

OLÍVIA GONÇALVES LEÃO COELHO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COCO E DO AZEITE DE OLIVA: POTENCIAL  
DE USO NO CONTROLE DA OBESIDADE**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

OLÍVIA GONÇALVES LEÃO COELHO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COCO E DO AZEITE DE OLIVA: POTENCIAL  
DE USO NO CONTROLE DA OBESIDADE**

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

APROVADA: 29 de julho de 2016.

---

Hilário Cuquetto Mantovani  
(Coorientador)

---

Virginia Ramos Pizziolo

---

Rita de Cássia Gonçalves Alfenas  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua presença constante em minha vida, por iluminar meu caminho e me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais Alexandre e Ana Angélica pelo amor incondicional, por todos os esforços, por sempre me encorajarem, por vibrarem a cada conquista comigo e, principalmente, pelo exemplo de dedicação como profissionais e pais.

À minha madrinha e tia Beatriz pelo amor de mãe, apoio e aconchego.

À minha irmã Iara e meu cunhado Pedro pelo carinho, amizade e torcida sempre.

Ao Fillipe pelo amor, paciência, conselhos e companheirismo que amenizaram as dificuldades encontradas ao longo do caminho.

À professora Rita pelo exemplo de pessoa e profissional. Serei sempre grata pela orientação, carinho, dedicação, disponibilidade e incentivo. Obrigada por acreditar e confiar em mim.

Ao professor Hilário pela coorientação, ensinamentos e oportunidade de trabalhar na área de microbiologia. Por ter aberto as portas do Laboratório de Anaeróbios e me acolhido tão bem.

À professora Ana Íris pela coorientação, ideias, sugestões e discussões que enriqueceram o trabalho.

À professora Helena pelas sugestões nas análises e disponibilização do Laboratório de Análise de Vitaminas.

À professora Virgínia, pelo aconselhamento e disponibilização do Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica.

Ao professor Marcelo, pela atenção, dúvidas sanadas e disponibilização do Laboratório de Síntese de Agroquímicos do Departamento de Química.

Ao doutorando Viktor do Departamento de Bioquímica e ao mestrando Mateus da Química, por todo suporte e disposição em ajudar sempre que precisei.

Às amigas do LEIA pela convivência, amizade, risadas e "terapias". Em especial à Flávia, pelo auxílio na idealização deste trabalho, suporte (a qualquer hora) e sugestões durante toda sua execução e finalização.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Anaeróbios pelo acolhimento, inúmeras ajudas, ensinamentos, força e momentos de descontração. Especialmente à Claudinha que me guiou nos experimentos e tanto me ensinou, obrigada pela paciência e atenção.

Às amigas que sempre estiveram presente ajudando, ouvindo e torcendo. Em especial à Ana Paula, pela convivência diária, ideias e angústias compartilhadas. À Bárbara, pela amizade, carinho e auxílio nas análises. À Alininha pela amizade de longa data e companherismo sempre.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Nutrição e Saúde, seus professores e funcionários, pela oportunidade de realização do curso e aprendizado acadêmico e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos e familiares que, longe ou perto, acompanharam essa caminhada e sempre me deram forças e alegrias!

Minha sincera e profunda gratidão!

## **BIOGRAFIA**

Olívia Gonçalves Leão Coelho, filha de Alexandre Negri Leão Coelho e Ana Angélica Gonçalves Leão Coelho, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em 14 de julho de 1990.

Graduou-se em março de 2014, Nutricionista pela Universidade Federal de Viçosa.

Pós-Graduada em Nutrição Clínica Funcional pelo Instituto Valéria Pascoal e Universidade Cruzeiro do Sul.

Iniciou o curso de Mestrado em Ciência da Nutrição, na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2014.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo geral.....	4
Objetivos específicos .....	4
<b>ARTIGO 1: Tipos de lipídeos dietéticos e microbiota intestinal: papel no controle da</b> <b>obesidade.....</b>	<b>5</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>7</b>
<b>Metodologia .....</b>	<b>8</b>
<b>Efeito dos tipos de lipídeos dietéticos na microbiota intestinal.....</b>	<b>8</b>
Evidências oriundas de estudos em animais .....	12
Evidências oriundas de estudos em seres humanos .....	13
<b>Mecanismos envolvidos no controle da obesidade .....</b>	<b>14</b>
Atividade antimicrobiana e modulação da microbiota intestinal.....	14
AGCC: metabólito da microbiota .....	19
Efeito anti-inflamatório e outros benefícios .....	20
<b>Conclusões e perspectivas.....</b>	<b>22</b>
<b>ARTIGO 2: Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do óleo de coco</b> <b>virgem e azeite de oliva extra virgem .....</b>	<b>30</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>32</b>
<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>33</b>
Amostras testadas.....	33
Perfil de ácidos graxos dos óleos .....	33
Conteúdo de vitamina E.....	34
Extração e análise de carotenoides .....	35
Extração e análise de flavonoides .....	35
Conteúdo de compostos fenólicos totais.....	36
Atividade antioxidante .....	37
Análises estatísticas .....	37
<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>44</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>48</b>
<b>ARTIGO 3: Óleo de coco e azeite de oliva: atividade <i>in vitro</i> contra bactérias</b> <b>relacionadas ao excesso de peso .....</b>	<b>53</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>55</b>
<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>56</b>
Materiais .....	56
Hidrólise <i>in vitro</i> dos óleos .....	56
Microrganismos utilizados.....	58

Ativação das estirpes.....	58
Atividade antibacteriana .....	58
Parâmetros de crescimento .....	60
Análises estatísticas .....	60
<b>Resultados.....</b>	<b>61</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>64</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>68</b>
<b>Material suplementar .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>ARTIGO 1</b> Tipos de lipídeos dietéticos e microbiota intestinal: papel no controle da obesidade	
<b>Figura 1.</b> Possíveis mecanismos de indução da morte celular ou de inibição do crescimento bacteriano exercidos pelos ácidos graxos livres que resultam em alterações do metabolismo do hospedeiro	16
<b>ARTIGO 2</b> Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do óleo de coco virgem e azeite de oliva extra virgem	
<b>Figura 1.</b> Proporção de ácidos graxos saturados, poli-insaturados (AGPI) e monoinsaturados (AGMI).	38
<b>Figura 2.</b> Concentração de luteína nas amostras de azeite de oliva.	42
<b>Figura 3.</b> Concentração de fenólicos totais nos óleos.	43
<b>Figura 4.</b> Atividade antioxidante dos óleos avaliada em função do percentual de inibição do DPPH.	43
<b>ARTIGO 3</b> Óleo de coco e azeite de oliva: atividade <i>in vitro</i> contra bactérias relacionadas ao excesso de peso	
<b>Figura 1S.</b> Curvas de crescimento do <i>Bacteroides ovatus</i> nas diferentes concentrações (mmol.L <sup>-1</sup> ) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.	76
<b>Figura 2S.</b> Curvas de crescimento do <i>Bacteroides fragilis</i> nas diferentes concentrações (mmol.L <sup>-1</sup> ) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.	76
<b>Figura 3S.</b> Curvas de crescimento do <i>Clostridium perfringens</i> nas diferentes concentrações (mmol.L <sup>-1</sup> ) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.	77
<b>Figura 4S.</b> Curvas de crescimento do <i>Enterococcus faecalis</i> nas diferentes concentrações (mmol.L <sup>-1</sup> ) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.	77
<b>Figura 5S.</b> Curvas de crescimento do <i>Lactobacillus paracasei</i> nas diferentes concentrações (mmol.L <sup>-1</sup> ) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.	78



**Figura 6S.** Curvas de crescimento do *Prevotella intermedia* nas diferentes concentrações (mmol.L<sup>-1</sup>) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias. 78

**Figura 7S.** Curvas de crescimento do *Staphylococcus aureus* nas diferentes concentrações (mmol.L<sup>-1</sup>) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias. 79

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>ARTIGO 1 Tipos de lipídeos dietéticos e microbiota intestinal: papel no controle da obesidade.</b>	
<b>Tabela 1.</b> Principais estudos com animais que avaliaram o efeito de lipídeos dietéticos na microbiota intestinal	10
<b>ARTIGO 2 Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do óleo de coco virgem e azeite de oliva extra virgem.</b>	
<b>Tabela 1.</b> Percentual de ácidos graxos em relação ao total, das diferentes marcas de óleos comerciais testadas.	39
<b>Tabela 2.</b> Conteúdo total de vitamina E, tocoferóis e tocotrienóis nas diferentes marcas de óleos comerciais testados (mg/100g de amostra).	41
<b>ARTIGO 3 Óleo de coco e azeite de oliva: atividade <i>in vitro</i> contra bactérias relacionadas ao excesso de peso</b>	
<b>Tabela 1.</b> Características das bactérias utilizadas nos experimentos.	58
<b>Tabela 2.</b> Percentual de ácidos graxos em relação ao total, dos óleos utilizados.	61
<b>Tabela 3.</b> Concentração inibitória mínima (mM) dos óleos testados.	62
<b>Tabela 4.</b> Efeito de diferentes concentrações de óleo de coco sobre parâmetros do crescimento de bactérias relacionadas à obesidade.	63

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2-MAG	2-monoacilglicerol
Abs	Absorvância
AG	Ácido graxo
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AGL	Ácido graxo livre
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGPI n-3	Ácido graxo poli-insaturado série n-3
AGPI n-6	Ácido graxo poli-insaturado série n-6
AGS	Ácido graxo saturado
ANOVA	Análise de variância
AO1	Azeite de oliva marca 1
AO2	Azeite de oliva marca 2
AO3	Azeite de oliva marca 3
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Cloreto de cálcio diidratado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLA	Ácido linoleico conjugado
CLA-t10c12	Ácido linoleico conjugado <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
cm	Centímetros
d	Dia
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DO	Densidade ótica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FFAR2	Receptor de ácidos graxos livre 2
FFAR3	Receptor de ácidos graxos livre 3
FID	Ionização de chama
g	Gramas
GAE	Ácido gálico
GLP-1	<i>Glucagon like peptide 1</i>
GPR41	Receptor de proteína-G acoplada 41
GPR43	Receptor de proteína-G acoplada 43
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade

HF	Hiperlipídica
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LF	Hipolipídica
Lip	Lípido
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAG	Monoacilglicerol
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol.L <sup>-1</sup>	milimol por litro
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
nm	Nanômetros
OC1	Óleo de coco marca 1
OC2	Óleo de coco marca 2
OC3	Óleo de coco marca 3
rpm	Rotações por minuto
s	Semanas
TAG	Triacilglicerol
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume/volume
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

## RESUMO

COELHO, Olívia Gonçalves Leão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2016. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo de coco e do azeite de oliva: potencial de uso no controle da obesidade.** Orientadora: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Ana Íris Mendes Coelho.

**Introdução:** A obesidade é um problema de saúde mundial, que se agrava ao longo dos anos e que está diretamente relacionado às complicações de diversas morbidades como diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e câncer. A manifestação da obesidade se associa a um quadro inflamatório subclínico, ao estresse oxidativo e alterações indesejáveis na composição da microbiota intestinal. O óleo de coco virgem e o azeite de oliva extra virgem são óleos vegetais que apresentam composição nutricional distinta e cujo consumo tem sido associado a benefícios relacionados ao controle da obesidade e à promoção da saúde. Sugere-se que tais efeitos estejam relacionados à atividade antioxidante e antimicrobiana, resultando em alterações benéficas à microbiota intestinal. Entretanto, são escassos os estudos em que se avaliou o efeito destes óleos contra bactérias que compõe a microbiota intestinal. **Objetivos:** Caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antioxidante, o teor de compostos bioativos e a capacidade antimicrobiana *in vitro*, contra bactérias intestinais relacionadas ao excesso de peso, do óleo de coco virgem e do azeite de oliva extra virgem. **Metodologia:** Três marcas comerciais de azeite de oliva extra virgem e óleo de coco virgem foram testadas. A atividade antioxidante foi avaliada por meio do teste de DPPH. Investigamos a ocorrência e concentração dos oito isômeros de vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferóis e tocotrienóis); carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina); flavonoides (3-deoxiantocianidinas, flavonas e flavanona) e compostos fenólicos totais. Essas análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), exceto os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, que foram analisados por meio de espectrofotometria. Para avaliação da atividade antimicrobiana foi selecionada a marca de cada óleo que apresentou melhor perfil de compostos bioativos. Os óleos foram previamente digeridos *in vitro* pela ação da lipase pancreática. Os microrganismos testados foram *B. fragilis*, *B. ovatus*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *E. coli*, *L. paracasei*, *P. intermedia* e *S. aureus*. Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos selecionados, a velocidade específica de crescimento das bactérias testadas e a densidade óptica final de 24 horas. **Resultados:** O azeite de oliva possui os isômeros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -tocopherol, enquanto o óleo de coco  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocotrienol. O azeite de oliva possui maior teor de vitamina E total que o óleo de coco. Dentre as marcas de óleo de coco, a marca 1 apresentou maior concentração de

vitamina E total e dos isômeros identificados. O único carotenóide identificado foi a luteína, apenas nas amostras de azeite de oliva, sendo a marca 1 a que apresentou maior concentração. Não detectamos a ocorrência de flavonoides em nenhum tipo de óleo. As marcas de óleo de coco apresentaram conteúdo inferior de compostos fenólicos em relação ao azeite de oliva. As marcas de azeite de oliva apresentaram percentual de inibição do radical DPPH dez vezes maior que as do óleo de coco. O azeite de oliva não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhuma das bactérias testadas. O óleo de coco inibiu o crescimento de sete das oito bactérias avaliadas. As bactérias anaeróbias foram mais sensíveis à ação do óleo digerido, apresentando valores de CIM menores que as aeróbias. **Conclusões:** As diferentes marcas de um mesmo tipo de óleo diferiram quanto à composição dos compostos antioxidantes. A marca 1 do azeite de oliva e a marca 1 do óleo de coco se destacaram em relação aos compostos analisados. O azeite de oliva extra virgem apresentou melhor perfil de compostos bioativos e maior atividade antioxidante que o óleo de coco. Enquanto o azeite de oliva não inibiu o crescimento microbiano, o óleo de coco apresentou alta atividade antimicrobiana contra bactérias relacionadas ao excesso de peso.

## ABSTRACT

COELHO, Olívia Gonçalves Leão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of coconut oil and olive oil: potential use in obesity control.** Advisor: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas. Co-advisors: Hilário Cuquetto Mantovani and Ana Íris Mendes Coelho.

**Introduction:** Obesity is a global health problem that is getting worse over the years, and is directly related to several diseases such as diabetes mellitus, hypertension, cardiovascular disease and cancer. Obesity manifestation is associated with chronic low-grade inflammation, oxidative stress and undesirable gut microbiota changes. Virgin coconut oil and extra virgin olive oil are vegetable oils that present different nutritional compositions and their consumption has been associated with benefits related to obesity control and health promotion. It has been suggested that these effects could be associated with their antioxidant and antimicrobial activity, leading to beneficial changes on gut microbiota. However, there are few studies that evaluated the effect of these oils against bacteria found in the intestinal microbiota. **Objectives:** To chemically characterize, and assess *in vitro* the antioxidant activity and antimicrobial capacity, against gut bacteria related with excess weight, presented by virgin coconut oil and extra virgin olive. **Methods:** Three extra virgin olive oil and virgin coconut oil commercial brands were tested. The antioxidant activity was evaluated using DPPH test. We investigated the occurrence and concentration of eight vitamin E isomers ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocopherols and tocotrienols); carotenoids ( $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin); flavonoid (3-deoxiantocianidinas, flavones and flavanone) and total phenolics compounds. These analyzes were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), except for phenolic compounds and antioxidant activity, which were by spectrophotometry. In order to evaluate the antimicrobial activity we selected the brand of each oil that presented the best bioactive compounds profile. The oils were previously digested *in vitro* by pancreatic lipase. The microorganisms tested were *B. fragilis*, *B. ovatus*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *E. coli*, *L. paracasei*, *S. aureus* and *P. intermedia*. It was determined The minimum inhibitory concentration (MIC) of the selected oils, the specific growth rate of the bacteria tested and the final optical density after 24 hours were assessed. **Results:** While olive presented  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -tocopherol isomers, coconut oil presented  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -tocotrienol. Olive oil showed higher vitamin E content than coconut oil. Among the coconut oil brands, brand1 showed the highest concentration vitamin E concentration and of better isomers composition. Lutein was the carotenoid identified only in olive oil, and brand 1 presented the highest concentration. We did not detect the occurrence of flavonoids

in any oil. Coconut oil brands showed lower content of phenolic compounds than olive oil. The olive oil brands showed DPPH radical inhibition percentage ten times higher than the one verified for coconut oil. Olive oil showed no antimicrobial activity against any of the tested bacteria. Coconut oil inhibited the growth of seven of the eight bacteria assessed. Anaerobic bacteria were more sensitive to the action of the digested oil, presenting lower MIC values than the aerobic ones. **Conclusions:** Different brands of the same oil type differ in antioxidant content. Olive oil brand 1 and of coconut oil brand 1 excelled regarding the analyzed compounds. Extra virgin olive oil showed a better bioactive compounds profile and antioxidant activity than coconut oil. While olive oil did not inhibit microbial growth, coconut oil showed high antimicrobial activity against bacteria related to excess weight.

# CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COCO E DO AZEITE DE OLIVA: POTENCIAL DE USO NO CONTROLE DA OBESIDADE

## INTRODUÇÃO GERAL

A obesidade é um problema de saúde mundial, que se agrava ao longo dos anos e que está diretamente relacionado às complicações de diversas morbidades como diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e câncer (IBGE, 2010). Ela se associa a um quadro inflamatório subclínico, ao qual se relaciona intenso estresse oxidativo (GHAYOUR-MOBARHAN et al., 2008) e alterações indesejáveis na composição da microbiota intestinal (TAGLIABUE; ELLI, 2013). Embora a etiologia da obesidade seja multifatorial e complexa, a dieta é um de seus principais fatores determinantes. Apesar da ingestão excessiva de gorduras favorecer a manifestação da obesidade, acredita-se que certos tipos de gorduras exerçam efeito protetor contra tal doença (ENNS et al., 2014).

O azeite de oliva extra virgem contém entre 55% e 83% de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), apresentando ação antioxidante, anti-inflamatória (PAPAGEORGIOU et al., 2011) e antimicrobiana (MUJICO et al., 2013). Seu efeito no combate à obesidade já está bem estabelecido na literatura (BULOTTA et al., 2014; COVAS; DE LA TORRE; FITÓ, 2015; HARO et al., 2016; PEREZ-MARTINEZ et al., 2011). Por outro lado, o óleo de coco contém cerca de 90% de ácidos graxos saturados, sendo mais de 60% destes, ácidos graxos de cadeia média (AGCM) (MARINA et al., 2009). O consumo diário de óleo de coco (*Cocos nucifera L.*) tem sido popularmente adotado no Brasil, Estados Unidos e em alguns países europeus como estratégia para controle do peso, embora sem comprovação científica consolidada. Compostos bioativos e vitaminas antioxidantes presentes no óleo de coco (ARLEE; SUANPHAIROCH; PAKDEECHANUAN, 2013; SENEVIRATNE; HAPUARACHCHI; EKANAYAKE, 2009) e no azeite de oliva (COVAS et al., 2006; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007) têm ação eficaz contra radicais livres formados no estresse oxidativo (HUANG; OU; PRIOR, 2005), e podem promover benefícios no tratamento da obesidade.

O possível efeito dos lipídeos dietéticos sobre a microbiota intestinal conquistou o interesse dos pesquisadores, uma vez que a mesma pode afetar a predisposição à adiposidade e participar da gênese da obesidade (TAGLIABUE; ELLI, 2013). Apesar dos resultados heterogêneos dos estudos, é possível identificar que algumas espécies e gêneros bacterianos são mais abundantes em indivíduos com excesso de peso (ARMOUGOM et al., 2009; SANTACRUZ; MC; GARCIA-VALDES, 2010) em relação a indivíduos eutróficos.



Acredita-se que os lipídeos possam influenciar a microbiota intestinal por exercerem efeito antibacteriano. O efeito antimicrobiano do óleo de coco e do azeite de oliva tem sido investigado *in vitro* por alguns autores (LUCERA et al., 2012; SHILLING et al., 2013; TANGWATCHARIN; SUKSATHIT, 2014). No entanto, são escassos os estudos em que se avaliou o efeito destes óleos contra bactérias que compõe a microbiota intestinal (SHILLING et al., 2013; ZAMPA et al., 2006).

Diante do exposto, torna-se importante a condução de estudos visando verificar o potencial antioxidante e efeito sobre bactérias da microbiota intestinal, dos óleos e gorduras dietéticas, visando a identificação de estratégias nutricionais capazes de prevenir e controlar a obesidade.

### Referências bibliográficas

ARLEE, R.; SUANPHAIROCH, S.; PAKDEECHANUAN, P. Differences in chemical components and antioxidant-related substances in virgin coconut oil from coconut hybrids and their parents. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 5, p. 2103–2109, 2013.

ARMOUGOM, F. et al. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7125, 23 set. 2009.

COVAS, M.-I. et al. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of health Benefits in Humans. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 10, p. S20–30, 2006.

COVAS, M.-I.; DE LA TORRE, R.; FITÓ, M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S19–S28, 7 abr. 2015.

DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 11 jan. 2014.

ENNS, J. E. et al. Diets high in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decrease fatty acid synthase protein levels in adipose tissue but do not alter other markers of adipose function and inflammation in diet-induced obese rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 90, n. 2-3, p. 77–84, fev. 2014.

GHAYOUR-MOBARHAN, M. et al. Antibody titres to heat shock protein 27 are elevated in patients with acute coronary syndrome. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 3, p. 209–215, 6 maio 2008.

HARO, C. et al. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 1, p. 233–242, jan. 2016.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, mar. 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de orçamento familiar 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**, 2010.

LUCERA, A. et al. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 1–13, 2012.

MARINA, A. M. et al. Chemical Properties of Virgin Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 4, p. 301–307, 24 jan. 2009.

MUJICO, J. R. et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 04, p. 711–720, 10 ago. 2013.

PAPAGEORGIOU, N. et al. Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 514–9, abr. 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, F. et al. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 1199–1208, 19 set. 2007.

SANTACRUZ, A.; MC, C.; GARCIA-VALDES, L. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **Br J Nutr**, v. 104, p. 83–92, 2010.

SENEVIRATNE, K. N.; HAPUARACHCHI, C. D.; EKANAYAKE, S. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1444–1449, jun. 2009.

SHILLING, M. et al. Antimicrobial Effects of Virgin Coconut Oil and Its Medium-Chain Fatty Acids on *Clostridium difficile*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 12, p. 1079–1085, dez. 2013.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 3, p. 160–168, mar. 2013.

TANGWATCHARIN, P.; SUKSATHIT, S. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by virgin coconut oil, monolaurin and lactic acid in lab medium and fresh pork. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 41, n. 2, p. 345–359, 2014.

ZAMPA, A. et al. In vitro modulatory effects of colonic microflora by olive oil iridoids. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 18, n. 3-4, p. 147–153, jan. 2006.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- Verificar a atividade antioxidante, a capacidade antimicrobiana e o teor de compostos bioativos *in vitro* do óleo de coco e do azeite de oliva.

### **Objetivos específicos**

- Comparar a composição química de 3 marcas do azeite de oliva extra virgem e do óleo de coco;
- Investigar a ocorrência e concentração dos seguintes compostos no óleo de coco virgem e no azeite de oliva extra virgem:
  - Vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferóis e tocotrienóis);
  - Carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina);
  - Flavonóides (3-deoxiantocianidinas, flavonas e flavanonas);
  - Compostos fenólicos totais;
- Determinar a atividade antioxidante do óleo de coco e do azeite de oliva extravirgem a partir do extrato fresco obtido dos óleos;
- Verificar a atividade antimicrobiana do óleo de coco e do azeite de oliva extravirgem sobre o crescimento de bactérias presentes na microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso.

## **ARTIGO 1: Tipos de lipídeos dietéticos e microbiota intestinal: papel no controle da obesidade**

### **Resumo**

A obesidade é um grave problema de saúde mundial que está diretamente relacionado à manifestação de diversas morbidades. O papel da disbiose intestinal na patogênese da obesidade tem despertado o interesse da comunidade científica. Sabe-se que a composição da dieta pode alterar a microbiota, independente da quantidade de calorias consumidas. O tipo de ácido graxo ingerido, e conseqüentemente o tamanho da cadeia carbônica e o grau de saturação podem influenciar a composição da microbiota, que por sua vez atua como elo entre o intestino e a saúde metabólica. Os ácidos graxos podem afetar a membrana celular, interferir sobre a produção de energia, inibir atividades enzimáticas, prejudicar a absorção de nutrientes e gerar produtos tóxicos às células, inibindo o crescimento ou até mesmo causando a morte das bactérias. Estudos apontam para o efeito benéfico do consumo de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3) e ácido linoleico conjugado (CLA) na microbiota, ao contrário de AGPI n-6 e AG saturados. Mais estudos são necessários para compreender melhor o efeito dos isômeros do CLA na microbiota e saúde do hospedeiro. O consumo de AGPI n-3 parece promover alterações favoráveis na microbiota intestinal de indivíduos obesos, aproximando-a daquela de indivíduos eutróficos. Estudos clínicos controlados de longa duração em humanos devem ser conduzidos para permitir que a complexa interação entre lipídeos dietéticos, microbiota intestinal e obesidade seja compreendida pela comunidade científica.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos livres, disbiose, lipídeos dietéticos, microbiota intestinal, obesidade.

## **Abstract**

Obesity is a serious global health problem that is directly related to various morbidities manifestation. The discovery of intestinal dysbiosis role in the obesity pathogenesis has increased the interest of the scientific community. Diet composition can alter gut microbiota, regardless of energy intake. The type of fatty acid ingested and therefore their carbon chain length and degree of saturation may influence microbiota composition acting as a link between the intestine and host metabolic health. Fatty acids may act on cell membrane, interfere with energy production, inhibit enzymatic activities, impair nutrient absorption and generate toxic compounds to cells, leading to growth inhibition or even bacterial death. Studies suggest the beneficial effect of the consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and conjugated linoleic acid (CLA) in the microbiota, unlike n-6 PUFA and saturated fatty acids. More studies are needed to better understand the effect of CLA isomers on microbiota and host health. n-3 PUFA consumption promotes desirable changes in intestinal microbiota of obese individuals in a way their microbiota becomes similar to that of normal weight individuals. Long term human controlled clinical studies must be conducted to allow the understanding of the complex interaction between dietary fat, intestinal microbiota and obesity by the scientific community.

**Key words:** Free fatty acids, dietary fats, dysbiosis, gut microbiota, obesity.

## **Introdução**

A obesidade é um grave problema de saúde mundial, que está diretamente relacionado à manifestação de diversas morbidades por mecanismos que envolvem a inflamação subclínica (GOMES; COSTA; ALFENAS, 2015; SWINBURN et al., 2011). Recentemente, a descoberta do papel da disbiose intestinal na patogênese da obesidade tem despertado o interesse da comunidade científica por se tratar de um alvo em potencial para intervenções terapêuticas (TAGLIABUE; ELLI, 2013).

A modulação da microbiota intestinal pelo uso de prebióticos e/ou probióticos, o transplante de microbiota e o uso de antibióticos são terapias emergentes para o controle da obesidade (O'FLAHERTY et al., 2010; WEST et al., 2015). Apesar disso, o alto custo, a dificuldade de manutenção da microbiota desejável a longo prazo e os possíveis riscos à saúde podem trazer questionamentos sobre a aplicabilidade dessas estratégias. A dieta, por outro lado, é um dos principais fatores determinantes da obesidade, e pode ser um alvo acessível para intervenções terapêuticas visando o controle da disbiose (COTILLARD et al., 2013).

Os lipídeos dietéticos são considerados como os componentes alimentares com maior ação antimicrobiana (DESBOIS; SMITH, 2010), sendo também capazes de modular a inflamação (ANGELAKIS et al., 2012). Esses efeitos contra bactérias foram amplamente comprovados em estudos voltados para o aumento da vida de prateleira de produtos alimentícios (LUCERA et al., 2012), para produtos de higiene bucal (SHINO et al., 2016) ou para tratamentos tópicos de infecções (VERALLO-ROWELL; DILLAGUE; SYAH-TJUNDAWAN, 2008).

Apesar da atividade antimicrobiana e do uso potencial dos lipídeos dietéticos na modulação da microbiota intestinal, seu uso no controle da disbiose na obesidade tem sido negligenciado. Acreditava-se que as quantidades de AGL que chegavam ao cólon eram desprezíveis em indivíduos saudáveis e, por isso, insuficientes para impactar a microbiota intestinal (SALONEN; DE VOS, 2014). No entanto, descobertas recentes afirmam que 7% dos lipídeos dietéticos atingem o cólon sob a forma de AGL, mesmo em indivíduos saudáveis que consomem dietas normolipídicas (GABERT et al., 2011). A influência dos lipídeos dietéticos sobre a microbiota intestinal tem sido confirmada por um número crescente de evidências científicas (CHAPLIN et al., 2015; DAVID et al., 2014; DEVKOTA et al., 2012; FAVA et al., 2013; MUJICO et al., 2013; WU et al., 2011).

O efeito indesejável das dietas hiperlipídicas sobre a modulação da microbiota na obesidade foi recentemente confirmado em um estudo robusto conduzido por Murphy et al. (2015). Assim, o objetivo desta revisão é avaliar criticamente o papel dos diferentes tipos de lipídeos dietéticos na modulação da microbiota intestinal, visando o controle da obesidade, bem como elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na integração destes fatores.

## **Metodologia**

Foram realizadas buscas nas bases de dados eletrônicas Medline/PubMed, Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SCIELO) e Latin American and Caribbean Health Sciences Literature – LILACS, para identificar estudos publicados relacionados aos efeitos dos lipídeos dietéticos na microbiota intestinal e no controle da obesidade. Para a busca de dados, os termos utilizados foram: microbiota intestinal/microbioma/flora intestinal, lipídeos/ácidos graxos dietéticos, obesidade/excesso de peso, atividade/efeito antimicrobiano/antibacteriano. Os termos foram utilizados sozinhos ou em associação e as línguas selecionadas foram português, inglês e espanhol. Foram selecionados artigos originais e de revisão de acordo com os títulos e resumos e publicados nos últimos 10 anos. Artigos publicados antes deste período foram incluídos se justificado pela sua revelância científica. Os de revisão foram consultados como fonte de referências de artigos originais sobre o assunto. Todos os artigos foram lidos e analisados criticamente.

## **Efeito dos tipos de lipídeos dietéticos na microbiota intestinal**

A composição da microbiota do TGI difere ao longo da sua extensão. Enquanto no estômago há uma pequena diversidade e baixa abundância de microrganismos, no intestino grosso há uma ampla variedade e elevado número. No intestino delgado, a bile e suco pancreático limitam o número de bactérias presentes, variando de  $\sim 10^4$ /ml na região proximal até  $\sim 10^6$ - $10^8$ /ml na região íleo-cecal (WALTER; LEY, 2011). Espécies aeróbias e aerotolerantes são prevalentes no intestino delgado, enquanto anaeróbias estritas predominam no cólon, onde há baixa tensão de oxigênio (MOWAT; AGACE, 2014).

A maior e mais estudada comunidade microbiana humana reside no cólon e é composta por aproximadamente 1100 espécies distintas. Mais de 90% das categorias filogenéticas das bactérias encontradas no intestino humano pertencem ao filo *Firmicutes* (incluindo os gêneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*), ou ao filo *Bacteroidetes* (incluindo *Bacteroides* e *Prevotella*) (POWER et al., 2014). Em menores

proporções encontram-se os filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2013).

O desequilíbrio da microbiota (disbiose), observado em obesos, favorece a passagem de endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de Gram-negativas (MOREIRA; ALFENAS, 2012), do lúmen intestinal para a circulação sistêmica (YANG; ROSE, 2014). O aumento do LPS na circulação, resulta na endotoxemia metabólica e consequente inflamação de baixo grau, associada à obesidade (KALIANNAN et al., 2015). Apesar de ainda não haver consenso sobre a composição da microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso, a maioria dos estudos apontam para uma diminuição do filo *Bacteroidetes* e aumento de *Firmicutes* (ARMOUGOM et al., 2009; LEY et al., 2006). Além disso, estes indivíduos possuem menor diversidade da microbiota intestinal (CLARKE et al., 2012).

Vários fatores como hábitos alimentares, meio ambiente e uso de antibióticos podem afetar a composição da microbiota intestinal (CHEN et al., 2016). O gênero, a idade e a raça dos indivíduos também interferem na formação da microbiota (HULLAR; FU, 2014). A composição da dieta, independente das calorias consumidas (COX; BLASER, 2013), o tipo de AG ingerido, tamanho da sua cadeia carbônica e o grau de saturação também podem influenciar a composição da microbiota (MUJICO et al., 2013), atuando como elo entre o intestino e a saúde metabólica do hospedeiro. Destaca-se, no entanto, que os AG só exercem essa função após serem digeridos e liberados sob forma de AGL no intestino (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2013).

A digestão dos lipídeos se inicia na boca pela ação das lipases lingual e gástrica (MU; HØY, 2004). Entretanto, a lipase pancreática é a principal responsável pela hidrólise dos lipídeos ingeridos, liberando os AGL no intestino delgado (DI MAIO; CARRIER, 2011).



Tabela 1. Principais estudos com animais que avaliaram o efeito de lipídeos dietéticos na microbiota intestinal.

AG	Intervenção	Duração	Efeitos na microbiota	Ref.
	Dieta controle ou sem carboidrato HF (72% de lip: óleo de milho e banha de porco)	4 s	Dieta HF ↓ <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> e <i>Lactobacillus</i> ssp. e ↑ <i>Bifidobacterium</i> spp.	Canani et al, 2008
	Dieta rica em polissacarídeos (16% de lip), LF ou HF (41% de AGS e AGPI)	8 s	Dieta HF ↓ a diversidade bacteriana e <i>Bacteroidetes</i> e ↑ <i>Firmicutes</i> (classe <i>Mollicutes</i> ).	Turnbaugh et al, 2008
	Dieta controle LF ou HF (40,6% de lip como gordura bovina: 41% AGS, 17% trans, 35% AGMI e 7% AGPI)	8 s	Dieta HF ↑ <i>Catenibacterium mitsuokai</i> , <i>Clostridium innocuum</i> , <i>Eubacterium dolichum</i> , <i>Erysipelotrichi</i> e <i>Enterococcus</i> e ↓ <i>Bacteroidetes</i> .	Turnbaugh et al, 2009b
Saturado	Dieta controle ou dieta HF (45% de lip: 87,6% de banha de porco e 12,3% de óleo de soja)	21 s	Dieta HF ↓ <i>Bacteroidetes</i> e ↑ <i>Firmicutes</i> , <i>Clostridiales</i> e <i>Delta-Proteobacteria</i> .	Hildebrandt et al, 2009
	Dieta LF (10% de lip) ou HF (45% de lip: banha de porco)	15 s	Dieta HF ↑ <i>Firmicutes</i> e ↓ <i>Proteobacteria</i> e <i>Bifidobacterium</i> .	Murphy et al, 2010
	Dieta LF (5,2% de lip) ou HF (34,9% de lip)	25 s	Dieta HF ↑ <i>Desulfovibrionaceae</i> e ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp.	Zhang et al, 2010
	Dieta LF (5% de lip) ou HF (38% de lip: banha de porco, leite ou óleo de girassol)	3 s	Dietas HF (leite e óleo de girassol) ↓ <i>Firmicutes</i> e ↑ <i>Bacteroidetes</i> . Dietas LF ↑ <i>Firmicutes</i> e ↓ a abundância dos outros filos.	Devkota et al, 2012
	Dieta controle (4% de lip), HF (34,3% de lip como: 16,1% AGS, 12,6% AGMI e 5,5% AGPI)	19 s	Dieta HF ↑ <i>Enterobacteriales</i> e ↓ conteúdo total de DNA nas fezes.	Mujico et al, 2013

	Dieta controle (12% de lip: 61,5% de óleo de soja e 38,5% de banha de porco) ou HF (43% de lip: 35,5% de óleo de soja e 64,5% de banha de porco)	7 s	Dieta HF ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp.	Chaplin et al, 2015
AGPI	Dieta controle (9% de lip), HF (40% de lip: 20% de óleo de canola, 20% de óleo de milho ou 19% de óleo de milho + 1% de óleo de peixe)	5 s	Dieta HF com óleo de peixe protegeu contra suprecrescimento bacteriano causado por AGPI n-6.	Gosh et al, 2013
	Dieta controle (4% de lip) ou dieta HF + AGPI n-3 (3g/kg/dia de EPA e DHA)	7 s	AGPI n-3 ↑ <i>Firmicutes</i> e grupo <i>Lactobacillus</i> .	Mujico et al, 2013
AGMI	Dieta controle (4% de lip) ou dieta HF + composto derivado do ácido oleico (1,5g/kg/dia)	7 s	Composto derivado do ácido oleico restabeleceu o conteúdo total de DNA em níveis semelhantes ao grupo controle e ↑ <i>Bifidobacterium</i> e <i>Bacteroidetes</i> .	Mujico et al, 2013
	Dieta controle (12% de lip: 61,5% de óleo de soja e 38,5% de banha de porco) ou 64,5% de banha de porco) ou HF + CLA (6 mg)	7 s	Dieta HF ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp. Suplementação com CLA ↑ <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> .	Chaplin et al, 2015
CLA	Dieta controle (6,2% de lip) ou suplementada com 0,5% de CLA (6,7% de lip)	8 s	Suplementação com CLA ↓ <i>Firmicutes</i> e ↑ <i>Bacteroidetes</i> ; ↓ <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> e <i>Peptococcaceae</i> e ↑ <i>Porphyromonadaceae</i>	Marques et al, 2015

↑: aumentou; ↓: diminuiu; AG: ácido graxo; Lip: lipídeos; HF: hiperlipídica; LF: hipolipídica; s: semanas; d:dias; AGPI: ácido graxo poli-insaturado; AGMI: ácido graxo monoinsaturado; CLA: ácido linoleico conjugado.

### *Evidências oriundas de estudos em animais*

O consumo de dieta hiperlipídica afeta negativamente a composição da microbiota em modelos animais (Tabela 1). Geralmente, a gordura saturada tem sido fornecida como fonte de lipídeos nas dietas hiperlipídicas (CANI et al., 2008; HILDEBRANDT et al., 2009; MURPHY et al., 2010; PARKS et al., 2013; TURNBAUGH et al., 2008, 2009), embora o objetivo nesses estudos não seja avaliar o efeito específico deste tipo de gordura.

Estudos de intervenção em modelos animais com duração variando de 3 a 25 semanas concluíram que a dieta hiperlipídica (rica em gordura saturada), muitas vezes utilizado para induzir obesidade, reduz a população do filo *Bacteroidetes* e aumenta de *Firmicutes* (CANI et al., 2008; HILDEBRANDT et al., 2009; MURPHY et al., 2010; TURNBAUGH et al., 2008, 2009). Em relação aos gêneros, a dinâmica ainda é controversa, mas os ácidos graxos saturados (AGS) parecem diminuir *Bacteroides*, *Prevotella*, *Lactobacillus* ssp. e *Bifidobacterium* spp (CANI et al., 2008; MURPHY et al., 2010; ZHANG et al., 2010), tornando o perfil da microbiota semelhante à de indivíduos e animais com excesso de peso.

No entanto, a ingestão de dieta suplementada com 0,5% de ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12 (CLA-t10c12) por 8 semanas, acarretou o aumento de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes* em relação ao grupo não suplementado. A fermentação microbiana no ceco também foi realçada, resultando em maiores níveis dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) isobutirato, acetato e propionato (MARQUES et al., 2015). Esses AGCC modulam o metabolismo do hospedeiro, promovendo a saúde intestinal, a diferenciação celular e exercendo efeito anti-inflamatório (MACFARLANE; MACFARLANE, 2012; POWER et al., 2014). Em contrapartida, a suplementação com CLA, embora tenha promovido alterações benéficas na microbiota, provocou esteatose hepática nos animais (MARQUES et al., 2015). Assim, mais estudos com CLA são necessários para conhecer melhor seus efeitos e dosagem adequada.

Em outro estudo com animais, a suplementação de CLA (6 mg/dia, 50:50 dos isômeros ativos *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) causou alterações benéficas para a microbiota, ao aumentar a população de bactérias de interesse no controle da obesidade, do filo *Bacteroidetes* e de *Akkermansia muciniphilia* (CHAPLIN et al., 2015). A *A. muciniphilia* reside na camada de muco intestinal e é responsável por degradar a mucina. Sua presença está associada à mucosa saudável e geralmente está reduzida na obesidade (CHAPLIN et al., 2015), além de ser negativamente correlacionada com gordura corporal (PARKS et al., 2013). Essas alterações verificadas após suplementação com CLA confirmam seu efeito benéfico na

microbiota dos animais (CHAPLIN et al., 2015). Os resultados do referido estudo podem ser relevantes no desenvolvimento de estratégias de manejo do peso corporal, uma vez que o CLA tem sido utilizado para perda de gordura corporal em humanos (GAULLIER et al., 2007).

Ghosh e colaboradores (2013) demonstraram que ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-3 protegeram ratos de disbiose, ao reverter quadro de super crescimento bacteriano causado pelo consumo de AGPI n-6. O referido quadro resulta no aumento da população de bactérias indesejáveis e a disbiose frequentemente acompanha o quadro. Ele é caracterizado por uma desregulação do crescimento como um todo, e provoca dor abdominal, inchaço, má-absorção de vitaminas (como a B12), lipídeos e proteínas (IERARDI et al., 2016). Ademais, a ingestão de AGPI n-6 resultou na depleção de microrganismos dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, no aumento do IMC e na infiltração de células inflamatórias no íleo dos animais. Em contraste, o AGPI n-3 restabeleceu a infiltração dessas células a níveis similares à dieta controle (GHOSH et al., 2013). Verificou-se ainda que, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, a suplementação de AGPI n-3 por 19 semanas foi capaz de aumentar a abundância de *Lactobacillus* (MUJICO et al., 2013). No entanto, não foram especificadas as estirpes de *Lactobacillus*, configurando uma limitação do estudo, uma vez que, diferentes espécies se associam de maneiras distintas com a obesidade. Enquanto os *Lactobacillus reuteri* se associam positivamente com a obesidade (MILLION et al., 2012a) e os *Lactobacillus acidophilus* com o ganho de peso, os *Lactobacillus gasseri* têm sido associados à perda de peso, em humanos (MILLION et al., 2012b).

#### *Evidências oriundas de estudos em seres humanos*

Em relação aos efeitos dos tipos de lipídeos dietéticos na microbiota intestinal de seres humanos, os dados ainda são escassos. Em um estudo controlado com 10 indivíduos (estado nutricional não informado), houve alteração da microbiota fecal 24h após o início de dieta hiperlipídica/pobre em fibra ou hipolipídica/rica em fibras, sem afetar os enterotipos (WU et al., 2011). O referido estudo foi dividido em 2 partes, sendo que a composição da microbiota fecal de adultos foi avaliada em um estudo transversal com 98 indivíduos e reportaram que os enterotipos estão associados com hábitos alimentares a longo prazo. Uma dieta rica em proteína e gordura animais, típica alimentação de sociedades ocidentais, favorece o enterotipo *Bacteroides*, enquanto o enterotipo *Prevotella* prevalece dentre aqueles indivíduos com maior consumo de fibras, frutas e vegetais (DORÉ; BLOTTIÈRE, 2015; WU

et al., 2011). Vale ressaltar que ambos os enterotipos estão contemplados no filo *Bacteroidetes*, o qual parece estar diminuído em indivíduos com excesso de peso (ARMOUGOM et al., 2009).

Considerando todos os estudos apresentados (animais e humanos), verifica-se que ainda não há consenso em relação às formas como os lipídeos dietéticos modulam a composição da microbiota intestinal. No entanto, há fortes evidências oriundas dos estudos com animais de que essa microbiota varia com o tipo de gordura dietética, visto que o consumo de AGPI n-3 e CLA foram benéficos, ao contrário de AGPI n-6 e AG saturados. A seguir, elucidaremos possíveis mecanismos que envolvem a capacidade antibacteriana dos lipídeos e conseqüentemente a modulação da microbiota intestinal.

### **Mecanismos envolvidos no controle da obesidade**

Dentre os fatores que influenciam a composição da microbiota, a dieta é o mais fácil de ser modificado e a forma mais acessível de intervenção terapêutica (WU et al., 2011). Neste sentido, os lipídeos dietéticos podem modular a microbiota intestinal e, assim exercer papel no controle da obesidade. Os lipídeos regulam a capacidade pró/anti-inflamatória da dieta, além de aumentar a abundância de bactérias benéficas (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2013), aumentando a produção de AGCC ao favorecer uma microbiota saudável (RÍOS-COVIÁN et al., 2016).

#### *Atividade antimicrobiana e modulação da microbiota intestinal*

Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi confirmado que os AGL, mesmo em doses muito pequenas, possuem alta atividade antibacteriana (dados ainda não publicados). Assim, os lipídeos são promissores agentes contra as bactérias, uma vez que seu mecanismo de ação envolve efeitos sobre o envelope celular (JACKMAN et al., 2016), reduzindo a frequência de mutações que podem resultar em estirpes resistentes. Esse pode ser mais um ponto positivo em relação ao uso de lipídeos como estratégias para controle do crescimento de bactérias intestinais relacionadas à obesidade. Em comparação à ação do antibióticos, estes inibem enzimas envolvidas em partes específicas do ciclo de vida bacteriano, aumentando a probabilidade de ocorrência de estirpes resistentes (LING et al., 2015), ao contrário dos lipídeos.

Os lipídeos dietéticos podem diminuir algumas espécies e/ou gêneros que estão relacionados ao excesso de peso (CHAPLIN et al., 2015; DAVID et al., 2014). A atividade

antibacteriana de cada lipídeo depende da sua composição de AG, bem como da sua estrutura e forma, como o tamanho da cadeia carbônica e a presença, número, posição e orientação de duplas ligações. O grupamento –OH do grupo carboxil parece ser relevante para a atividade antibacteriana dos AGL (ZHENG et al., 2005). Para tal efeito, a ação da lipase pancreática com o auxílio da colipase digere de 50 a 70% dos lipídeos dietéticos. Juntas, elas hidrolisam os TAG e diacilglicerol (DAG) nas posições *sn*-1 e/ou *sn*-3, resultando em moléculas de 2-monoacilglicerol (2-MAG) e ácidos graxos livres (BIRARI; BHUTANI, 2007). Os 2-MAG são a principal forma de MAG absorvida no intestino delgado. Esses 2-MAG são rearranjados resultando na completa degradação do MAG, liberando glicerol e AGL. Acredita-se que cerca de 7% dos AG resultantes do processo de digestão, após ingestão de dieta normolipídica e em indivíduos saudáveis, não são absorvidos e são excretados pelas fezes (GABERT et al., 2011). Esta porção de AGL passará pelo intestino delgado e pelo intestino grosso, locais onde poderá exercer efeitos antimicrobianos contra as bactérias intestinais, modulando a microbiota.

Em geral, AG e MAG possuem amplo espectro de atividade antibacteriana por causarem a lise da membrana celular bacteriana (JACKMAN et al., 2016), solubilizando-a (SHILLING et al., 2013) ou por causar efeitos indiretos que afetam o metabolismo celular (SHEU; FREESE, 1972) (Figura 1). Eles funcionam como surfactantes leves que perturbam as membranas das células bacterianas, causando efeitos bacteriostático ou bactericida (HEERKLOTZ, 2008).

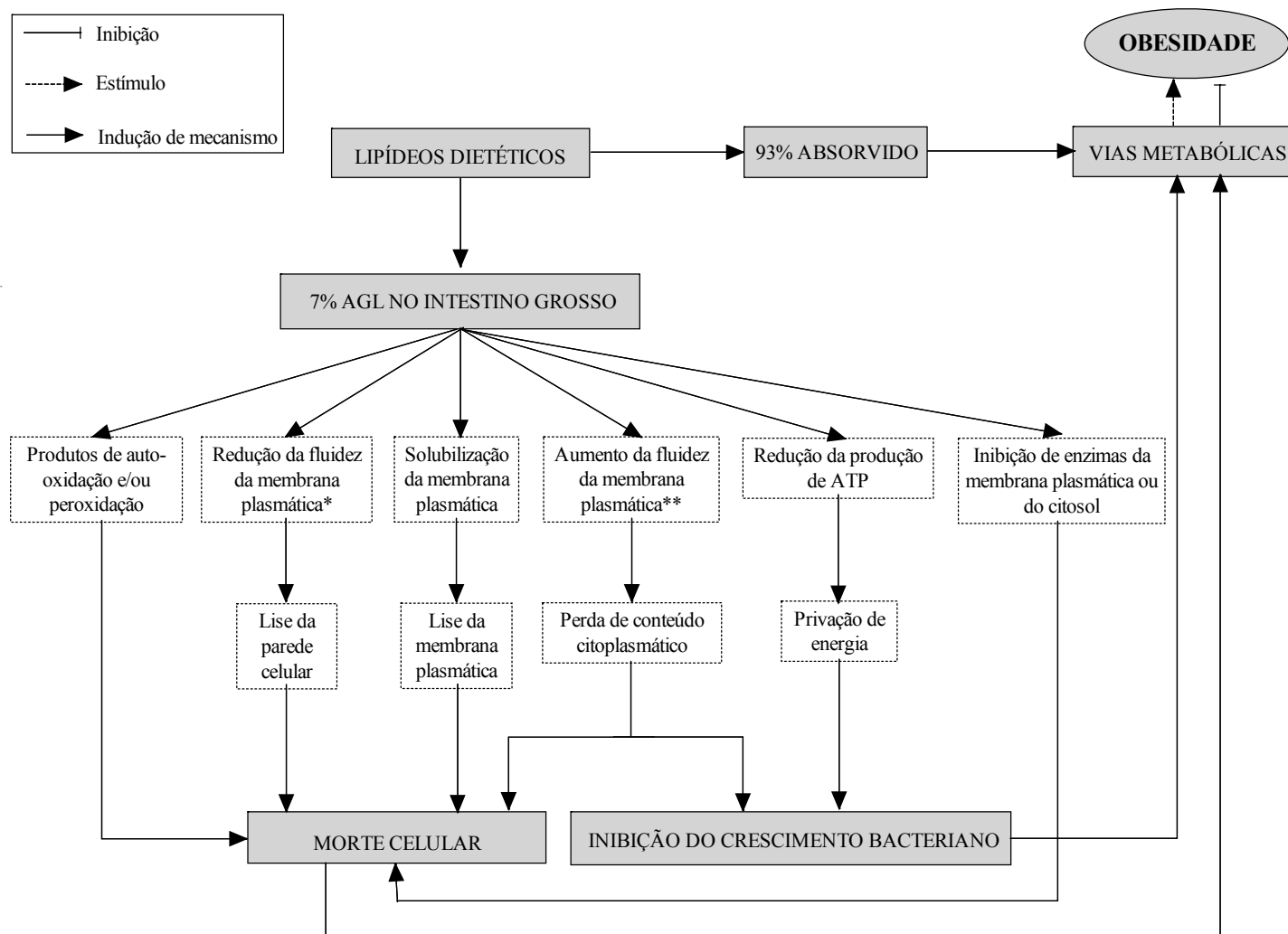


Figura 1. Possíveis mecanismos de indução da morte celular bacteriana ou de inibição do crescimento bacteriano exercidos pelos ácidos graxos livres que resultam em alterações do metabolismo do hospedeiro. AGL: ácidos graxos livres. \*Mecanismo estabelecido para ácidos graxos saturados. \*\* Mecanismo estabelecido para ácidos graxos insaturados.

O efeito detergente dos AG, em razão de sua estrutura anfipática, pode levar à solubilização da membrana celular levando à lise celular (DESBOIS; SMITH, 2010). Os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e de cadeia longa (AGCL) tanto saturados como insaturados, também podem impedir a regulação do metabolismo e/ou produção de energia pela célula, inibindo o crescimento bacteriano (JACKMAN et al., 2016). Quando ganham acesso à membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os AG prejudicam a transferência de elétrons, reduzem a produção de ATP e privam a célula da sua fonte essencial de energia (SHEU; FREESE, 1972), afetando sua sobrevivência.

Dentre os AG saturados, o ácido láurico (C-12) possui a melhor atividade antimicrobiana, seguido do cáprico (C-10) (KABARA et al., 1972). Em estudo *in vitro* e *in vivo* (humanos), o ácido láurico foi eficaz contra *Staphylococcus aureus* (NAKATSUJI et al., 2009). A obesidade, bem como a hiperglicemia e adiposidade elevada relacionadas ao excesso de peso, foram associadas com infecção por *S. aureus* (OLSEN et al., 2013). O efeito antimicrobiano do ácido láurico pode ser potencializado quando esterificado a glicerol, resultando em monolaurim, o MAG de cadeia média com maior atividade antibacteriana. O monolaurim é ativo contra bactérias Gram-positivas patogênicas e de deterioração (BATOVSKA et al., 2009), porém não foram identificados estudos que avaliassem seu efeito contra bactérias do TGI. Tais estudos são de extrema relevância devido à relação entre microbiota intestinal e obesidade. Considerando a ampla atividade antimicrobiana do ácido láurico, pressupõe-se que, caso eles ajam contra bactérias que estão aumentadas no TGI de indivíduos com excesso de peso, este AGL pode modular a microbiota intestinal destes indivíduos e assim auxiliar no controle da obesidade. Em adição, podem ocorrer interações sinérgicas entre o monolaurim e compostos alimentares como fosfatos, antioxidantes e acidulante (BATOVSKA et al., 2009), intensificando o efeito antimicrobiano. Ácido láurico e ácido cáprico também retardam o crescimento de *S. aureus* (SADO KAMDEM et al., 2008) e reduzem a biossíntese *de novo* de AG (SADO-KAMDEM; VANNINI; GUERZONI, 2009). A biossíntese de AG é essencial para as bactérias pois produzem compostos lipídicos essenciais, incluindo suas membranas celulares (ZHENG et al., 2005).

Em relação aos AG insaturados (cadeia média e longa), eles tendem a ser mais ativos contra bactérias Gram-positivas que Gram-negativas e, em geral, são mais potentes que os saturados, de mesma cadeia carbônica (KABARA et al., 1972). A membrana externa de Gram-negativas se comporta como uma barreira à entrada dos AG, enquanto a parede celular das Gram-positivas permite a passagem e distribuição de AG para a membrana citoplasmática (SADO-KAMDEM; VANNINI; GUERZONI, 2009), facilitando a ação dos agentes



antimicrobianos. Em relação às duplas ligações, estas possuem relação direta com a eficácia dos AG insaturados. As duplas ligações que ocorrem naturalmente nos AG apresentam tipicamente orientação *cis* e estes tendem a possuir maior atividade antibacteriana que aqueles com duplas ligações em orientação *trans* (KABARA et al., 1972). Isso ocorre, provavelmente, porque as estruturas destes AG insaturados *trans* assemelham-se às dos AG saturados (DESBOIS; SMITH, 2010). Ainda, Zheng et al. (2005) demonstraram que AGPI, semelhante aos AGS, também dificultam a biossíntese bacteriana de AG *in vivo*, que, por sua vez, afeta a composição da membrana celular, alterando seu funcionamento e prejudicando a captação de nutrientes (DESBOIS; SMITH, 2010).

AGPI como alfa-linolênico (C-18:3), linoléico (C-18:2) e oleico (C-18:1) também merecem destaque por sua ação antimicrobiana (BATOVSKA et al., 2009; HUANG; EBERSOLE, 2010; MAIA et al., 2007). A ação antibacteriana de AG insaturados é mediada principalmente pela inibição de diversas enzimas, da membrana ou do citosol, que são cruciais para a sobrevivência e crescimento das bactérias (SADO-KAMDEM; VANNINI; GUERZONI, 2009; ZHENG et al., 2005). Outra possível explicação para a toxicidade dos AG insaturados está relacionada aos seus produtos de auto-oxidação ou peroxidação, derivados dos processos metabólicos e que, por si só, já são antibacterianos (DESBOIS; SMITH, 2010).

A inserção de AG insaturados na membrana citoplasmática da bactéria a torna mais fluida e permeável, levando à perda de conteúdo interno celular, inibindo o crescimento ou causando morte celular. Se a fluidez da membrana aumenta excessivamente, esta se torna instável culminando na lise celular, o que, muitas vezes, ocorre dentro de minutos (ZHANG et al., 2010). Por outro lado, AG saturados podem induzir a autólise da parede celular bacteriana em algumas espécies, possivelmente por reduzir a fluidez da membrana. Empregando um modelo de bicamada lipídica, estudo recente demonstrou como AG saturados desestabilizam a membrana, alterando sua morfologia e conseqüentemente o metabolismo bacteriano (YOON et al., 2015).

A interação específica entre lipídeos antimicrobianos e a membrana celular bacteriana ainda precisa ser melhor entendida. De fato, os lipídeos apresentam um amplo espectro de comportamentos mecanicísticos, com detalhes inerentes da estrutura química e concentração de cada composto. São escassos os estudos em que se avaliou este potencial contra microrganismos do TGI, talvez por negligenciarem este efeito, uma vez que a maior concentração de bactérias se encontra no intestino grosso (MOWAT; AGACE, 2014) e a maioria dos AG são absorvidos no intestino delgado (IQBAL; HUSSAIN, 2009). Mecanismo

semelhante foi verificado em ruminantes, onde estudo *in vitro* com AGPI n-3 e n-6 mostrou que estes AG foram efetivos contra bactérias do rúmen (MAIA et al., 2007). Limitações como solubilidade dos AG e distribuição dos microrganismos ao longo do TGI podem dificultar a determinação exata das concentrações de AG que entram em contato com tipos específicos de bactérias *in vivo* (MAIA et al., 2007). Ao extrapolar tais resultados para os seres humanos, especula-se que esses AG também sejam efetivos contra bactérias do TGI de humanos, sendo capazes de modular a microbiota de indivíduos com excesso de peso e assim, contribuir para o controle da obesidade.

#### *AGCC: metabólito da microbiota*

A ingestão de diferentes tipos de lipídeos pode aumentar a produção de AGCC, independente da quantidade de carboidratos e proteínas ingeridos (COX; BLASER, 2013). Os AGCC são fontes de energia para o epitélio colônico (POWER et al., 2014). A microbiota intestinal atua sobre as fibras dietéticas e proteínas que não foram completamente hidrolisadas pelas reações enzimáticas. A fermentação das fibras pelas bactérias do cólon resulta na formação dos AGCC (KIMURA et al., 2013), ácido acético (C-2), propiônico (C-3) e butírico (C-4) (RÍOS-COVIÁN et al., 2016). O butirato, em particular, exerce efeitos benéficos na saúde intestinal (POWER et al., 2014) ao favorecer a manutenção da barreira intestinal saudável (COX; BLASER, 2013). A integridade da barreira impede a translocação do LPS para a circulação, prevenindo o ganho de peso, adiposidade corporal e resistência insulínica (COX; BLASER, 2013).

Estudos têm demonstrado associação positiva da produção de AGCC por bactérias intestinais e o controle da obesidade com impactos positivos para a saúde (RÍOS-COVIÁN et al., 2016). Evidências recentes sugerem que maiores níveis de AGCC se associam ao menor conteúdo de gordura corporal em animais (MARQUES et al., 2015).

Além de fornecerem energia aos enterócitos, os AGCC também transmitem sinais via receptores de proteína-G acoplada GPR41 e GPR43 (ou receptores de ácidos graxos livre – FFAR 3 e 2, respectivamente). O GPR41 é igualmente ativado pelo propionato, butirato e pentatonato, enquanto o GPR43 prefere o propionato a outros AGCC (ICHIMURA et al., 2009). Os AGCC ativam o GPR41 das células enteroendócrinas, que, por sua vez, induzem a secreção do peptídeo YY, hormônio responsável por reduzir o tempo de trânsito intestinal e aumentar a saciedade (COX; BLASER, 2013). Os AGCC também ativam os receptores GPR43, expressos nos tecidos adiposo, imunológico e intestinal. Ao se ligarem ao GPR43, os

AGCC regulam a captação de energia do tecido adiposo e previnem o acúmulo de gordura nos adipócitos ao promoverem sua utilização pelo fígado (KIMURA et al., 2013). A ativação do GPR43 pelo acetato reduz a lipólise e ativa a adipogênese, indicando um potencial papel deste AG na regulação do perfil lipídico plasmático (ICHIMURA et al., 2009). Adipócitos tratados com acetato e propionato tiveram sua atividade lipolítica reduzida. Essa inibição da lipólise ocorreu devido à ativação do FFAR2, pois este efeito foi suprimido em adipócitos de animais sem este receptor (ICHIMURA et al., 2009). Ainda, um estudo conduzido em adultos com excesso de peso revelou que níveis aumentados de propionato previnem o ganho de peso. O propionato estimulou significativamente a secreção do peptídeo YY e *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), reduzindo a ingestão alimentar (CHAMBERS et al., 2015). Em conjunto, estes sinais endócrinos enviados pelos AGCC contribuem com o controle da obesidade.

A suplementação dietética com butirato protegeu ratos contra a obesidade induzida pelo consumo de gordura saturada. Esse efeito foi associado ao aumento do gasto energético, da oxidação lipídica e à manutenção dos níveis normais de glicemia (GAO et al., 2009). A melhora no controle glicêmico também foi evidenciado pelo decréscimo de 50% do valor da insulina de jejum, pela melhora na resposta ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina e pelo menor HOMA-IR em comparação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que o butirato preveniu a obesidade e a resistência insulínica nos animais (GAO et al., 2009).

Por fim, a produção de AGCC reduz o pH luminal, que, por sua vez, pode inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e aumentar a absorção de alguns nutrientes, contribuindo com a saúde do hospedeiro (MACFARLANE; MACFARLANE, 2012). A produção de AGCC parece possuir importante papel na manutenção da barreira intestinal, na composição da microbiota (RÍOS-COVIÁN et al., 2016) e, conseqüentemente, no tratamento da obesidade.

#### *Efeito anti-inflamatório e outros benefícios*

A disbiose intestinal está associada à endotoxemia metabólica e inflamação de baixo grau, observada na obesidade (LEY et al., 2006). Em indivíduos com excesso de peso, a diversidade do microbioma foi considerada fator preditivo de resposta reduzida à dieta hipocalórica, em termos de perda de peso e melhoria do metabolismo e perfil inflamatório (COTILLARD et al., 2013). A conexão entre microbiota intestinal e inflamação de baixo grau, com infiltração de macrófagos nos tecidos adiposo, muscular e hepático, caracteriza a

progressão da obesidade a distúrbios metabólicos (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2013).

O metabolismo do propionato e do butirato ganhou a atenção dos pesquisadores nos últimos anos devido à conexão dos baixos níveis de populações de bactérias produtoras destes compostos em algumas doenças em que o processo inflamatório está presente (RÍOS-COVIÁN et al., 2016). Em um amplo estudo foi constatado uma menor abundância de bactérias produtoras de butirato nas fezes de pacientes com diabetes tipo 2 comparados com grupo controle de indivíduos saudáveis (QIN et al., 2012), sugerindo um papel protetor do butirato em doenças metabólicas relacionadas à obesidade. Ademais, o butirato possui propriedades anti-inflamatórias. Ele é capaz de regular a função da barreira intestinal e impedir a passagem de LPS do lúmen intestinal para a circulação sistêmica (YANG; ROSE, 2014), prevenindo a endotoxemia metabólica e a inflamação de baixo grau associadas à obesidade (KALIANNAN et al., 2015).

A dieta afeta a composição de AG das membranas celulares dos diversos tecidos, sendo o AGPI n-3 o de maior interesse entre os pesquisadores. A maioria dos fosfolípidos dos tecidos são responsivos a alterações no conteúdo de AGMI e AGPI da dieta, incrementando o conteúdo desses AG à medida que sua ingestão aumenta (ABBOTT et al., 2012; ANDERSSON et al., 2002). Em contrapartida, variações da quantidade de AGS ingeridos não interferem em seu teor das membranas. Os TG do tecido adiposo são os mais responsivos às modificações na dieta, tanto de AGS como de AGMI e AGPI (ABBOTT et al., 2012). Sabe-se que a composição de AG da dieta influencia a inflamação ao transformar o perfil de AG das membranas e do tecido adiposo, alterando a disponibilidade de substratos para eicosanoides pró-inflamatórios (como o ácido araquidônico, C20:4 n6) ou anti-inflamatórios (ácido eicosapentaenóico – C20:5n-3- e ácido docosahexaenóico – C2:6n-3) (CALDER, 2011). Assim, o consumo excessivo de AGPI n-6, característico da dieta ocidental, resulta no desequilíbrio da proporção de n-3/n-6. Esse desequilíbrio culmina no aumento das concentrações de ácido araquidônico e, portanto, da inflamação crônica e de suas doenças associadas, como obesidade (ABBOTT et al., 2012).

Ademais, a interação entre a composição de ácidos graxos dos tecidos e a microbiota intestinal desempenha importante papel no efeito anti-inflamatório exercido pelo AGPI n-3. O elevado conteúdo de AGPI n-3 nos tecidos mostrou-se capaz de aumentar a produção e secreção da enzima fosfatase alcalina intestinal, a qual induz alterações na composição da microbiota. Assim, resultando no decréscimo da produção de LPS e da permeabilidade intestinal, reduzindo a endotoxemia metabólica e a inflamação (KALIANNAN et al., 2015). A fosfatase alcalina intestinal é um peptídeo antimicrobiano endógeno com numerosas

funções fisiológicas (LALLÈS, 2010). Ela é altamente expressa no intestino delgado, secretada por enterócitos apicais para o lúmen e se desloca para o intestino grosso (KALIANNAN et al., 2015). Esta enzima também é conhecida por inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas por meio da desfosforilação do ATP, prevenir o super-crescimento de *Escherichia coli* e outras Gram-negativas devido à sua capacidade de desfosforilar o LPS localizado na membrana externa (KOYAMA et al., 2002) e promover o crescimento de bactérias comensais do TGI (MALO et al., 2014). Assim, AGPI n-3 (como EPA e DHA) destacam-se por suas propriedades anti-inflamatórias (COELHO et al., 2016), que estão relacionadas à redução a endotoxemia metabólica (KALIANNAN et al., 2015) e alterações positivas na microbiota intestinal (PUSCEDDU et al., 2015).

Além dos AGCC, a microbiota intestinal humana também sintetiza vitamina K na forma de menaquinona (OHSAKI et al., 2006). Estudos reportaram efeitos benéficos da vitamina K no controle da obesidade e de suas comorbidades, tais como a redução da concentração de triglicerídeos, da gordural corporal (SOGABE et al., 2011) e da inflamação induzida por LPS (OHSAKI et al., 2006). A alta ingestão de vitamina K foi ainda associada à melhora da sensibilidade à insulina, menor perímetro da cintura, a menores valores de IMC e de pressão arterial sistêmica (DAM et al., 2015). A composição alterada da microbiota de indivíduos com excesso de peso pode prejudicar a produção de vitamina K pelas bactérias intestinais. Assim, de forma indireta, a modulação exercida pelos lipídeos na população bacteriana colônica pode favorecer o controle da obesidade também via síntese de vitamina K e seus benefícios.

## **Conclusões e perspectivas**

Em suma, os resultados dos estudos sugerem que a modulação da abundância das populações bacterianas específicas, como o aumento de *Bacteroidetes* e a redução de *Firmicutes*, pode ser benéfica no tratamento da obesidade. A qualidade dos lipídeos da dieta afeta, de formas distintas, e diretamente a integração entre os AGL, a microbiota intestinal e obesidade. Apesar do CLA promover alterações benéficas na composição da microbiota intestinal, mais estudos são necessários para compreender melhor o efeito dos isômeros do CLA na microbiota e saúde do hospedeiro. O consumo de AGPI n-3 promove alterações favoráveis na microbiota intestinal de indivíduos obesos, aproximando-a daquela de indivíduos eutróficos, ao contrário dos AGS. Devido à escassez de estudos clínicos controlados de longa duração em humanos, esta complexa interação ainda não é inteiramente

compreendida pela comunidade científica. No entanto, a forte atividade antimicrobiana exercida pelos AGL, bem como seus efeitos secundários na microbiota intestinal (produção de AGCC, efeito anti-inflamatório e síntese de vitamina K) sugerem o potencial uso terapêutico especialmente dos AGPIS no tratamento da obesidade, atuando como o elo entre o intestino e a saúde metabólica do hospedeiro.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Referências**

ABBOTT, S. K. et al. Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 5, p. 1309–1317, maio 2012.

ANDERSSON, A. et al. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1222–9, dez. 2002.

ANGELAKIS, E. et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 91–109, jan. 2012.

ARMOUGOM, F. et al. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7125, 23 set. 2009.

BATOVSKA, D. I. et al. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. **Polish journal of microbiology**, v. 58, n. 1, p. 43–7, 13 nov. 2009.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19-20, p. 879–889, out. 2007.

BRAHE, L. K.; ASTRUP, A.; LARSEN, L. H. Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? **Obesity Reviews**, v. 14, n. 12, p. 950–959, 11 dez. 2013.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. SUPPL. 1, p. S50–S58, set. 2011.

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

CHAMBERS, E. S. et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut**, v. 64, n. 11, p. 1744–1754, nov. 2015.

CHAPLIN, A. et al. Conjugated Linoleic Acid Supplementation under a High-Fat Diet Modulates Stomach Protein Expression and Intestinal Microbiota in Adult Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0125091, 27 abr. 2015.

CHEN, L. et al. Gene expression profiling gut microbiota in different races of humans. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23075, 15 mar. 2016.

CLARKE, S. F. et al. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 3, p. 186–202, 27 maio 2012.

COELHO, O. G. L. et al. Polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: impact on the glycemic control mechanism. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 00–00, 6 fev. 2016.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 585–588, 28 ago. 2013.

COX, L. M.; BLASER, M. J. Pathways in Microbe-Induced Obesity. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 883–894, jun. 2013.

DAM, V. et al. Association Between Vitamin K and the Metabolic Syndrome: A 10-Year Follow-Up Study in Adults. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 6, p. 2472–2479, jun. 2015.

DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 11 jan. 2014.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 3 fev. 2010.

DEVKOTA, S. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10<sup>-/-</sup>* mice. **Nature**, v. 487, n. 7405, p. 104–8, 13 jun. 2012.

DI MAIO, S.; CARRIER, R. L. Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 2, p. 110–122, abr. 2011.

DORÉ, J.; BLOTTIÈRE, H. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 195–199, abr. 2015.

FAVA, F. et al. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 2, p. 216–223, 13 fev. 2013.

- GABERT, L. et al. <sup>13</sup>C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-<sup>13</sup>C]tripalmitin and [1,1,1-<sup>13</sup>C]triolein. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 19, p. 2697–2703, 15 out. 2011.
- GAO, Z. et al. Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1509–1517, 1 jul. 2009.
- GAULLIER, J.-M. et al. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 03, p. 550, 21 mar. 2007.
- GHOSH, S. et al. Diets rich in n-6 AGPI induce intestinal microbial dysbiosis in aged mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 03, p. 515–523, 8 ago. 2013.
- GOMES, J. M. G.; COSTA, J. A.; ALFENAS, R. C. Could the beneficial effects of dietary calcium on obesity and diabetes control be mediated by changes in intestinal microbiota and integrity? **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 11, p. 1756–1765, 24 dez. 2015.
- HEERKLOTZ, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, n. 3-4, p. 205, 11 nov. 2008.
- 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.
- HUANG, C. B.; EBERSOLE, J. L. A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 75–80, fev. 2010.
- HULLAR, M. A. J.; FU, B. C. Diet, the Gut Microbiome, and Epigenetics. **The Cancer Journal**, v. 20, n. 3, p. 170–175, jan. 2014.
- ICHIMURA, A. et al. Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 89, n. 3-4, p. 82–88, set. 2009.
- IERARDI, E. et al. Macronutrient intakes in obese subjects with or without small intestinal bacterial overgrowth: an alimentary survey. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 51, n. 3, p. 277–80, 2016.
- IQBAL, J.; HUSSAIN, M. M. Intestinal lipid absorption. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1183–E1194, 1 jun. 2009.
- JACKMAN, J. et al. Nanotechnology Formulations for Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 305, 3 mar. 2016.
- KABARA, J. K. et al. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23–28, 1972.
- KALIANNAN, K. et al. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. **Scientific Reports**, v. 5, n.



February, p. 11276, 11 jun. 2015.

KIMURA, I. et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. **Nature Communications**, v. 4, n. May, p. 1829, 7 maio 2013.

KOYAMA, I. et al. Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and in vitro through dephosphorylation. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 455–461, set. 2002.

LALLÈS, J.-P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutrition reviews**, v. 68, n. 6, p. 323–32, jun. 2010.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, 21 dez. 2006.

LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 7 jan. 2015.

LUCERA, A. et al. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 1–13, 2012.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 1, p. 50–60, 1 jan. 2012.

MAIA, M. R. G. et al. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 4, p. 303–314, 28 maio 2007.

MALO, M. S. et al. Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 306, n. 10, p. G826–G838, 15 maio 2014.

MARQUES, T. M. et al. Dietary trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters fatty acid metabolism and microbiota composition in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 05, p. 728–738, 20 mar. 2015.

MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 6, p. 817–825, 9 jun. 2012a.

MILLION, M. et al. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, n. 2, p. 100–108, ago. 2012b.

MOREIRA, A. P. B.; ALFENAS, R. DE C. G. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance. **Nutrición hospitalaria**, v. 27, n. 2, p. 382–90, 2012.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 19 set. 2014.

- MU, H.; HØY, C.-E. The digestion of dietary triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 105–133, mar. 2004.
- MUJICO, J. R. et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 04, p. 711–720, 10 ago. 2013.
- MURPHY, E. A.; VELAZQUEZ, K. T.; HERBERT, K. M. Influence of high-fat diet on gut microbiota. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 5, p. 515–520, set. 2015.
- MURPHY, E. F. et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v. 59, n. 12, p. 1635–1642, 1 dez. 2010.
- NAKATSUJI, T. et al. Antimicrobial Property of Lauric Acid Against Propionibacterium Acnes: Its Therapeutic Potential for Inflammatory Acne Vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 10, p. 2480–2488, out. 2009.
- O'FLAHERTY, S. et al. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? **Gut Microbes**, v. 1, n. 5, p. 293–300, 27 set. 2010.
- OHSAKI, Y. et al. Vitamin K Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in the Rat. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 926–932, jan. 2006.
- OLSEN, K. et al. Obesity and Staphylococcus aureus Nasal Colonization among Women and Men in a General Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 19–25, 2013.
- PARKS, B. W. et al. Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 141–152, jan. 2013.
- POWER, S. E. et al. Intestinal microbiota, diet and health. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 03, p. 387–402, 12 fev. 2014.
- PUSCEDDU, M. M. et al. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids (AGPIs) Reverse the Impact of Early-Life Stress on the Gut Microbiota. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139721, 1 out. 2015.
- QIN, J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55–60, 26 set. 2012.
- RÍOS-COVIÁN, D. et al. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–9, 17 fev. 2016.
- SADO KAMDEM, S. et al. Effect of capric, lauric and  $\alpha$ -linolenic acids on the division time distributions of single cells of Staphylococcus aureus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 122–128, nov. 2008.
- SADO-KAMDEM, S. L.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Effect of  $\alpha$ -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in Staphylococcus aureus. **International Journal of**

**Food Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 288–294, fev. 2009.

SALONEN, A.; DE VOS, W. M. Impact of Diet on Human Intestinal Microbiota and Health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 239–262, 28 fev. 2014.

SHEU, C. W.; FREESE, E. Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 111, n. 2, p. 516–24, ago. 1972.

SHILLING, M. et al. Antimicrobial Effects of Virgin Coconut Oil and Its Medium-Chain Fatty Acids on *Clostridium difficile*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 12, p. 1079–1085, dez. 2013.

SHINO, B. et al. Comparison of Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Coconut Oil, Probiotics, and Ketoconazole on *Candida albicans* Isolated in Children with Early Childhood Caries: An In Vitro Study. **Scientifica**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

SOGABE, N. et al. Effects of long-term vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. **Bone**, v. 48, n. 5, p. 1036–1042, maio 2011.

SWINBURN, B. A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 804–814, ago. 2011.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 3, p. 160–168, mar. 2013.

TURNBAUGH, P. J. et al. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 4, p. 213–223, abr. 2008.

TURNBAUGH, P. J. et al. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 6, p. 6ra14–6ra14, 11 nov. 2009.

VERALLO-ROWELL, V. M.; DILLAGUE, K. M.; SYAH-TJUNDAWAN, B. S. Novel Antibacterial and Emollient Effects of Coconut and Virgin Olive Oils in Adult Atopic Dermatitis. **Dermatitis**, v. 19, n. 6, p. 308–15, 2008.

WALTER, J.; LEY, R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 411–429, 13 out. 2011.

WEST, C. E. et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: Associations and potentials for gut microbiota therapies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 3–13, jan. 2015.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 7 out. 2011.

YANG, J.; ROSE, D. J. Long-term dietary pattern of fecal donor correlates with butyrate

production and markers of protein fermentation during in vitro fecal fermentation. **Nutrition Research**, v. 34, n. 9, p. 749–759, set. 2014.

YOON, B. K. et al. Spectrum of Membrane Morphological Responses to Antibacterial Fatty Acids and Related Surfactants. **Langmuir**, v. 31, n. 37, p. 10223–10232, 22 set. 2015.

ZHANG, H. et al. Characterization and antimicrobial activity of a pharmaceutical microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 154–160, ago. 2010.

ZHENG, C. J. et al. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579, n. 23, p. 5157–5162, 26 set. 2005.

## **ARTIGO 2: Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do óleo de coco virgem e azeite de oliva extra virgem**

### **Resumo**

**Introdução:** O óleo de coco virgem e o azeite de oliva extra virgem são óleos vegetais de composições muito distintas e que são comumente consumidos com objetivo de controlar a obesidade e promover a saúde. **Objetivo:** Investigar e comparar a ocorrência e concentração de compostos bioativos e capacidade antioxidante *in vitro* de diferentes marcas comerciais de azeite de oliva extra virgem e óleo de coco virgem. **Materiais e métodos:** A capacidade antioxidante foi verificada por meio do teste de DPPH. Foram investigadas a ocorrência e concentração dos oito isômeros de vitamina E, flavonoides e compostos fenólicos totais. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), exceto os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, que foram analisados por meio de espectrofotometria. **Resultados:** O azeite de oliva possui os isômeros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -tocoferol, enquanto o óleo de coco possui  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocotrienol. O azeite de oliva possui maior teor de vitamina E total que o óleo de coco. O único carotenóide identificado foi a luteína, nas amostras de azeite de oliva. Não detectamos a ocorrência de flavonoides em nenhuma amostra. As marcas de óleo de coco apresentaram conteúdo inferior de compostos fenólicos em relação ao azeite de oliva. As marcas de azeite de oliva apresentaram percentual de inibição do radical DPPH dez vezes maior que as do óleo de coco. **Conclusão:** Constatamos que as diferentes marcas de um mesmo tipo de óleo analisadas neste estudo apresentaram diferença na composição dos compostos antioxidantes. O azeite de oliva extra virgem possui melhor perfil de compostos bioativos e maior atividade antioxidante que o óleo de coco.

**Palavras-chave:** Óleo de coco, azeite de oliva, atividade antioxidante, compostos fenólicos, vitamina E.

## **Abstract**

**Introduction:** Virgin coconut oil and extra virgin olive oil are vegetable oils of very different compositions and are commonly consumed in order to control obesity and promote health.

**Objective:** To investigate and compare the occurrence and concentration of bioactive compounds and in vitro antioxidant capacity from different brands of extra virgin olive oil and virgin coconut oil.

**Methods:** The antioxidant capacity was evaluated by the DPPH test. It was investigated the occurrence and concentration of the eight vitamin E isomers, flavonoids and phenolic compounds. Analyses were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), except for phenolic compounds and antioxidant activity, which were by spectrophotometry. **Results:** Olive oil samples showed the isomers  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -tocopherol while coconut oil showed  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -tocotrienol. Olive oil samples have higher vitamin E content comparing to coconut oil. The only carotenoid identified was lutein, in olive oil samples. We did not detect the occurrence of flavonoids in any sample. The coconut oil brands showed lower compounds phenolics content compared to olive oil. The olive oil brands showed DPPH radical inhibition percentage ten times the coconut oil. **Conclusion:** We conclude that different brands of the same type of oil showed differences in antioxidant compounds composition. The extra virgin olive oil has a better profile of bioactive compounds and antioxidant activity that coconut oil.

**Key-words:** Antioxidant activity, virgin coconut oil, extra virgin olive oil, phenolic compounds, vitamin E.

## Introdução

O óleo de coco virgem e o azeite de oliva extra virgem são óleos vegetais de composições muito distintas e que são comumente consumidos com objetivo de controlar a obesidade e promover a saúde. A obesidade é caracterizada pela inflamação crônica de baixo grau acompanhada de aumento progressivo do estresse oxidativo (WONG et al., 2015). Ela se tornou um problema de saúde mundial, que se agrava ao longo dos anos (IBGE, 2010) e que está diretamente relacionada às complicações de diversas morbidades, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensão e alguns tipos de câncer (DE HEREDIA; GÓMEZ-MARTÍNEZ; MARCOS, 2012). Embora a etiologia da obesidade seja multifatorial e complexa, a dieta é um de seus principais fatores determinantes. Sugere-se que a qualidade da gordura ingerida seja fundamental para a obtenção de bons resultados no controle da obesidade (ENNS et al., 2014).

O azeite de oliva (*Olea europaea L.*) extra virgem é um alimento funcional, em virtude de ser excelente fonte de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e de compostos fenólicos (cerca de 30 compostos diferentes), os quais atuam como antioxidantes, além conter vitamina E e carotenoides. Admite-se que o consumo de gordura monoinsaturada possa atenuar a inflamação (PAPAGEORGIOU et al., 2011), exercer efeito antioxidante e diminuir o colesterol sanguíneo (SPOSITO et al., 2007). Divulga-se que os efeitos antioxidante e anti-inflamatório resultantes do consumo do azeite extra virgem podem auxiliar no combate à obesidade (COVAS; DE LA TORRE; FITÓ, 2015).

Por outro lado, o consumo diário de óleo de coco (*Cocos nucifera L.*), popularmente adotado como estratégia para controle da obesidade, necessita ser melhor estudado pois os dados na literatura ainda são insuficientes para dar suporte a tal efeito benéfico. O óleo de coco contém cerca de 90% de ácidos graxos saturados, sendo mais de 60% destes ácidos graxos de cadeia média. Devido à sua composição química e perfil de ácidos graxos, é um óleo de fácil digestibilidade e absorção (MARINA et al., 2009). Acredita-se que seus compostos bioativos são os principais responsáveis pelos benefícios atribuídos ao óleo de coco, como efeito antioxidante (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; VYSAKH et al., 2014) e anti-inflamatório (VYSAKH et al., 2014).

Muitos estudos que investigam a ocorrência destes compostos bioativos com ação antioxidante empregam óleos de coco e azeite de oliva sintetizados no próprio laboratório de

pesquisa (ARLEE; SUANPHAIROCH; PAKDEECHANUAN, 2013; BRENES et al., 1999; FRANCO et al., 2014; MURKOVIC et al., 2004; SENEVIRATNE; HAPUARACHCHI; EKANAYAKE, 2009; SENEVIRATNE; SUDARSHANA DISSANAYAKE, 2008). Portanto, considerando a distinta composição destes óleos e sua aplicabilidade no controle da obesidade, a análise e comparação de marcas comerciais torna-se relevante e necessária. Desta forma, este estudo tem por objetivo investigar e comparar a ocorrência e concentração de compostos bioativos e capacidade antioxidante *in vitro* de diferentes marcas comerciais de azeite de oliva extra virgem e óleo de coco virgem.

## **Materiais e métodos**

### *Amostras testadas*

Foram utilizados três marcas comerciais distintas de azeite de oliva extra virgem e três de óleo de coco virgem prensado a frio, adquiridos em embalagens devidamente lacradas. As marcas selecionadas são devidamente regulamentadas pela ANVISA (BRASIL, 1999). As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas e Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde, Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Laboratório de Síntese de Agroquímicos do Departamento de Química, todos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

### *Perfil de ácidos graxos dos óleos*

Por se tratarem de amostras de óleos, a etapa de extração foi dispensada. A esterificação e a saponificação foram realizadas de acordo com Hartman e Lago (1973). Foram adicionados 2,4 mL do reagente de saponificação (NaOH 2% em metanol) a 30 mg de amostra, os quais foram mantidos no banho-maria por 15 minutos à 80°C. Posteriormente, foram adicionados 6 mL de reagente de esterificação (cloreto de amônia, metanol e ácido sulfúrico concentrado) e o processo do banho-maria foi repetido. As amostras foram deixadas em repouso por 5 minutos para redução da temperatura (40°C). A seguir, foram adicionados 0,5 mL de hexano (grau analítico, Vetec – Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e 1,5 mL de NaCl (20%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e homogeneizados em vórtex por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para eppendorfs, onde a amostra foi seca com nitrogênio e armazenada a -20°C para análise posterior.



As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo CG Solution), equipado com detector FID, coluna capilar Carbowax (30 m x 0,25 mm). Para a separação cromatográfica, 1 µL de amostra foi injetado em sistema Split = 10. Gás nitrogênio foi utilizado como carreador, com velocidade linear programada para 43.2 cm/s. Os gases hidrogênio e o ar sintético formaram a chama no detector. As temperaturas do injetor e do detector foram controladas isotérmicas em 200°C e 220°C. A temperatura inicial da coluna foi de 150°C (mantida por 5 minutos), aumentando em 4°C por minuto até atingir 220°C (mantida por 20 minutos). O fluxo do gás de arraste na coluna foi de 1,0 mL/minuto. O registro e análise dos cromatogramas foram feitos no programa GC Solution.

### *Conteúdo de vitamina E*

Foi investigada a ocorrência e a concentração dos 8 componentes da vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  tocoferóis e tocotrienóis) nos óleos, em triplicata. A análise dos componentes foi realizada de acordo com Pinheiro-Sant'Ana *et al.* (2011), com algumas modificações. Aproximadamente 0,1 g de óleo foram diluídos em 2 mL de hexano (grau HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e filtrados em unidades filtrantes de porosidade 0,45 µm. As análises dos componentes da vitamina E foram realizadas injetando-se 50 µL dos extratos previamente preparados do óleo de coco e 30 µL dos extratos de azeite de oliva.

As condições cromatográficas utilizadas foram: sistema HPLC (Shimadzu modelo SCL 10AT VP, Japão); detector de fluorescência (Shimadzu RF10AXL) operando a 290 nm de excitação e 330 nm de emissão; coluna cromatográfica Phenomenex Luna Si100 (250 x 4 mm, 5 µm) acoplada de coluna de guarda (Phenomenex Si100 4 mm x 3 mm); fase móvel – hexano: isopropanol: ácido acético glacial (grau HPLC, Tedia, Brasil) (98,9: 0,6: 0,5, v/v/v); fluxo da fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente e tempo de corrida de 22 min.

A identificação dos componentes da vitamina E foi realizada comparando-se o tempo de retenção dos padrões aos obtidos para as amostras analisadas sob as mesmas condições. Para a quantificação dos compostos, foram utilizadas curvas analíticas construídas a partir da injeção, em duplicata, de soluções padrão com diferentes concentrações dos componentes da vitamina E identificados nas amostras.

### *Extração e análise de carotenoides*

Foi investigada a ocorrência e a concentração de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina nos óleos. Os carotenoides foram extraídos de acordo com Rodriguez-Amaya (2001), com modificações. Cerca de 5 g de óleo foram adicionados a 60 mL de acetona (grau analítico, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e homogeneizados por 4 minutos. A suspensão foi filtrada e a partição dos carotenoides foi feita da acetona para o éter de petróleo.

Para análise, 10 mL de extrato foram evaporados sob fluxo de nitrogênio gasoso, e o resíduo seco foi retomado em 2,0 mL de acetona. O extrato foi filtrado em unidades com porosidade de 0,45  $\mu$ m e foram injetados volumes de 50  $\mu$ L e 200  $\mu$ L, para amostras de azeite de oliva e óleo de coco, respectivamente.

As análises de carotenoides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando as seguintes condições cromatográficas: sistema HPLC, detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M10 AVP, Shimadzu) com detecção a 450 nm; coluna cromatográfica Si 100 (Phenomenex Luna® 250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) acoplada com pré-coluna de guarda Si100 (C18) (Phenomenex ODS, 4 mm x 3 mm); fase móvel composta por hexano: isopropanol (grau HPLC, Tedia, Brasil) (95:5, v/v); eluição isocrática; fluxo da fase móvel de 1,5 mL/min, temperatura 25°C, tempo de corrida de 20 min e comprimento de onda de 450nm (PANFILI; FRATIANNI; IRANO, 2004).

A identificação dos carotenoides foi realizada comparando-se o tempo de retenção e o espectro de absorção dos padrões com os obtidos para as amostras analisadas sob as mesmas condições. Para a quantificação, foram utilizadas curvas analíticas construídas a partir da injeção, em duplicata, de soluções padrão com diferentes concentrações.

### *Extração e análise de flavonoides*

Foi investigado, em triplicata, a ocorrência e a concentração dos seguintes flavonoides nos óleos: 3-deoxiantocianidinas (luteolinidina, apigeninidina, 7-metoxi-apigeninidina e 5metoxi-luteolinidina), flavonas (luteolina e apigenina) e flavanonas (naringenina e eriodictiol). Para a extração dos flavonoides, 4 g dos óleos foram adicionados de 20 mL de solução metanólica de HCl (grau analítico, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 1% (v/v) e agitada por 120 minutos, a 180 rpm. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm, por 5 minutos, sendo

o sobrenadante coletado e o volume completado para 20 mL com solução metanólica de HCl a 1% (v/v). O extrato foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em *freezer* ( $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ ) (DYKES et al., 2009; SENEVIRATNE; SUDARSHANA DISSANAYAKE, 2008). Após a extração, alíquotas do extrato foram filtradas utilizando-se unidades filtrantes com porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$ .

Os flavonoides foram determinados por HPLC utilizando as seguintes condições cromatográficas: sistema HPLC (Shimadzu, SCL 10AT VP, Japão), coluna C-18 (Kinetix, 150 x 4,6 mID, 5  $\mu\text{m}$ ) equipada com coluna guarda C-18 (Phenomenex, Torrance, CA, 4 mm x 3 mm), temperatura da coluna a  $35^\circ\text{C}$ , volume de injeção de  $100\mu\text{L}$ , varredura do espectro de 200 a 700 nm com detecção a 480 nm para 3-deoxiantocianidinas, 360 nm para flavonas, 280 nm para flavanonas. A fase móvel consistiu em 2% de ácido fórmico em água ultrapura (linha A) e 2% de ácido fórmico em acetonitrila (linha B). O gradiente de eluição para B foi: 0-3 min, 10% isocrático; 3-4 min, 10-12%, 4-5 min, 12% isocrático; 5-8 min, 12-18%, 8-10 min, 18% isocrático; 10-12 min, 18-19%, 12-14 min, 19% isocrático; 14-18 min, 19-21%, 18-22 min, 21-26%, 22-28 min, 26-28%, 28-32 min, 28-40%, 32-34 min, 40-60%, 34-36 min, 60% isocrático; 36-38 min, 60-10%, 38-45 min, 10% isocrático. Para aumentar a repetibilidade do tempo de retenção dos picos foi utilizado o seguinte gradiente de fluxo de 0-36 min, 0,55 mL/min; 36-38 min, 0,55-1,1 mL/min, 38-44 min, 1,1 mL/min; 44-45 min, 1,1-0,55 mL/min e a fase móvel foi desgaseificada com gás hélio a 50 kPa antes e durante as corridas.

A identificação dos compostos foi realizada comparando-se o tempo de retenção e o espectro de absorção dos picos dos padrões e das amostras, analisados sob as mesmas condições. Para a quantificação, foram utilizadas curvas analíticas construídas a partir da injeção, em duplicata, de soluções padrão com seis diferentes concentrações.

#### *Conteúdo de compostos fenólicos totais*

A extração dos compostos fenólicos dos óleos foi realizada de acordo com Arlee *et al* (2013), com algumas modificações. Dez gramas do óleo foram dissolvidos em 50 mL de hexano (grau analítico, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Os compostos foram extraídos 3 vezes com 20 mL de etanol (grau analítico, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) 60%, cada. O extrato foi evaporado no rotavapor (Buchi, R-3, Brasil) ligado à bomba a vácuo (Tecnal, TE-058, Brasil) a  $40^\circ\text{C}$ . O

volume final foi completado com água destilada para 5 mL e o extrato foi armazenado em frasco âmbar.

A análise foi feita baseada no método de Gutfinger (1979) com modificações, 1 mL do extrato (extratos dos azeites foram diluídos em 1:6) foi adicionados a 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Suíça) 10% e 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 35 %. Em seguida, a solução foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 30 minutos em ambiente protegido de luz. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Thermo scientific, Evolution 606, USA) a 725 nm. A quantificação foi realizada por meio da curva analítica obtida através da leitura da absorvância de soluções com diferentes concentrações de ácido gálico (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ppm). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g).

#### *Atividade antioxidante*

A atividade antioxidante dos óleos foi avaliada pela capacidade de inibição do radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), segundo o método de Bloor (2001) com modificações. Para esta análise, utilizou-se o mesmo extrato preparado para a quantificação de fenólicos totais. Foram adicionados 100 µL do extrato em 1,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,1 mM). A mistura foi agitada e incubada no escuro por 30 minutos. A absorvância da solução foi mensurada a 517 nm (Thermo scientific, Evolution 606, USA). O percentual de inibição foi expresso usando a seguinte equação, onde  $Abs_{controle}$  é a absorvância da solução DPPH com água na mesma quantidade do extrato.

$$\text{Inibição\%} = (Abs_{Controle} - Abs_{Amostra}) / Abs_{Controle} \times 100$$

#### *Análises estatísticas*

Variáveis não paramétricas foram transformadas em log. A análise de variância (ANOVA) de um fator seguido do teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças entre as amostras. Os dados foram apresentados como média ± desvio-padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* SPSS 20.0. O nível  $\alpha$  de 5% foi considerado significativo.

## Resultados

O perfil lipídico das amostras analisadas variou entre ácidos graxos de cadeia média e longa (Tabela 1). Nas amostras de azeite de oliva, as maiores concentrações foram referentes aos ácidos graxos oleico e palmítico. O ácido miristoléico e ácido palmitoléico cis foram identificados em pequenas quantidades apenas nas amostras de azeite de oliva. Nas amostras de óleo de coco, os maiores percentuais foram referentes aos ácidos graxos saturados láurico, mirístico e palmítico. Em relação aos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), todas as amostras testadas apresentaram baixa concentração total destes AG (Figura 1).

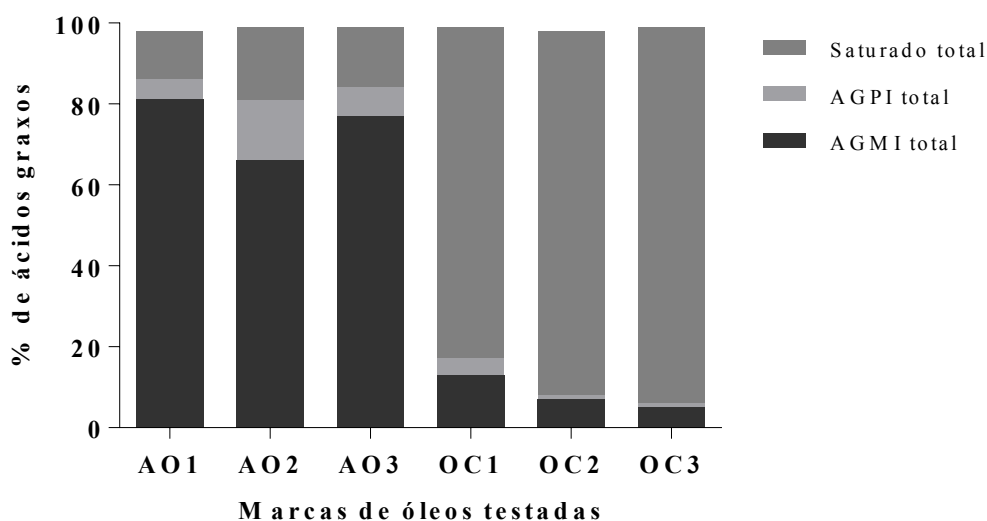


Figura 1. Proporção de ácidos graxos saturados, poli-insaturados (AGPI) e monoinsaturados (AGMI). AO1: azeite de oliva marca 1; AO2: azeite de oliva marca 2; AO3: azeite de oliva marca 3; OC1: óleo de coco marca 1; OC2: óleo de coco marca 2; OC3: óleo de coco marca 3.

Tabela 1. Percentual de ácidos graxos em relação ao total, das diferentes marcas de óleos comerciais testadas.

<b>ÁCIDO GRAXO</b>	<b>AO1</b>	<b>AO2</b>	<b>AO3</b>	<b>OC1</b>	<b>OC2</b>	<b>OC3</b>
Ác. Láurico (C12:0)	-	0,02	-	42,4	54,4	59,8
Ác. Tridicanóico (C13:0)	-	0,03	-	0,06	0,06	0,03
Ác. Mirístico (C14:0)	-	0,01	0,02	23,1	23,4	21,1
Ác. Miristoléico (C14:1)	0,01	0,04	-	-	-	-
Ác. Pentadecanóico (C15:0)	-	0,01	-	0,01	-	0,01
Ác. 10-pentadecanóico (C15:1)	-	0,01	-	-	0,01	0,01
Ác. Palmítico (C16:0)	9,9	16,3	12,6	14,4	9,7	9,00
Ác. Palmitoléico cis (C16:1)	0,7	1,7	1,1	-	-	-
Ác. Margárico (C17:0)	0,3	0,2	0,2	0,03	0,01	0,02
Ác. Esteárico (C18:0)	2,1	1,1	1,9	2,2	2,8	3
Ác. Oleico (C18:1)	80,8	64,8	76,5	13,1	7,5	5,8
Ác. Linoleico (C18:2)	4,9	14,3	6,4	4,4	1,4	0,8
Ác. $\alpha$ -linolênico (C18:3)	0,6	0,7	0,6	0,2	0,3	0,3
Ác. Araquídico (C20:0)	0,4	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1
Ác. Gadoléico (C20:1 n9)	0,3	0,3	0,3	0,1	0,02	0,02
Ác. 8,11-eicosadienóico (C20:2)	0,1	0,1	0,1	0,01	-	-
AGMI total	81,8	66,8	77,9	13,2	7,5	5,8
AGPI total	5,6	15,1	7,1	4,5	1,7	1,1
Saturado total	12,6	18	15	82,3	90,5	93

Os valores estão expressos em média da triplicata. - : não detectado. AO1: azeite de oliva marca 1; AO2: azeite de oliva marca 2; AO3: azeite de oliva marca 3; OC1: óleo de coco marca 1; OC2: óleo de coco marca 2; OC3: óleo de coco marca 3. AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

Verificamos a presença de diferentes isômeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -tocoferol no azeite de oliva e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocotrienol no óleo de coco) de vitamina E nas amostras de azeite de oliva e óleo de coco (Tabela 2). O azeite de oliva apresentou maior teor de vitamina E total que o óleo de coco. Dentre as amostras de óleo de coco, a marca 1 apresentou maior concentração de vitamina E total e dos isômeros identificados.

Tabela 2. Conteúdo total de vitamina E, tocoferóis e tocotrienóis nas diferentes marcas de óleos comerciais testados (mg/100g de amostra).

Composto	Marcas testadas					
	AO1	AO2	AO3	OC1	OC2	OC3
Vitamina E total	31,90 ± 0,33 <sup>a</sup>	38,19 ± 3,44 <sup>a</sup>	36,00 ± 1,31 <sup>a</sup>	16,04 ± 0,97 <sup>b</sup>	6,99 ± 0,13 <sup>c</sup>	5,26 ± 0,25 <sup>d</sup>
α-tocoferol	19,36 ± 0,23 <sup>a</sup>	23,53 ± 2,03 <sup>b</sup>	21,20 ± 0,75 <sup>a,b</sup>	-	-	-
β-tocoferol	11,29 ± 2,09	14,10 ± 1,09	13,56 ± 1,05	-	-	-
γ-tocoferol	1,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,25 ± 0,06 <sup>a</sup>	-	-	-
δ-tocoferol	-	-	-	-	-	-
α-tocotrienol	-	-	-	12,43 ± 0,9 <sup>a</sup>	6,60 ± 0,20 <sup>b</sup>	4,70 ± 0,26 <sup>c</sup>
β-tocotrienol	-	-	-	2,39 ± 0,41	-	-
γ-tocotrienol	-	-	-	0,55 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>
δ-tocotrienol	-	-	-	0,37 ± 0,02	-	-

Os valores estão expressos em média e desvio-padrão. - : não detectado. AO1: azeite de oliva marca 1; AO2: azeite de oliva marca 2; AO3: azeite de oliva marca 3; OC1: óleo de coco marca 1; OC2: óleo de coco marca 2; OC3: óleo de coco marca 3. As diferenças entre os óleos foram comparadas por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Tukey. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).



Dentre os carotenóides investigados, registramos a ocorrência de luteína nas amostras de azeite de oliva, sendo a marca 1 a que apresentou maior concentração (Figura 2). Não detectamos a ocorrência de flavonoides nas diferentes marcas de ambos os tipos de óleos testados.

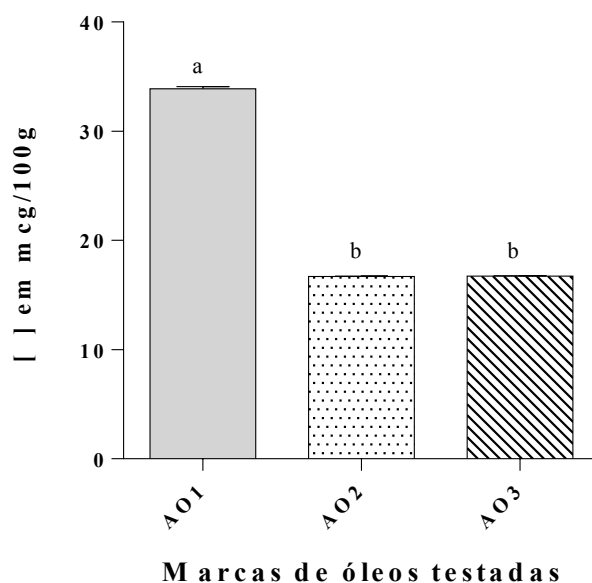


Fig. 2. Concentração de luteína nas amostras de azeite de oliva. AO1: azeite de oliva marca 1; AO2: azeite de oliva marca 2; AO3: azeite de oliva marca 3. As diferenças entre os óleos foram comparadas por meio do teste ANOVA, seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O conteúdo de compostos fenólicos (Figura 3) e a atividade antioxidante (Figura 4) entre as três marcas de cada tipo de óleo analisado foram semelhantes. Porém, as marcas de óleo de coco apresentaram conteúdo significativamente inferior desses compostos em relação ao azeite de oliva (Figuras 3 e 4). As marcas de azeite de oliva apresentaram percentual de inibição do radical DPPH dez vezes maior que as do óleo de coco (Figura 4).

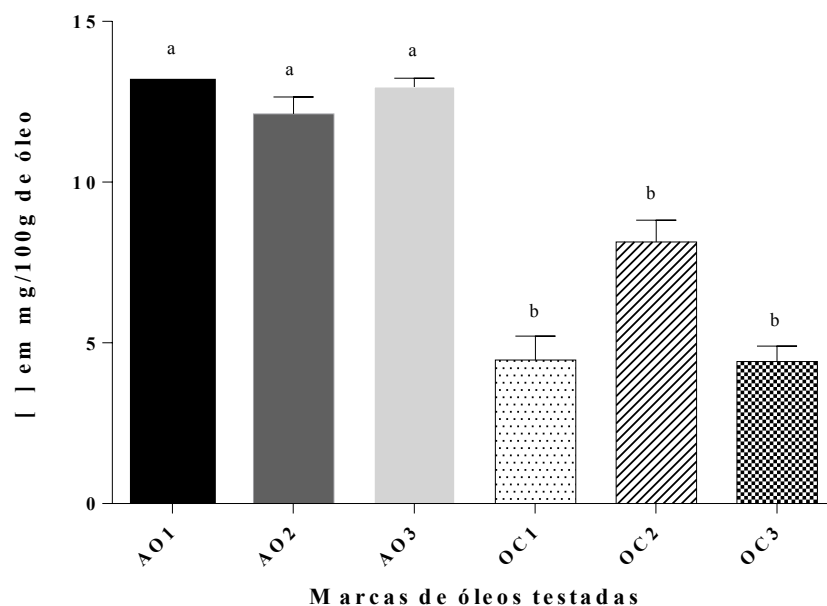


Fig. 3. Concentração de fenólicos totais nos óleos. AO1: azeite de oliva marca 1; AO2: azeite de oliva marca 2; AO3: azeite de oliva marca 3; OC1: óleo de coco marca 1; OC2: óleo de coco marca 2; OC3: óleo de coco marca 3. As diferenças entre os óleos foram comparadas por meio do teste ANOVA seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

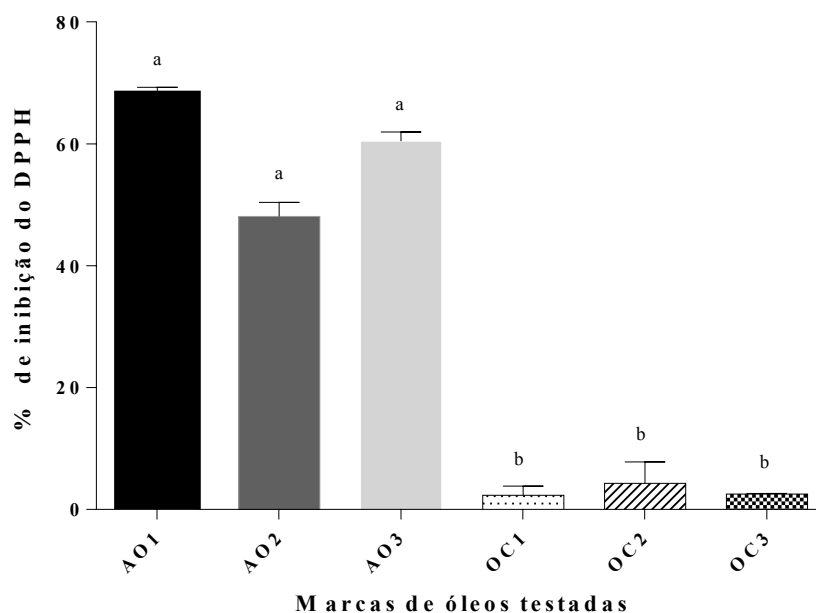


Fig. 4. Atividade antioxidante dos óleos avaliada em função do percentual de inibição do DPPH. AO1: azeite de oliva marca 1; AO2: azeite de oliva marca 2; AO3: azeite de oliva marca 3; OC1: óleo de coco marca 1; OC2: óleo de coco marca 2; OC3: óleo de coco marca 3. As diferenças entre os óleos foram comparadas por meio do teste ANOVA seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## Discussão

A ingestão de alimentos fontes de compostos bioativos com poder antioxidante tem se tornado de grande interesse, devido aos seus inúmeros benefícios à saúde, que incluem desde a melhora de perfil lipídico até reparo de danos oxidativos (COVAS, 2006). Evidências científicas sugerem que o consumo regular desses alimentos está associado ao risco reduzido de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes (LIU, 2013) e obesidade (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

A vitamina E atua na prevenção das doenças crônicas não transmissíveis citadas anteriormente (KARMOWSKI et al., 2015). A concentração de vitamina E total nos azeites de oliva do presente estudo foi o dobro da verificada em estudo anterior (PINHEIRO-SANT'ANA et al., 2011), que utilizou a mesma metodologia do presente estudo. O teor de  $\alpha$ -tocoferol foi 38%, 68% e 51% maior nas marcas 1, 2, e 3 respectivamente, em comparação ao estudo de Pinheiro-Sant'ana et al (2011). O  $\beta$ -tocoferol foi, em média, 28 vezes maior nas marcas analisadas pelo nosso grupo. Por outro lado, o óleo estudado por Pinheiro-Sant'ana (2011) possui o isômeros  $\delta$ -tocotrienol, ao contrário das marcas analisadas no presente estudo. O  $\alpha$ -tocoferol foi o isômero de maior quantidade nas 3 marcas de azeite de oliva, e é reportado como o de maior atividade biológica (PINHEIRO-SANT'ANA et al., 2011). Além de seu papel antioxidante, ele também é anti-inflamatório, pois inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB induzida pela hipóxia, presente na obesidade (AZZI; STOCKER, 2000).

Comparando-se as marcas de óleo de coco analisadas em nosso estudo, a 1 se destacou tanto pelo seu maior conteúdo de vitamina E total, como dos 4 isômeros apresentados,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  tocotrienóis. O  $\alpha$ -tocoferol foi identificado em óleo de coco produzido em laboratório (ARLEE; SUANPHAIROCH; PAKDEECHANUAN, 2013), mas não foi detectado em amostras comerciais (DIA et al., 2005). O estudo que verificou conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol no óleo de coco utilizou método colorimétrico (ARLEE; SUANPHAIROCH; PAKDEECHANUAN, 2013), enquanto o que não verificou utilizou cromatografia líquida de alta eficiência, método mais utilizado e mais indicado para este tipo de análise (DIA et al., 2005; GUINAZI et al., 2009; PINHEIRO-SANT'ANA et al., 2011). Sugere-se que altas temperaturas possam inativar ou destruir esse isômero, reduzindo o seu teor (SENEVIRATNE; HAPUARACHCHI; EKANAYAKE, 2009), no entanto a literatura ainda não é esclarecedora em relação a isto. Os tocotrienóis, embora menos estudados que os tocoferóis, apresentam propriedades antioxidante,

anti-cancerígena, neuroprotetora, hipocolesterolêmica (SEN; KHANNA; ROY, 2006), além de diminuir a incidência de doenças cardiovasculares e diabetes (ZHAO et al., 2016). Também são capazes de reduzir a glicemia de jejum e o produto de peroxidação lipídica malondialdeído e aumentar a capacidade antioxidante total de diabéticos tipo 2 (VAFA et al., 2015). Dados recentes apontam os tocotrienóis, especialmente os  $\gamma$  e  $\delta$ , como promissores agentes anti-obesidade (ZHAO et al., 2016).

Frequentemente, o termo vitamina E é usado como sinônimo de  $\alpha$ -tocoferol (SEN; KHANNA; ROY, 2006) e a maioria dos métodos de determinação dessa vitamina disponíveis na literatura foram desenvolvidos exclusivamente para sua determinação (PINHEIRO-SANT'ANA et al., 2011). Todavia, estudos demonstraram que a atividade antioxidante dos outros isômeros também deve ser considerada (SEN; KHANNA; ROY, 2006; VAFA et al., 2015), uma vez que tocotrienóis possuem melhor distribuição na camada lipídica da membrana celular (VAFA et al., 2015) e agem contra peroxidação lipídica de AGPI da mesma (APPAIAH et al., 2014). O conteúdo de vitamina E dos alimentos é de suma importância para garantir a adequada ingestão diária, essencial à saúde humana e como fator coadjuvante no controle da obesidade.

As amostras de azeite de oliva deste estudo apresentaram concentração de fenólicos totais duas vezes maior que as de óleo de coco. Estes compostos são polares e, por isso, se dissolvem facilmente na fase aquosa do leite de coco. Entretanto, o processo de extração do óleo pode causar perdas desses compostos (ARLEE; SUANPHAIROCH; PAKDEECHANUAN, 2013). O método de extração do óleo tradicional, através da evaporação da água do leite de coco, provoca menos perdas de fenólicos em comparação ao do óleo comercial, por prensagem a frio (SENEVIRATNE; SUDARSHANA DISSANAYAKE, 2008). De fato, as altas temperaturas empregadas na extração por evaporação favorecem a incorporação de fenólicos antioxidantes termoestáveis ao óleo (SENEVIRATNE; HAPUARACHCHI; EKANAYAKE, 2009). As três marcas de óleo de coco avaliadas neste estudo são produtos comerciais, e portanto foram produzidas pela prensagem a frio, o que justifica os resultados.

O teor de compostos fenólicos variou amplamente em estudos que avaliaram diferentes origens de óleo de coco virgem (7 a 29 mg/100g de óleo) (MARINA et al., 2009) e azeite de oliva extra virgem (7,3 a 42 mg/100g de óleo) (PELLEGRINI et al., 2001; TUBEROSO et al., 2016). No entanto, os valores das amostras testadas em nosso estudo estão dentro destas faixas. Assim como no presente estudo, outros autores (MARINA et al., 2009; PELLEGRINI et al.,

2001; TUBEROSO et al., 2016) também utilizaram o método de Folin-Ciocalteu, com modificações para análise de óleos comerciais. Compostos fenólicos representam um grupo variado de fitoquímicos que podem atuar como potentes antioxidantes e eliminadores de radicais livres (MURKOVIC et al., 2004). Dessa forma, a presença de compostos fenólicos na dieta está associada a efeitos protetores contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo (MANACH et al., 2005), como a obesidade (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011), doenças cardiovasculares e aterosclerose (TUCK; HAYBALL, 2002). O consumo de azeite de oliva (25 mL), por 3 semanas, com diferentes teores de fenólicos (0,27 mg, 16,4 mg e 36,6 mg/100 g de óleo) aumentou o HDL colesterol e reduziu o LDL colesterol, triglicerídeos e marcadores do estresse oxidativo em indivíduos saudáveis (COVAS, 2006). Os compostos fenólicos abrangem um grupo diverso de compostos como ácidos fenólicos, isoflavonas, flavononas, catequina, quercetina, entre outros. A ingestão adequada de fenólicos capaz de causar benefícios à saúde ainda precisa ser estudada, pois depende do tipo específico de cada composto, sua biodisponibilidade e da patologia de interesse (MANACH et al., 2005). A condução de estudos de intervenção com seres humanos são de extrema relevância para compreender os efeitos exercidos por esses compostos.

O conteúdo de fenólicos totais apresenta correlação com a capacidade antioxidante dos óleos. Após o processo de refinamento, o azeite de oliva apresenta redução de 50% na capacidade antioxidante, acompanhada da redução dos compostos fenólicos totais, sem redução de  $\alpha$ -tocoferol. Portanto, sugere-se que os compostos fenólicos sejam fundamentais para a capacidade antioxidante do azeite de oliva extra virgem e do óleo de coco virgem. Eles são também os principais responsáveis pela alta estabilidade oxidativa do azeite de oliva virgem (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011), prevenindo a degradação dos lipídeos que afeta a qualidade final do produto (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Neste estudo, as amostras de azeite de oliva apresentaram atividade antioxidante muito acima do óleo de coco, diferente do verificado por outros autores (MARINA et al., 2009). Acreditamos que as diferentes formas de preparo do extrato e diferenças metodológicas adotadas nesses estudos possam ter interferido nos valores obtidos. A atividade antioxidante das 3 marcas de azeite de oliva (variando de 48 a 68%) pode ser atribuída, além dos compostos já mencionados, ao seu elevado teor de ácido oleico (65 a 82%) (SALVADÓ et al., 2013). Apesar do óleo de coco também possuir este ácido graxo (6 a 13% do total de AG), a quantidade no

azeite de oliva é muito maior, refletindo na sua melhor capacidade de inibir o radical DPPH.

Em relação à avaliação do teor de carotenoides das amostras, verificamos que apenas as marcas de azeite de oliva apresentam luteína, um dos tipos de carotenoides. Outros compostos com alta atividade antioxidante já foram quantificados no azeite de oliva, como oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol (OWEN et al., 2000; TUCK; HAYBALL, 2002), sendo este último o melhor antioxidante encontrado no azeite (TUCK; HAYBALL, 2002). Entretanto, dados sobre o teor de carotenóides no azeite de oliva e no óleo de coco ainda são escassos na literatura. As marcas de azeite avaliadas neste estudo contêm 15 vezes menos carotenóides que o verificado no azeite de oliva extra virgem avaliado em outro, que utilizou mesmo método de análise, porém diferente extração dos compostos (LIMÓN et al., 2015). Alguns autores sugerem que a absorção de carotenoides seja favorecida na presença de lipídeos dietéticos, pois apresentam absorção semelhante (BOREL, 2003; NIDHI; MAMATHA; BASKARAN, 2014). Assim, a ingestão de luteína concomitante com uma fonte lipídica é essencial para sua absorção adequada (NIDHI; MAMATHA; BASKARAN, 2014). A ingestão de 6 a 10 mg/dia de luteína possui propriedades antioxidantes, protetora de doenças cardiovasculares e de degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (JOHNSON, 2005). A obesidade aumenta o risco de DMRI, devido ao aumento do estresse oxidativo, da inflamação e alterações do perfil lipídico. Essas alterações também podem resultar em uma menor circulação e deposição de luteína na mácula ocular (JOHNSON, 2005). Assim, a ingestão adequada (6 a 10 mg/dia) deste nutriente, por meio da ingestão do óleo juntamente com outras fontes alimentares de luteína, contribui indiretamente para o controle da obesidade e previne distúrbios relacionadas a ela.

Por ser um produto mundialmente reconhecido como saudável, o azeite de oliva extra virgem requer constantes esforços para melhorar sua qualidade e evitar sua adulteração. A qualidade do azeite está diretamente relacionada com a variedade da azeitona e há uma forte ligação entre o cultivar e o território de cultivo. Cultivares de regiões distintas apresentam óleo com diferentes teores compostos fenólicos, bem como da atividade antioxidante distinta (TUBEROSO et al., 2016). O mesmo ocorre com o óleo de coco, uma vez que produtos de diferentes marcas e regiões possuem composição química variada, representada por diferentes composição de ácidos graxos, compostos fenólicos e atividade antioxidante (MARINA et al., 2009). Embora não tenha sido o objetivo deste estudo, autores afirmam que o tempo de prateleira afeta negativamente o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, compostos fenólicos e carotenóides do azeite de

oliva (MÉNDEZ; FALQUÉ, 2007; MORELLÓ et al., 2004). Assim, o teor desses compostos tende a ser maior assim que o produto é processado.

## **Conclusão**

Constatamos que as diferentes marcas de um mesmo tipo de óleo analisadas neste estudo apresentaram diferença na composição dos compostos antioxidantes. Ao comparar os dois tipos de óleos concluímos que o azeite de oliva extra virgem possui melhor perfil dos compostos bioativos avaliados e maior concentração de compostos antioxidantes que o óleo de coco e, por isso pode resultar em maiores benefícios no controle da obesidade e na promoção da saúde. Todavia, é de fundamental importância a condução de estudos de intervenção bem delineados para verificar tais efeitos em seres humanos e determinar as doses seguras para se atingir o objetivo desejado. Esses estudos auxiliarão a identificar estratégias dietéticas seguras e capazes de resultar em efeitos benéficos à saúde da população em geral e de indivíduos com excesso de peso.

## **Referências**

- APPAIAH, P. et al. Composition of Coconut Testa, Coconut Kernel and its Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 6, p. 917–924, 22 jun. 2014.
- ARLEE, R.; SUANPHAIROCH, S.; PAKDEECHANUAN, P. Differences in chemical components and antioxidant-related substances in virgin coconut oil from coconut hybrids and their parents. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 5, p. 2103–2109, 2013.
- AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in lipid research**, v. 39, n. 3, p. 231–55, maio 2000.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646–56, jul. 2009.
- BLOOR, S. J. **Flanonoids and Other Polyphenols**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier, 2001.
- BOREL, P. Factors Affecting Intestinal Absorption of Highly Lipophilic Food Microconstituents

(Fat-Soluble Vitamins, Carotenoids and Phytosterols). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 8, p. 979–994, 7 jan. 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Anvisa Publicações Eletrônicas**, p. 1–33, 1999.

BRENES, M. et al. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3535–3540, set. 1999.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173–187, fev. 2011.

COVAS, M.-I. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. **Annals of Internal Medicine**, v. 145, n. 5, p. 333, 5 set. 2006.

COVAS, M.-I.; DE LA TORRE, R.; FITÓ, M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S19–S28, 7 abr. 2015.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 02, p. 332–338, 20 maio 2012.

DIA, V. P. et al. Comparative physiological characteristics of virgin coconut oil produced by different methods. **The Philippine Agricultural Scientist**, v. 88, n. 4, p. 462–475, 2005.

DYKES, L. et al. Flavonoid composition of red sorghum genotypes. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 313–317, set. 2009.

ENNS, J. E. et al. Diets high in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decrease fatty acid synthase protein levels in adipose tissue but do not alter other markers of adipose function and inflammation in diet-induced obese rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 90, n. 2-3, p. 77–84, fev. 2014.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 3117–3132, 13 maio 2011.

FRANCO, M. N. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. **Food Chemistry**, v. 163, p. 289–298, nov. 2014.

GUINAZI, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2098–2103, 2009.



GUTFINGER, T. Polyphenols in Olive Oils. **Grasas Y Aceites**, p. 966–8, 1979.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de orçamento familiar 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**, 2010.

JOHNSON, E. J. Obesity, lutein metabolism, and age-related macular degeneration: a web of connections. **Nutrition reviews**, v. 63, n. 1, p. 9–15, jan. 2005.

KARMOWSKI, J. et al. Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. **Food Chemistry**, v. 175, p. 593–600, maio 2015.

LIMÓN, P. et al. Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. **Food Chemistry**, v. 175, p. 203–211, maio 2015.

LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal of Food Science**, v. 78, n. s1, p. A18–A25, jun. 2013.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230S–242S, jan. 2005.

MARINA, A. M. et al. Chemical Properties of Virgin Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 4, p. 301–307, 24 jan. 2009.

MÉNDEZ, A. I.; FALQUÉ, E. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 521–529, maio 2007.

MORELLÓ, J.-R. et al. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 357–364, maio 2004.

MURKOVIC, M. et al. Analysis of minor components in olive oil. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 61, n. 1-2, p. 155–160, out. 2004.

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

NIDHI, B.; MAMATHA, B. S.; BASKARAN, V. Olive oil improves the intestinal absorption and bioavailability of lutein in lutein-deficient mice. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n.

1, p. 117–126, 30 fev. 2014.

OWEN, R. W. et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. **The Lancet Oncology**, v. 1, n. 2, p. 107–112, out. 2000.

PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6373–6377, out. 2004.

PAPAGEORGIOU, N. et al. Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 514–9, abr. 2011.

PELLEGRINI, N. et al. Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2532–2538, maio 2001.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. et al. Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 47, p. 8496–8502, nov. 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Assessment of the Provitamin A Contents of Foods— The Brazilian Experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 9, n. 3, p. 196–230, set. 1996.

SALVADÓ, L. et al. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. **Diabetologia**, v. 56, n. 6, p. 1372–1382, 5 jun. 2013.

SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2088–2098, mar. 2006.

SENEVIRATNE, K. N.; HAPUARACHCHI, C. D.; EKANAYAKE, S. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1444–1449, jun. 2009.

SENEVIRATNE, K. N.; SUDARSHANA DISSANAYAKE, D. M. Variation of phenolic content in coconut oil extracted by two conventional methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 4, p. 597–602, abr. 2008.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4067, 2010.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. Supl I, p. 2–19, 2007.

TUBEROSO, C. I. G. et al. Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Other Characteristics of Extra Virgin Olive Oils from Italian Autochthonous Varieties Tonda di Villacidro , Tonda di Cagliari , Semidana , and Bosana. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

TUCK, K. L.; HAYBALL, P. J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 11, p. 636–644, nov. 2002.

VAFA, M. et al. Effect of Tocotrienols enriched canola oil on glycemic control and oxidative status in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 20, n. 6, p. 540–7, jun. 2015.

VYSAKH, A. et al. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 124–130, maio 2014.

WONG, W. Y. et al. Anti-inflammatory  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. **European Journal of Nutrition**, 2015.

ZHAO, L. et al. Regulation of Obesity and Metabolic Complications by Gamma and Delta Tocotrienols. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 344, 11 mar. 2016.

### **ARTIGO 3: Óleo de coco e azeite de oliva: atividade *in vitro* contra bactérias relacionadas ao excesso de peso**

#### **RESUMO**

**Introdução:** A obesidade é uma doença que cursa com alterações indesejáveis na microbiota intestinal. A atividade antibacteriana do óleo de coco e do azeite de oliva tem sido reportada na literatura. Entretanto, são escassos os estudos em que se avaliou o efeito destes óleos contra bactérias que compõe a microbiota intestinal. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana do óleo de coco virgem e do azeite de oliva extra virgem contra bactérias que parecem estar aumentadas em indivíduos com excesso de peso. **Materiais e métodos:** Foram utilizados azeite de oliva extra virgem e óleo de coco virgem, previamente digeridos *in vitro* pela ação da lipase pancreática e testadas concentrações equivalentes àquelas que atingem o cólon de seres humanos após a ingestão de dieta normolipídica. A concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos foi avaliada contra o crescimento das bactérias *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus paracasei*, *Prevotella intermedia* e *Staphylococcus aureus*. Os efeitos dos óleos sobre a velocidade específica de crescimento e a densidade óptica final (24 horas) também foi avaliada para tais bactérias. **Resultados:** O azeite de oliva não apresentou atividade antibacteriana contra nenhuma das bactérias testadas. Com exceção da *Escherichia coli*, o óleo de coco em concentrações mínimas equivalente a 0,156 a 10 mmol.L<sup>-1</sup> inibiu o crescimento de sete bactérias avaliadas. As bactérias anaeróbias foram mais sensíveis à ação do óleo digerido, apresentando valores de CIM dez vezes menores do que os valores verificados para as bactérias aeróbias. **Conclusão:** O óleo de coco inibiu o crescimento de sete das oito bactérias relacionadas ao excesso de peso. Estudos envolvendo seres humanos devem ser conduzidos, para verificar o efeito do consumo desse óleo sobre a microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso e sobre a prevenção e controle da obesidade.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos, atividade antibacteriana, disbiose, microbiota intestinal, obesidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** Obesity is a disease that occurs associated with undesirable changes in gut microbiota. The antibacterial activity of coconut oil and olive oil has been reported in the literature. However, there are few studies that assessed the effect of these oils against bacteria found in the intestinal microbiota. **Objective:** To assess the antimicrobial activity of virgin coconut oil and extra virgin olive oil against bacteria that seem to be increased in overweight individuals. **Methods:** Extra virgin olive oil and virgin coconut oil, previously digested in vitro by pancreatic lipase were used in concentrations equivalent to the ones that reach human being colon after the consumption of a normal fat diet. The oils minimum inhibitory concentration (MIC) were evaluated against *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus paracasei*, *Prevotella intermedia* and *Staphylococcus aureus*. The effect of the oils on the specific growth rate and final optical density (24 hours) were also evaluated for these bacteria. **Results:** Coconut oil inhibited the growth of the bacteria assessed in minimum concentrations ranging from 0,156 to 10 mmol.L<sup>-1</sup>, except for *E. coli*. Olive oil showed no antimicrobial activity against any of the bacteria tested. Anaerobic bacteria were more sensitive to the action of the digested oil, showing MIC values ten times lower than the ones verified for aerobic bacteria. **Conclusion:** Coconut oil inhibited the growth of seven among the eight bacteria related to overweight. Studies involving human beings must be conducted to verify the effect of the consumption of this oil in the intestinal microbiota of overweight individuals and on obesity prevention and control.

**Key-words:** Fatty acids, antimicrobial activity, dysbiosis, overweight, gut microbiota, obesity.

## Introdução

A atividade antibacteriana dos lipídeos é conhecida há muito tempo (THORMAR; HILMARSSON; BERGSSON, 2013). Esse efeito tem sido relacionado com a composição de ácidos graxos (AG) apresentada pelos óleos e ao efeito inibidor exercido pelos ácidos graxos livres (AGL) resultantes da digestão dos mesmos (DESBOIS; SMITH, 2010). O óleo de coco é composto predominantemente (45 a 50%) pelo ácido láurico (C12:0), AG com reconhecida atividade antibacteriana (ASSUNÇÃO et al., 2009). Apesar de não possuir ácido láurico em sua composição, o azeite de oliva contém ácido oléico e os compostos fenólicos, principais responsáveis pela atividade antibacteriana (BRENES et al., 2007; ROMERO et al., 2007).

Estudos anteriores indicaram que os lipídeos dietéticos possuem grande influência sobre a microbiota intestinal (CHAPLIN et al., 2015; DAVID et al., 2014; DEVKOTA et al., 2012; FAVA et al., 2013; MUJICO et al., 2013; WU et al., 2011). Recentemente, a microbiota intestinal conquistou o interesse dos pesquisadores por ser um fator que pode afetar a predisposição à adiposidade e participar da gênese da obesidade (TAGLIABUE; ELLI, 2013). A prevalência da obesidade está aumentando mundialmente, sendo considerado um problema de saúde pública (WHO, 2015).

A contribuição de bactérias de diferentes filos para a obesidade foi avaliada em diversos estudos (ARMOUGOM et al., 2009; JAYASINGHE et al., 2016; NADAL et al., 2012; SANTACRUZ et al., 2009; ZUO, 2011) e está relacionada ao acúmulo de gordura corporal (ANGELAKIS et al., 2012) e aumento da absorção intestinal de calorias (MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010). Apesar da falta de consenso entre os autores, acredita-se que indivíduos com excesso de peso apresentem aumento do filo Firmicutes (ARMOUGOM et al., 2009; LEY et al., 2006), do gênero *Prevotella* (COLLADO et al., 2008) e *Lactobacillus* (ARMOUGOM et al., 2009) e da espécie *Staphylococcus aureus* (COLLADO et al., 2008) e *Bacteroides fragilis* (SANTACRUZ; MC; GARCIA-VALDES, 2010) em relação aos eutróficos.

O efeito antibacteriano do óleo de coco e do azeite de oliva tem sido investigado em estudos *in vitro*, que visam prolongar a vida de prateleira de produtos alimentícios (LUCERA et al., 2012; TANGWATCHARIN; SUKSATHIT, 2014), a produção de produtos de higiene bucal (SHINO et al., 2016) ou para tratamentos de infecções (OGBOLU et al., 2007; SHILLING et al.,

2013; VERALLO-ROWELL; DILLAGUE; SYAH-TJUNDAWAN, 2008). No entanto, estudos em que se avaliou o efeito destes óleos contra bactérias do trato gastrointestinal (TGI) são escassos (SHILLING et al., 2013; ZAMPA et al., 2006). Não identificamos nenhum estudo em que foi avaliado o efeito do do óleo de coco e do azeite de oliva no crescimento de bactérias relacionados ao excesso de peso. Sendo assim, torna-se pertinente investigar o potencial antibacteriano destes óleos sobre bactérias da microbiota intestinal, que estão relacionadas à obesidade, buscando a aplicabilidade destes óleos na modulação da microbiota intestinal e consequentemente no tratamento da obesidade.

Diante do exposto e da escassez de estudos, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo de coco e do azeite de oliva contra bactérias relacionadas ao excesso de peso.

## **Materiais e métodos**

### *Materiais*

Foram utilizados azeite de oliva extra virgem e óleo de coco virgem do mercado local, adquiridos em embalagens devidamente lacradas. Foi selecionada a melhor marca de cada óleo, de acordo com os resultados das análises do estudo anterior. A marca 1, do azeite de oliva e do óleo de coco, apresentou melhor perfil dos compostos avaliados e de ácidos graxos. O meio de cultura utilizado foi o caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Fluka Analytical - Sigma-Aldrich, Índia). O reagente taurodeoxicolato de sódio (TDCNa) foi obtido da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Itália). A trizma® base e fosfatidilcolina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - grau analítico), cloreto de sódio (NaCl - grau analítico), hidróxido de sódio (NaOH - grau analítico) foram obtidos da Vetec (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil). Pancreatina (Sigma, St. Louis, EUA) de pâncreas suíno foi usada como fonte de lipase e colipase pancreática.

### *Hidrólise in vitro dos óleos*

Para mimetizar a digestão dos óleos no organismo de seres humanos, e simular o estado

alimentado, foi empregado um modelo de lipólise *in vitro*, de acordo com Sek et al. (2001) com algumas modificações. Para o preparo do tampão digestão padrão foi utilizado tris-base (50 mM); NaCl (150 mM) e CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (5 mM), e 1 M HCl ou 1 M NaOH para ajuste do pH (7,5). Taurodeoxicolato de sódio (TDCNa) foi empregado como modelo de sal biliar e a fosfatidilcolina foi utilizada como fonte de fosfolípídeo no preparo da solução de micelas mistas. A solução micelar foi preparada por meio da dissolução da fosfatidilcolina (5 mM) em clorofórmio e evaporação do mesmo em rotavapor (Fisatom, 803, Brasil) ligado à bomba a vácuo (Tecnal, TE-058, Brasil), deixando uma fina camada no fundo do balão. TDCNa (20 mM) e 20 mL tampão digestão foram então adicionados ao balão e a solução foi misturada e equilibrada por 12 horas.

O extrato de pancreatina foi preparado por meio da adição de 1 g de pancreatina suína (contendo lipase e colipase) em 5 mL do tampão digestão. Esta mistura foi agitada por 15 minutos, seguida de centrifugação (1600 g, 5°C) pelo mesmo tempo. O sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo, até sua utilização. Extratos frescos da enzima foram preparados a cada realização da lipólise e usados em até 15 minutos para evitar a desnaturação da enzima. Para cada digestão, 500 mg do óleo foram emulsificados em 18 mL do tampão digestão, misturando-se continuamente por 10 minutos. Após esse tempo, o pH foi reajustado para 7,50 ± 0,01 com NaOH ou HCl. Dois mL do extrato de pancreatina foram então adicionados para iniciar a lipólise, a qual ocorreu durante 30 minutos. A lipólise ocorreu a 37°C e foi monitorada através da titulação com solução de NaOH 0,2 M, mantendo o pH 7,50 ± 0,01, a fim de obter a quantidade de mol de ácidos graxos liberados ao fim da reação. Ao final da lipólise, o produto foi centrifugado (15000 g, 37°C) por 45 minutos. A fase aquosa foi coletada, filtrada em unidades filtrantes de porosidade 0,22 µm e congelada a -20°C para posteriores análises.

Para obtenção da concentração final do produto da lipólise foi feito o cálculo de titulação, segundo a equação:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Onde  $M_1$  = concentração molar da solução de NaOH,  $V_1$  = volume de NaOH gasto na titulação,  $M_2$  = concentração molar da solução final (valor a encontrar) e  $V_2$  = volume final do produto da lipólise.



### *Microorganismos utilizados*

No presente estudo foram utilizadas bactérias previamente reportadas como aumentadas no TGI de indivíduos com excesso de peso. Foram selecionadas estirpes de *Bacteroides fragilis* (ATCC 23745), *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483), *Clostridium perfringens* (ATCC 12924), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Lactobacillus paracasei* (ATCC 335), *Prevotella intermedia* (ATCC 49046) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1934) provenientes da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

### *Ativação das estirpes*

Todas as estirpes foram ativadas a partir de uma cultura estoque e transferidas três vezes antes de serem usadas no experimento. A ativação foi realizada considerando a temperatura ótima e a condição de aerobiose ou anaerobiose requeridas para crescimento das bactérias (Tabela 1). A primeira ativação e o crescimento foram realizados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI – Fluka - Sigma-Aldrich, Índia). Para verificar a pureza das culturas, foram feitas estrias compostas em ágar BHI e as culturas foram submetidas à coloração de Gram, seguida de análise microscópica para avaliação da pureza. Culturas puras dos isolados foram estocadas a – 20°C no meio de crescimento com 20% de glicerol.

Tabela 1. Características das bactérias utilizadas nos experimentos.

<b>Filo</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Gram</b>	<b>Cultivo</b>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	37	-	Anaeróbia
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	37	-	Anaeróbia
<i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i>	37	-	Aeróbia
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	37	-	Anaeróbia
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	37	+	Anaeróbia
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	37	+	Aeróbia
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	37	+	Aeróbia
<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	37	+	Aeróbia

### *Atividade antibacteriana*

Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo através da diluição seriada, conforme as normas estabelecidas pelo CLSI

(2005). O inóculo foi ajustado para o padrão de turbidez de 0,5 da escala Mc Farland. Foi realizada diluição com 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de células em 990  $\mu\text{L}$  de solução salina (0,85%) (diluição 1:100), para que a concentração final da suspensão de células em cada poço fosse de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL.

Foram utilizadas placas de Elisa com 96 poços. Em todos os poços foram colocados 150  $\mu\text{L}$  de caldo BHI (37 g/L), exceto na primeira linha, onde foi colocado o mesmo volume do caldo BHI concentrado (74 g/L). Foram pipetados 150  $\mu\text{L}$  do óleo digerido em todos os poços da primeira linha (A) da microplaca (colunas 1 a 12). Foram realizadas diluições seriadas, homogeneizando 5 vezes e transferindo 150  $\mu\text{L}$  do poço anterior para o poço subsequente, até a linha H. As diluições testadas foram 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. As concentrações utilizadas de azeite de oliva foram 15, 7,5, 3,75, 1,875, 0,938, 0,469 e 0,234  $\text{mmol.L}^{-1}$  e do óleo de coco foram 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312  $\text{mmol.L}^{-1}$ . A todos os poços, exceto os de controle negativo, foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana diluída 1:100 (v/v) em solução salina. O volume final em todos os poços foi de 165  $\mu\text{L}$ .

Foram testadas concentrações equivalentes àquelas que atingem o cólon de seres humanos após a ingestão de dieta contendo 30 mL/dia dos óleos testados. A concentração de óleo em cada poço correspondeu à concentração inicial de cada produto do óleo digerido. Desta forma, a concentração no primeiro poço (diluição 1:2) foi de 15  $\text{mmol.L}^{-1}$  para o azeite de oliva e 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  para o óleo de coco e assim sucessivamente.

Os controles negativos e positivos foram feitos em uma microplaca à parte dos teste com os microrganismos. Os controles negativos consistiram em meio BHI ou meio BHI adicionado com o óleo digerido. Para cada bactéria testada foi feito um controle positivo, composto pelo inóculo e o caldo de crescimento. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas em condição de aerobiose ou anaerobiose, de acordo com cada bactéria (ASM, 2005).

O crescimento foi avaliado após 24h e 48h em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 606, USA), para as bactérias aeróbias. Após 48h, para todas as bactérias, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de resazurina 0,01% em todos os poços para evidenciar as concentrações onde houve crescimento e determinar o CIM, após 2 horas de reação em temperatura ambiente. A reação com a resazurina permite verificar a presença de crescimento

microbiano pela mudança da coloração do corante de azul para rosa (resorufina), correspondente à redução deste reagente.

#### *Parâmetros de crescimento*

Para monitorar o crescimento bacteriano, as culturas foram cultivadas por cerca de 16h em caldo BHI. Foi utilizado 3% de inóculo de bactérias anaeróbias e 1% de bactérias aeróbias acrescidos de óleo digerido nas concentrações referentes a 0, 0,5X, 1X e 4X o valor da CIM obtida previamente. As curvas das bactérias aeróbias foram feitas em microplacas de 96 poços e o crescimento foi monitorado em espectrofotômetro (Thermo scientific, Evolution 606, USA) com leituras da densidade óptica (DO) a 600 nm a cada 15 minutos, incubadas a 37°C. Os isolados anaeróbios estritos foram inoculados em tubos Hungate (18 mm x 150 mm) selados com rolha de borracha, lacrados e inoculados utilizando seringas. O crescimento foi monitorado pela leitura da DO a 600 nm (Spectronic 20D+) com leituras a cada 30 minutos e incubadas a 39°C. Por meio das curvas de crescimento foram determinadas a velocidade específica de crescimento e a densidade óptica final das culturas após 24h de cultivo na presença das diferentes concentrações de óleo digerido.

#### *Análises estatísticas*

Todos os experimentos foram feitos em duas repetições biológicas e em triplicata. Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão das repetições. Quando apropriado, a significância estatística dos dados foi analisada pelo teste ANOVA de um fator, seguido do teste de Tukey, utilizando o *software* SPSS 20.0. O nível  $\alpha$  de 5% foi considerado significativo.

## Resultados

Após hidrólise do azeite de oliva e do óleo de coco, as concentrações dos produtos (mistura de ácidos graxos livres) foram 30 mM e 40 mM, respectivamente. A composição de ácidos graxos dos óleos testados foram determinadas em estudo anterior pelo nosso grupo de pesquisa. Os principais ácidos graxos verificados no azeite de oliva foram ácido palmítico, oleico e linoleico, e no óleo de coco foram ácido láurico, mirístico, palmítico, oleico e linoleico (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de ácidos graxos em relação ao total, dos óleos utilizados.

	Azeite de oliva	Óleo de coco
Ác. Láurico (C12:0)	-	42,4
Ác. Tridicanóico (C13:0)	-	0,06
Ác. Mirístico (C14:0)	-	23,1
Ác. Miristoléico (C14:1)	0,01	-
Ác. Pentadecanóico (C15:0)	-	0,01
Ác. 10 pentadecanóico (C15:1)	-	-
Ác. Palmítico (C16:0)	9,9	14,4
Ác. Palmitoléico cis (C16:1)	0,7	-
Ác. Margárico (C17:0)	0,3	0,03
Ác. Estearíco (C18:0)	2,1	2,2
Ác. Oleico (C18:1)	80,8	13,1
Ác. Linoleico (C18:2)	4,9	4,4
Ác. $\alpha$ -linolênico (C18:3)	0,6	0,2
Ác. Araquídico (C20:0)	0,4	0,1
Ác. Gadoléico (C:20:1 n9)	0,3	0,1
Ác. 8,11-eicosadienóico (C20:2)	0,1	0,01

Dentre os valores testados na determinação da CIM, o azeite de oliva não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma das bactérias utilizadas no experimento. Por outro lado, o óleo de coco apresentou alta atividade antibacteriana, ao inibir o crescimento de todas as bactérias testadas, com exceção de *E. coli* (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima ( mmol.L<sup>-1</sup> ) dos óleos testados.

Bactéria	Azeite de oliva	Óleo de coco
<i>Escherichia coli</i>	*	**
<i>Bacteroides fragilis</i>	*	0,156
<i>Bacteroides ovatus</i>	*	0,312
<i>Clostridium perfringens</i>	*	0,312
<i>Enterococcus faecalis</i>	*	2,5
<i>Lactobacillus paracasei</i>	*	10
<i>Prevotella intermedia</i>	*	0,312
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	2,5

Inibição não detectada em concentração > 15 mmol.L<sup>-1</sup>\* e > 20 mmol.L<sup>-1</sup>\*\*

As bactérias anaeróbias *B. fragilis*, *B. ovatus*, *C. perfringens* e *P. intermedia* quando inoculadas em meio BHI sem óleo de coco e incubadas a 39°C tiveram velocidade específica de crescimento de 0,264, 0,626, 0,528, 0,623 h<sup>-1</sup> e atingiram DO final (600 nm) de 0,749, 1,193, 1,082 e 0,944 respectivamente (Tabela 4). A adição do óleo de coco digerido ao meio de cultura, na concentração referente à CIM, reduziu a velocidade de crescimento em 14%, 35% e 26% da *B. ovatus*, *P. intermedia* e *C. perfringens*, respectivamente. Na mesma concentração, a DO final (600 nm) dessas bactérias foi significativamente menor em relação ao controle. Uma exceção às anaeróbias foi a *B. fragilis*, que teve seu crescimento inibido na dose sub-letal (metade da CIM). Embora a velocidade de crescimento não tenha diferido significativamente entre as concentrações de óleo, a DO final diferiu, diminuindo à medida em que a concentração do óleo aumentou. Isso indica que o óleo não retardou o crescimento das bactérias, mas reduziu o crescimento populacional da cultura.

Assim como a *B. fragilis*, as bactérias aeróbias também não cresceram na presença de óleo de coco nas 3 concentrações testadas. *E. faecalis*, *L. paracasei* e *S. aureus* apresentaram CIM mais alta (2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, 10 mmol.L<sup>-1</sup> e 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente), porém foram inibidas por doses sub-letais, correspondentes à metade do valor da CIM. Na ausência de óleo, a velocidade de crescimento das bactérias aeróbias foi quase o dobro das bactérias anaeróbias.

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de óleo de coco sobre o crescimento de bactérias relacionadas à obesidade.

Gram	Bactéria	Óleo (mmol.L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	DO final
Negativa	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 23745	0	0,264 ± 0,001	0,749 ± 0,09 <sup>a</sup>
		0,078	-	0,028 ± 0,02 <sup>b</sup>
		0,156	-	0,009 ± 0,014 <sup>b</sup>
		0,624	-	0,038 ± 0,045 <sup>b</sup>
	<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	0	0,626 ± 0,122	1,193 ± 0,03 <sup>a</sup>
		0,156	0,557 ± 0,147	0,839 ± 0,159 <sup>b</sup>
		0,312	0,539 ± 0,122	0,627 ± 0,026 <sup>c</sup>
		1,248	-	0,198 ± 0,014 <sup>d</sup>
	<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 49046	0	0,623 ± 0,111	0,944 ± 0,208 <sup>a</sup>
		0,156	0,523 ± 0,008	0,603 ± 0,146 <sup>b</sup>
		0,312	0,402 ± 0,034	0,445 ± 0,026 <sup>b</sup>
		1,248	-	0,091 ± 0,021 <sup>c</sup>
Positiva	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 12924	0	0,528 ± 0,057	1,082 ± 0,116 <sup>a</sup>
		0,156	0,459 ± 0,162	0,911 ± 0,126 <sup>b</sup>
		0,312	0,387 ± 0,059	0,582 ± 0,075 <sup>c</sup>
		1,248	-	0,123 ± 0,043 <sup>d</sup>
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	0	1,073 ± 0,047	0,799 ± 0,064 <sup>a</sup>
		1,25	-	0,008 ± 0,012 <sup>b</sup>
		2,5	-	0,016 ± 0,02 <sup>b</sup>
		10	-	0,015 ± 0,023 <sup>b</sup>
	<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 335	0	1,264 ± 0,002	0,516 ± 0,022 <sup>a</sup>
		5	-	0,016 ± 0,015 <sup>b</sup>
		10	-	0,02 ± 0,032 <sup>b</sup>
		40	-	0,014 ± 0,013 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	0	1,003 ± 0,057	0,731 ± 0,062 <sup>a</sup>	
	1,25	-	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	
	2,5	-	0,024 ± 0,017 <sup>c</sup>	
	10	-	0,003 ± 0,005 <sup>d</sup>	

As concentrações de óleo correspondem a ausência de óleo, metade da CIM, CIM (em negrito) e 4 vezes a CIM.  $\mu$ : velocidade específica de crescimento; DO: densidade óptica a 600nm após 24 horas. As diferenças entre as concentrações em cada bactéria foram comparadas por meio do teste ANOVA seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

## Discussão

Os microrganismos que habitam o TGI possuem grande influência sobre os processos metabólicos do hospedeiro, podendo contribuir para a manifestação da obesidade e de suas comorbidades, como resistência insulínica, diabetes e doenças cardiovasculares (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012). Este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antibacteriana do azeite de oliva extra virgem e do óleo de coco virgem contra bactérias da microbiota intestinal relacionadas ao excesso de peso. O óleo de coco apresentou alta atividade antibacteriana, inibindo 7 das 8 culturas bacterianas testadas, com valores de CIM que variaram de 0,156 mmol.L<sup>-1</sup> a 10 mmol.L<sup>-1</sup> (Tabela 3). Este efeito pode estar associado ao ácido láurico, principal AG do óleo de coco, conhecido por sua alta atividade antibacteriana (NAKATSUJI et al., 2009; SHILLING et al., 2013). A CIM dos agentes antibacterianos depende de vários fatores, incluindo as condições de crescimento, a sensibilidade da espécie e o estado fisiológico da célula bacteriana (SADO KAMDEM et al., 2008). Por outro lado, embora o azeite de oliva tenha apresentado efeito antibacteriano contra bactérias de deterioração alimentar (BRENES et al., 2007) e *Helicobacter pylori* (ROMERO et al., 2007) em estudos anteriores, o mesmo foi incapaz de inibir o crescimento dos microrganismos avaliados nas concentrações testadas neste estudo.

Em nosso estudo, mimetizamos o ambiente colônico (concentração colônica das bactérias avaliadas, pH e temperatura) de obesos *in vitro*, local do TGI onde há maior concentração de bactérias. A maior população de bactérias da microbiota intestinal encontra-se no intestino grosso (10<sup>9</sup>–10<sup>12</sup> UFC/mL), onde a maioria das espécies são anaeróbias estritas, incluindo *Bacteroides*, *Clostridium* e *Prevotella* (MOWAT; AGACE, 2014; VERDAM et al., 2013). Apesar da baixa tensão de oxigênio no cólon, algumas espécies aeróbias como o *Enterococcus* e *Lactobacillus* também são encontradas nessa porção do intestino (MOWAT; AGACE, 2014). A obesidade está relacionada à diminuição da riqueza de microrganismos portanto, indivíduos obesos podem apresentar redução do número de bactérias totais no TGI (LE CHATELIER et al., 2013). Além disso, análises de metagenômica demonstraram em amostras de fezes de indivíduos obesos, que as bactérias avaliadas em nosso estudo estão presentes em concentrações de até 0,1% do total de bactérias presentes no cólon (0,1% de 10<sup>9</sup> UFC/mL equivale a 10<sup>6</sup> UFC/mL) (GRAESSLER et al., 2013). Como nós investigamos estirpes com grande potencial de efeito

sobre a obesidade, e não espécies como um todo, consideramos que a concentração de inóculo de  $10^5$  UFC/mL seria a mais adequada para mimetizar o ambiente colônico *in vivo*. O valor de pH e temperaturas adotados neste experimento corresponderam a 7,4 e  $37^\circ\text{C}$ , que se encontram dentro da faixa de pH e temperatura desta porção do intestino e que propiciaram crescimento ótimo das bactérias (NUGENT, 2001).

Estudos anteriores indicam que os AGL resultantes do processo digestivo das gorduras ingeridas possuem alta atividade antibacteriana (BIRARI; BHUTANI, 2007; JACKMAN et al., 2016; SHILLING et al., 2013). A digestão dos lipídeos dietéticos ocorre principalmente no intestino delgado, por meio da hidrólise pela ação da lipase pancreática. O método de titulação utilizado neste estudo para monitoramento da lipólise é comumente aplicado em estudos de digestão de lipídeos, pois fornece a quantidade total de AGL liberados durante a digestão (ZHU et al., 2013).

Quando as gorduras são ingeridas e digeridas, cerca de 93% são absorvidas e participam de vias metabólicas no organismo do indivíduo (GABERT et al., 2011). Apesar de haver diferenças intraindividuais na cinética de excreção, que pode ser lenta ou rápida, geralmente 7% dos AG são excretados nas fezes (GABERT et al., 2011), onde podem influenciar a composição da comunidade microbiana ao passar pelo cólon (BLAUT; CLAVEL, 2007).

Embora não haja consenso sobre a dosagem de óleo de coco a ser consumida para o controle da obesidade, o uso diário de 30 mL do óleo tem sido amplamente recomendado por fornecedores e divulgado como sendo de referência (SHILHAVY; sem data; MERCOLA, 2011) desde a publicação do estudo conduzido por Assunção et al. (2009). Como 7% dos lipídeos ingeridos não são absorvidos (GABERT et al., 2011), ao consumirmos 30 mL de óleo, cerca de 2,1 mL chegam no intestino grosso. Os óleos são compostos por vários AG (ASSUNÇÃO et al., 2009; FAO; WHO, 2001), sendo que no óleo de coco predominam o ácido láurico, mirístico, palmítico e oleico (Tabela 2). Assim, considerando a proporção de AG no óleos, seus pesos moleculares e a quantidade não absorvida, é possível estimar as concentrações em que os mesmos atingem o cólon. O ácido láurico, mirístico, palmítico, oleico e linoleico chegam então no cólon em concentrações de aproximadamente  $4,17 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $1,96 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $1,14 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $0,97 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $0,35 \text{ mmol.L}^{-1}$  respectivamente. Já no azeite de oliva predomina o ácido oleico, palmítico e linoleico (Tabela 2), que chegam nas concentrações de  $5,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $0,74 \text{ mmol.L}^{-1}$



e 0,35 mmol.L<sup>-1</sup> respectivamente. Todas essas concentrações estão dentro da faixa (0,156 a 10 mmol.L<sup>-1</sup>) de concentração do óleo de coco que foram capazes de inibir o crescimento da maioria das bactérias testadas neste estudo. O azeite de oliva não apresentou atividade nas concentrações abaixo de 15 mmol.L<sup>-1</sup>, indicando que seu possível efeito contra essas bactérias seria em concentração acima deste valor. Para isso, a quantidade de azeite consumida teria que ser maior que 30 mL.

A ação do óleo de coco contra *B. fragilis*, *E. faecalis*, *L. paracasei* e *S. aureus* foi totalmente inibitória, mesmo na dose sub-letal não houve nenhum crescimento, sugerindo uma ação bactericida. Por outro lado, a ação do óleo de coco sobre as bactérias *B. ovatus*, *C. perfringens* e *P. intermedia* foi bacteriostática, uma vez que não afetou a velocidade de crescimento, mas reduziu a população bacteriana após 24h à medida que a concentração aumentou (Tabela 4). Tais bactérias estão presentes no TGI em condições normais (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016), porém na obesidade há o desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose), podendo haver o aumento de suas quantidades (DE SOUZA et al., 2015). O ideal é que o agente antibacteriano, no caso o óleo de coco, seja capaz de reduzir as populações aumentadas, melhorando a disbiose, sem extinguir as populações do TGI saudável.

As bactérias que sofreram ação do óleo de coco pertencem aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Tabela 1). O filo *Firmicutes* compreende às bactérias Gram-positivas de mais de 200 gêneros diferentes, incluindo *Clostridium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Ruminococcus* e *Staphylococcus*, enquanto o *Bacteroidetes* consiste em Gram-negativas de aproximadamente 20 gêneros, dentre eles estão *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Prevotella* e *Tannerell* (JOHN; MULLIN, 2016). Estes dois filos dominam a microbiota intestinal humana, sendo que os indivíduos com excesso de peso possuem menor proporção de *Bacteroidetes* e maior de *Firmicutes* que os eutróficos (LEY et al., 2006). Independentemente do filo, também foram detectados aumento dos gêneros *Alistipes*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Phascolarctobacterium* e *Succinivibrio* (DE SOUZA et al., 2015), e *Lactobacillus* (ARMOUGOM et al., 2009) nas fezes de indivíduos com excesso de peso. Embora os *Lactobacillus* sejam conhecidos como bactérias probióticas (PARK; BAE, 2015), algumas estirpes foram associadas à obesidade e ao ganho de peso, como o *L. reuteri* e *L. acidophilus*, respectivamente (MILLION et al., 2012a, 2012b). Apesar do *B. fragilis*, *B. ovatus* e *P.*

*intermedia* serem do filo Bacteroidetes, são gêneros que parecem estar aumentados no excesso de peso (DE SOUZA et al., 2015). Ademais, o filo *Firmicutes* engloba uma ampla variedade de gêneros (JOHN; MULLIN, 2016), possibilitando diferenças entre estes no que diz respeito à contribuição na gênese da obesidade.

Geralmente, bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação antibacteriana de AGL (SADO-KAMDEM; VANNINI; GUERZONI, 2009). Entretanto, neste estudo verificamos que as bactérias Gram-negativas apresentaram valores de CIM muito abaixo das bactérias Gram-positivas, exceto pelo *C. perfringens* que apresentou comportamento similar ao das Gram-negativas. A principal diferença entre Gram-negativas e Gram-positivas está na complexidade do envelope celular. Enquanto as Gram-positivas possuem uma fina parede celular composta de um único tipo de molécula, a das Gram-negativas é quimicamente mais complexa e consiste em, no mínimo, duas camadas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Além disso, as bactérias Gram-negativas possuem endotoxina na membrana externa (lipídeo A), o qual pode causar inflamação crônica subclínica, característica da obesidade (MOREIRA; ALFENAS, 2012). Assim, é de extrema relevância a ação do óleo de coco sobre essas bactérias, visando o tratamento da obesidade.

Agrupando as bactérias segundo seu metabolismo, observou-se que a CIM das bactérias anaeróbias foi menor que a das bactérias aeróbias, indicando que aquelas foram mais sensíveis ao óleo de coco digerido (SADO KAMDEM et al., 2008). Bactérias anaeróbias constituem uma parte significativa da microbiota intestinal humana. Em sua maioria, essas bactérias são anaeróbias estritas e não toleram oxigênio (MOWAT; AGACE, 2014). Acreditamos que a maior ação do óleo sobre essas bactérias tenha ocorrido em função do seu processo de hidrólise *in vitro*. A referida hidrólise não ocorreu em condições de anaerobiose, sendo assim, traços de oxigênio podem ter potencializado a atividade antibacteriana do óleo digerido. A crescente resistência destas bactérias às drogas antibacterianas tem preocupado os pesquisadores (NOVAK et al., 2015). Assim, os lipídeos são promissores agentes contra as bactérias, uma vez que seus mecanismos de ação reduzem a frequência de mutações que resultam em estirpes resistentes (JACKMAN et al., 2016).

Os melhores agentes antibacterianos terapêuticos são aqueles que praticamente não causam reações adversas, possuem um largo espectro de atividade e são incapazes de provocar

resistência aos seus efeitos terapêuticos (PREUSS et al., 2005). Neste estudo, o óleo de coco mostrou ser um bom agente antibacteriano, ao contrário do azeite de oliva. Os resultados concordam parcialmente com a hipótese do trabalho de que a atividade antibacteriana destes óleos poderia agir contra as bactérias testadas e possivelmente influenciar a microbiota intestinal. Neste sentido, o óleo de coco torna-se promissor no tratamento da disbiose característica da obesidade, devido à sua ação contra as bactérias relacionadas ao excesso de peso avaliadas neste estudo. Porém, ressalta-se a necessidade de condução de estudos com humanos a fim de compreender melhor a complexa interação entre lipídeos dietéticos, microbiota intestinal e obesidade.

### **Conclusão**

Concentrações mínimas de 0,156 a 10 mmol.L<sup>-1</sup> de óleo de coco inibiram, *in vitro*, o crescimento de bactérias encontradas na microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso. Por outro lado, o azeite de oliva não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas neste estudo, equivalentes às encontradas no cólon após o consumo de dieta normolipídica.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Referências**

ANGELAKIS, E. et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 91–109, jan. 2012.

ARMOUGOM, F. et al. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7125, 23 set. 2009.

ASM. American Society for Microbiology. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. p. 236, 2005.

- ASSUNÇÃO, M. L. et al. Effects of Dietary Coconut Oil on the Biochemical and Anthropometric Profiles of Women Presenting Abdominal Obesity. **Lipids**, v. 44, n. 7, p. 593–601, jul. 2009.
- BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19-20, p. 879–889, out. 2007.
- BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 751S–5S, mar. 2007.
- BRENES, M. et al. Antimicrobial activity of olive oil. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 18, n. 4, p. 6–8, 2007.
- CHAPLIN, A. et al. Conjugated Linoleic Acid Supplementation under a High-Fat Diet Modulates Stomach Protein Expression and Intestinal Microbiota in Adult Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0125091, 27 abr. 2015.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.** [s.l.: s.n.]. v. 25
- COLLADO, M. C. et al. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 4, p. 894–899, 2008.
- DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 11 jan. 2014.
- DE SOUZA, A. Z. Z. et al. Oral supplementation with l-glutamine alters gut microbiota of obese and overweight adults: A pilot study. **Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 884–889, jun. 2015.
- DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 3 fev. 2010.
- DEVKOTA, S. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10<sup>-/-</sup> mice. **Nature**, v. 487, n. 7405, p. 104–8, 13 jun. 2012.
- FAO; WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. Codex standard for olive oil, virgin and refined and for refined olive-pomace oil. **Codex alimentarius.**, v. 8, 2001.
- FAVA, F. et al. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 2, p. 216–223, 13 fev. 2013.
- GABERT, L. et al. 13C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-13C3]tripalmitin and [1,1,1-13C3]triolein. **Rapid Communications in Mass**

**Spectrometry**, v. 25, n. 19, p. 2697–2703, 15 out. 2011.

GRAESSLER, J. et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 13, n. 6, p. 514–522, 2 dez. 2013.

JACKMAN, J. et al. Nanotechnology Formulations for Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 305, 3 mar. 2016.

JAYASINGHE, T. N. et al. The New Era of Treatment for Obesity and Metabolic Disorders: Evidence and Expectations for Gut Microbiome Transplantation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. February, p. 15, 19 fev. 2016.

JOHN, G. K.; MULLIN, G. E. The Gut Microbiome and Obesity. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 7, p. 45, 2 jul. 2016.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541–546, 28 ago. 2013.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, 21 dez. 2006.

LLOYD-PRICE, J.; ABU-ALI, G.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 51, 27 dez. 2016.

LUCERA, A. et al. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 1–13, 2012.

MANCO, M.; PUTIGNANI, L.; BOTTAZZO, G. F. Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 6, p. 817–844, dez. 2010.

MERCOLA, J. Eat More of Coconut Oil and You Might Slim Your Waist Size in One Week. 2011. Disponível em: <http://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2011/12/29/coconut-oil-slim-your-waist-size-in-one-week.aspx>

MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 6, p. 817–825, 9 jun. 2012a.

MILLION, M. et al. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, n. 2, p. 100–108, ago. 2012b.

MOREIRA, A. P. B.; ALFENAS, R. DE C. G. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance. **Nutrición hospitalaria**, v. 27, n. 2, p. 382–90, 2012.

- MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 19 set. 2014.
- MUJICO, J. R. et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 04, p. 711–720, 10 ago. 2013.
- NADAL, I. et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 10, p. 1370–1370, out. 2012.
- NAKATSUJI, T. et al. Antimicrobial Property of Lauric Acid Against Propionibacterium Acnes: Its Therapeutic Potential for Inflammatory Acne Vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 10, p. 2480–2488, out. 2009.
- NOVAK, A. et al. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013. **Anaerobe**, v. 31, p. 31–36, 2015.
- NUGENT, S. G. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 571–577, 1 abr. 2001.
- OGBOLU, D. O. et al. In Vitro Antimicrobial Properties of Coconut Oil on Candida Species in Ibadan, Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 2, p. 384–387, jun. 2007.
- PARK, S.; BAE, J.-H. Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition Research**, v. 35, n. 7, p. 566–575, jul. 2015.
- ROMERO, C. et al. In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against Helicobacter pylori. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 680–686, fev. 2007.
- SADO KAMDEM, S. et al. Effect of capric, lauric and  $\alpha$ -linolenic acids on the division time distributions of single cells of Staphylococcus aureus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 122–128, nov. 2008.
- SADO-KAMDEM, S. L.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Effect of  $\alpha$ -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in Staphylococcus aureus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 288–294, fev. 2009.
- SANTACRUZ, A. et al. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. **Obesity**, v. 17, n. 10, p. 1906–1915, out. 2009.
- SANTACRUZ, A.; MC, C.; GARCIA-VALDES, L. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **Br J Nutr**, v. 104, p. 83–92, 2010.
- SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos**

**Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, p. 1–49, 2013.

SEK, L.; PORTER, C. J. .; CHARMAN, W. N. Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 3-4, p. 651–661, jun. 2001.

SHILLING, M. et al. Antimicrobial Effects of Virgin Coconut Oil and Its Medium-Chain Fatty Acids on *Clostridium difficile*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 12, p. 1079–1085, dez. 2013.

SHINO, B. et al. Comparison of Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Coconut Oil, Probiotics, and Ketoconazole on *Candida albicans* Isolated in Children with Early Childhood Caries: An In Vitro Study. **Scientifica**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

SHILHAVY, B. Coconut oil for weight loss. Disponível em: <http://coconutoil.com/coconut-oil-weight-loss/>.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. 1–16, 1 maio 2010.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 3, p. 160–168, mar. 2013.

TANGWATCHARIN, P.; SUKSATHIT, S. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by virgin coconut oil, monolaurin and lactic acid in lab medium and fresh pork. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 41, n. 2, p. 345–359, 2014.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H.; BERGSSON, G. Antimicrobial lipids : Role in innate immunity and potential use in prevention and treatment of infections . In: **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. [s.l.] Formatex, 2013. p. 1474–1488.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242–249, 12 set. 2012.

VERALLO-ROWELL, V. M.; DILLAGUE, K. M.; SYAH-TJUNDAWAN, B. S. Novel Antibacterial and Emollient Effects of Coconut and Virgin Olive Oils in Adult Atopic Dermatitis. **Dermatitis**, v. 19, n. 6, p. 308–15, 2008.

VERDAM, F. J. et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **Obesity**, v. 21, n. 12, p. E607–E615, dez. 2013.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. 2015.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 7 out. 2011.

ZAMPA, A. et al. In vitro modulatory effects of colonic microflora by olive oil iridoids. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 18, n. 3-4, p. 147–153, jan. 2006.

ZHU, X. et al. Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 398–404, ago. 2013.

ZUO, H.-J. Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 8, p. 1076, 2011.



## Material suplementar

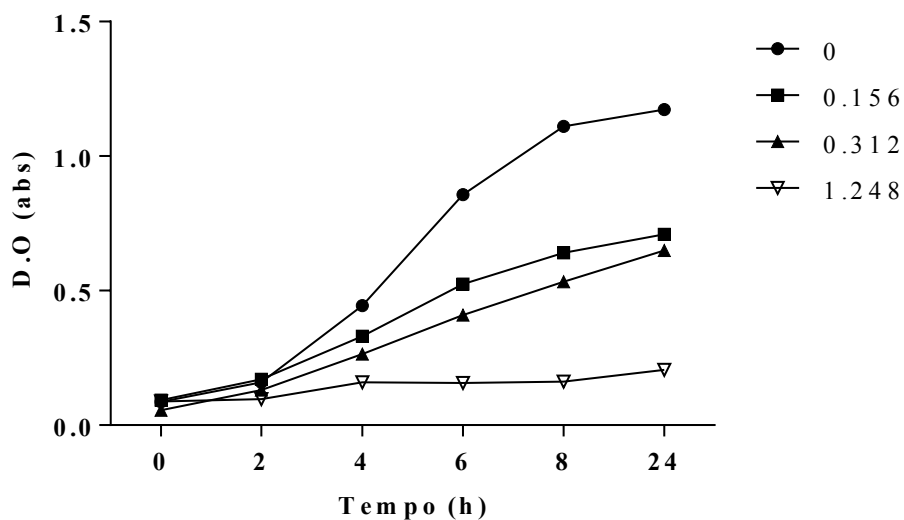


Figura 1S. Curvas de crescimento do *Bacteroides ovatus* nas diferentes concentrações (mmol.L<sup>-1</sup>) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.

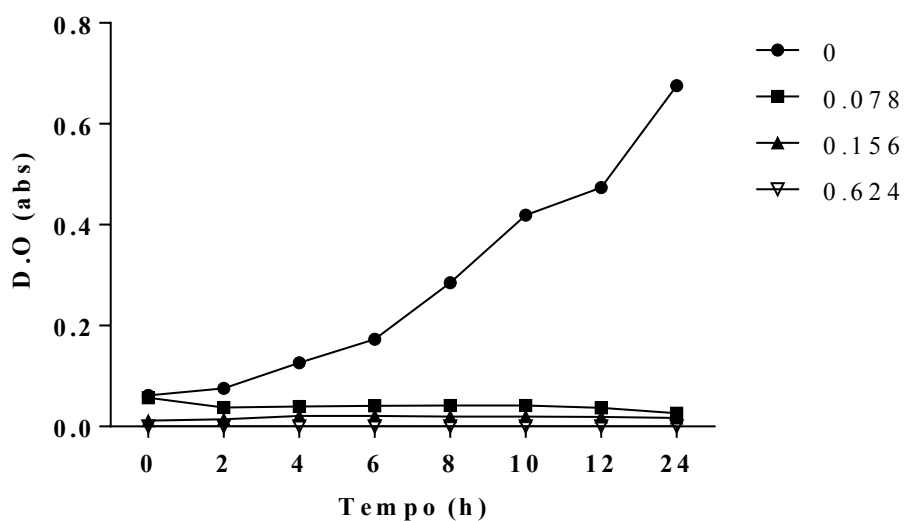


Figura 2S. Curvas de crescimento do *Bacteroides fragilis* nas diferentes concentrações (mmol.L<sup>-1</sup>) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.

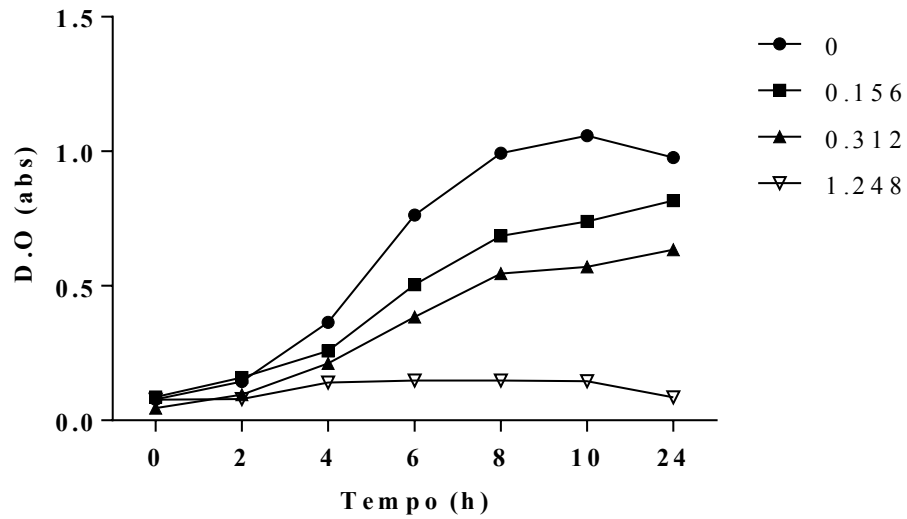


Figura 3S. Curvas de crescimento do *Clostridium perfringens* nas diferentes concentrações (mmol.L<sup>-1</sup>) testadas de óleo de coco digerido, em condições anaeróbias.

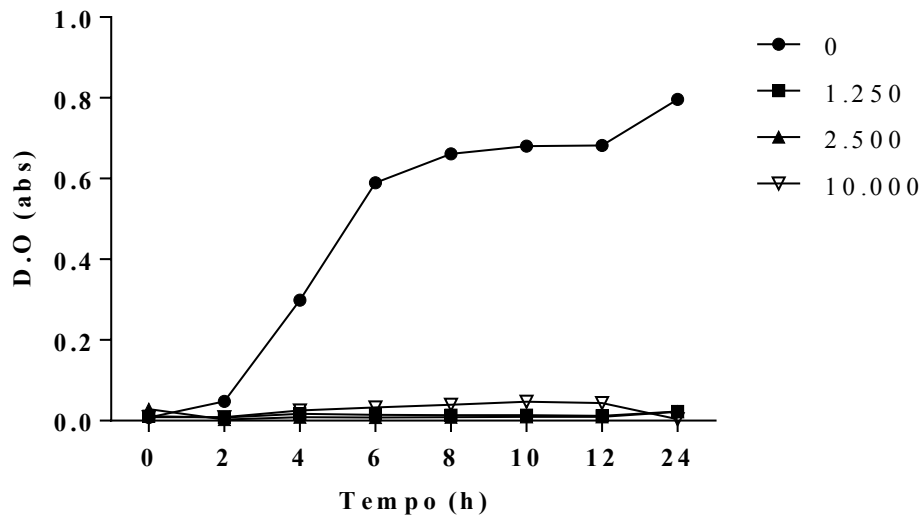


Figura 4S. Curvas de crescimento do *Enterococcus faecalis* nas diferentes concentrações (mmol.L<sup>-1</sup>) testadas de óleo de coco digerido, em condições aeróbias.

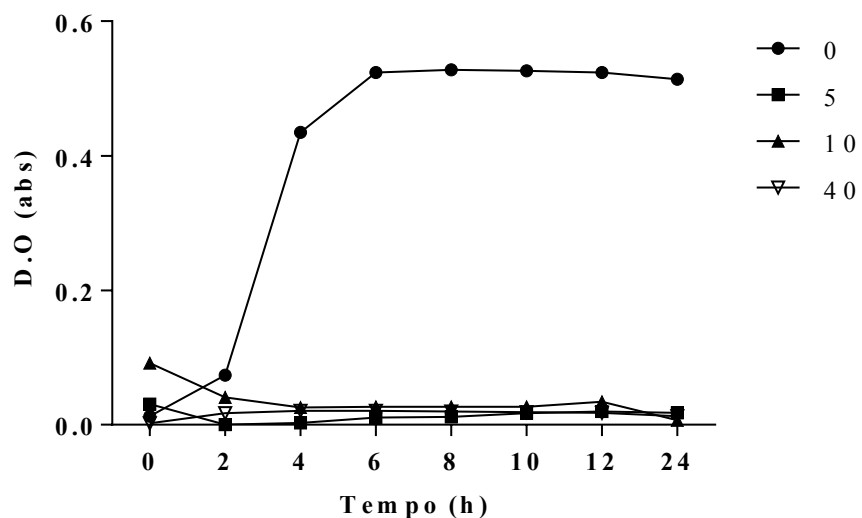


Figura 5S. Curvas de crescimento do *Lactobacillus paracasei* nas diferentes concentrações ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) testadas de óleo de coco digerido, em condições aeróbias.

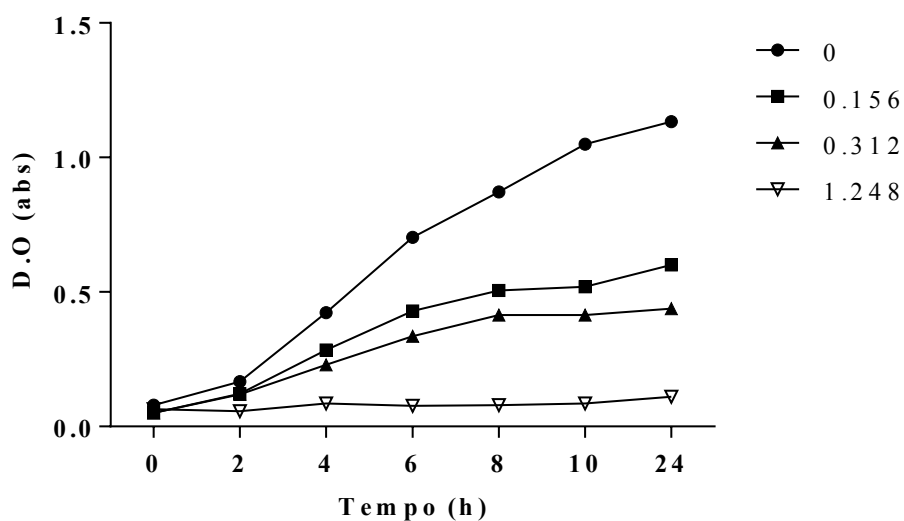


Figura 6S. Curvas de crescimento do *Prevotella intermedia* nas diferentes concentrações ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) testadas de óleo de coco digerido, em condições aeróbias.

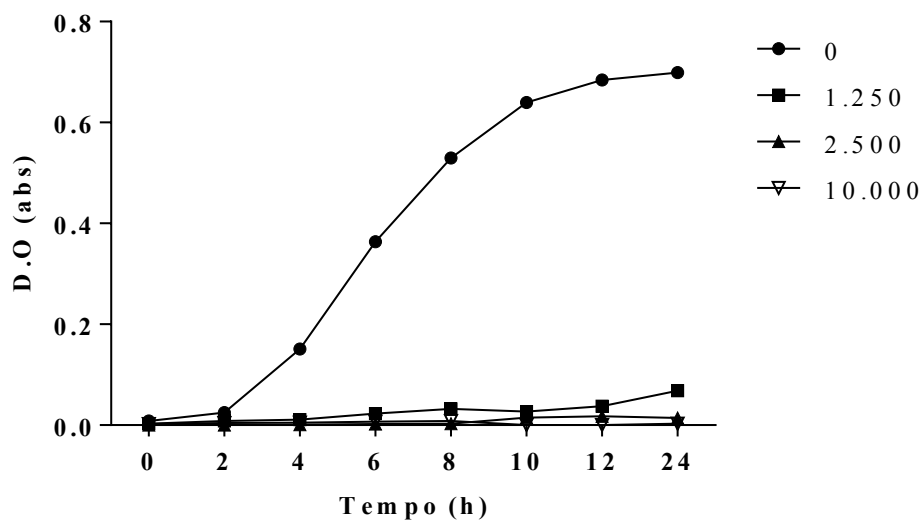


Figura 7S. Curvas de crescimento do *Staphylococcus aureus* nas diferentes concentrações ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) testadas de óleo de coco digerido, em condições aeróbias.

## CONCLUSÕES GERAIS

Diferentes marcas dos dois tipos de óleos avaliados neste estudo apresentaram composição distinta dos compostos antioxidantes. Em relação à vitamina E, enquanto os isômeros do grupo tocoferol foram identificados nas amostras de azeite de oliva, o tocotrienol foi verificado no óleo de coco. O azeite de oliva extra virgem apresentou melhor perfil de compostos bioativos, maior concentração de compostos antioxidantes e maior atividade antioxidante que o óleo de coco e, por isso pode resultar em maiores benefícios no controle da obesidade e na promoção da saúde.

O óleo de coco virgem, em concentrações muito baixas (de 0,156 a 10 mmol.L<sup>-1</sup>) e equivalentes àquelas que chegam ao cólon, apresentou atividade antimicrobiana contra sete das oito bactérias testadas, sugerindo sua possível aplicação na modulação da microbiota intestinal e na prevenção/controla da obesidade em indivíduos com excesso de peso. O azeite de oliva extra virgem não inibiu o crescimento das bactérias relacionadas ao excesso de peso testadas neste estudo. Apesar dos estudos *in vitro* serem de baixo custo, fácil reprodutibilidade e fornecerem resultados rápidos, seus resultados precisam ser melhor estudados e compreendidos em estudos *in vivo*. A microbiota intestinal humana é muito complexa e envolve interações entre muitos microrganismos ali presentes. Diante disso, é necessária a condução de estudos de intervenção bem delineados para verificar os efeitos destes óleos na microbiota de seres humanos com excesso de peso, visando a identificação de estratégias dietéticas capazes de resultar em efeitos benéficos à saúde desses indivíduos.