TAKEUCHI, H. et al. The application of medium-chain fatty acids: Edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, n. SUPPL. 1, p. 320–323, 2008.
- TAN, J. et al. **The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 121
- TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 85–96, 2006.
- TOLMAN, K. G. et al. Narrative review: Hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 141, n. 12, p. 946–956, 2004.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 1, p. 1500901, jan. 2017.
- TOMÁS-BARBERAN, F. A.; ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T. Bioavailability and metabolism of ellagic acid and ellagitannins. **Chemistry and Biology of Ellagitannins: An**

Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols, p. 273–297, 2009.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 4, p. 339–352, 2004.

TRAYHURN, P. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 1–21, 2013.

TRIPATHI, A. et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 7, p. 397–411, 2018.

TROUWBORST, I. et al. Ectopic Fat Accumulation in Distinct Insulin Resistant Phenotypes; Targets for Personalized Nutritional Interventions. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. September, 2018.

TU, P. et al. Gut microbiome toxicity: Connecting the environment and gut microbiome-associated diseases. **Toxics**, v. 8, n. 1, 2020.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

VACCA, M. et al. The controversial role of human gut lachnospiraceae. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 1–25, 2020.

VAN HERPEN, N. A.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 231–241, 2008.

VAN OBERGHEN, E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. **Diabetologia**, v. 37, n. 2 Supplement, 1994.

VELÁZQUEZ, K. T. et al. Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice. **World Journal of Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 619–637, 2019.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 338–349, 2010.

WANG, H. et al. Comparative proteomic analysis of fibrotic liver of rats fed high fat diet contained lard versus corn oil. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 198–208, 2017.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WANG, W. et al. Characterizations and hepatoprotective effect of polysaccharides from *Mesona blumes* against tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, n. 235, p. 788–795, 2019.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 15 dez. 2003.

WHITESIDE, S. A. et al. The microbiome of the urinary tract - A role beyond infection. **Nature Reviews Urology**, v. 12, n. 2, p. 81–90, 2015.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl, p. S48–S66, 2010.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **Doença Hepática Gordurosa não alcoólica e Esteatohepatite não alcoólica - Diretriz Global**. [s.l: s.n.].

WOUTERS, K. et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 474–486, 2008.

WU, S. B. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.

WU, S. B. et al. Bioactive and marker compounds from two edible dark-colored *Myrciaria* fruits and the synthesis of jaboticabin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4035–4043, 2013.

WU, T. et al. Anti-obesity effects of artificial planting blueberry (*Vaccinium ashei*) anthocyanin in high-fat diet-treated mice. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 257–264, 2016.

YADAV, A. et al. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. **Clinica Chimica Acta**, v. 417, p. 80–84, 2013.

YAMANE, T.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; OISHI, Y. A high-fat diet reduces ceramide synthesis by decreasing adiponectin levels and decreases lipid content by modulating HMG-CoA reductase and CPT-1 mRNA expression in the skin. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. SUPPL. 2, p. 186–192, 2011.

YANAI, H.; YOSHIDA, H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: Mechanisms and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1–25, 2019.

YANG, J. et al. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: Effects of omega-3 fatty acid supplementation. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 1–37, 2019.

YAQOOB, P. et al. Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 27, n. 3, p. 297–310, 1995.

YE, J. Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. **Current Diabetes Reports**, v. 11, n. 3, p. 203–210, 16 jun. 2011.

YIN, J.; WU, T. Anthocyanins from black wolfberry (*Lycium ruthenicum* Murr.) prevent inflammation and increase fecal fatty acid in diet-induced obese rats. **RSC Advances**, v. 7, n. 75, p. 47848–47853, 2017.

YIN, X. et al. Interactions between resveratrol and gut microbiota affect the development of hepatic steatosis: A fecal microbiota transplantation study in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v. 67, n. September 2019, p. 103883, 2020.

YU, X. H. et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. **Clinica**

Chimica Acta, v. 428, p. 82–88, 2014.

ZHANG, C. et al. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. **ISME Journal**, v. 6, n. 10, p. 1848–1857, 2012.

ZHANG, C. et al. Ellagic acid ameliorates AKT-driven hepatic steatosis in mice by suppressing: De novo lipogenesis via the AKT/SREBP-1/FASN pathway. **Food and Function**, v. 10, n. 6, p. 3410–3420, 2019a.

ZHANG, J. et al. Beneficial effect of butyrate-producing Lachnospiraceae on stress-induced visceral hypersensitivity in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 34, n. 8, p. 1368–1376, 2019b.

ZHANG, N. N. et al. Effect of a polyphenol-rich canarium album extract on the composition of the gut microbiota of mice fed a high-fat diet. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.

ZHANG, Y.; SCARPACE, P. J. The role of leptin in leptin resistance and obesity. **Physiology and Behavior**, v. 88, n. 3, p. 249–256, 2006.

ZHAO, Y. et al. The Beneficial Effects of Quercetin, Curcumin, and Resveratrol in Obesity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modulação da microbiota intestinal e de parâmetros metabólicos através da ingestão de farinha da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)", registrada com o nº 51/2016, sob a responsabilidade de Julio Daleprane - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 29/11/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29/11/2020
Espécie/linhagem/raça	camundongos C57Bl/6
Nº de animais	40
Peso/Idade	21 g / 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Bioterio setorial

Rio de Janeiro, 29 de Novembro de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ