

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARINA CAMPOS ZICKER

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE COCO EXTRAVIRGEM NO CONTROLE
DA ADIPOSIDADE E SUAS COMORBIDADES**

Belo Horizonte,
2016

MARINA CAMPOS ZICKER

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE COCO EXTRAVIRGEM NO CONTROLE
DA ADIPOSIDADE E SUAS COMORBIDADES**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciências de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Adaliene V. M. Ferreira

Coorientadoras:

Profa. Dra. Renata Adriana Labanca

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

Belo Horizonte,
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPGCA

FOLHA DE APROVAÇÃO

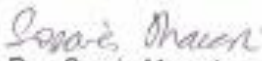
AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE COCO EXTRAVIRGEM NO CONTROLE DA ADIPOSIDADE E SUAS COMORBIDADES

MARINA CAMPOS ZICKER

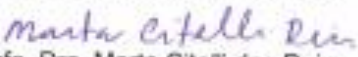
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 07 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Dra. Adalene Versiani Matos Ferreira (Orientadora)
Escola de Enfermagem - UFMG


Profa. Dra. Sorala Macari
Faculdade de Odontologia - UFMG


Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso
Escola de Enfermagem - UFMG


Profa. Dra. Marta Citelli dos Reis
Universidade do estado do rio de Janeiro - UERJ


Profa. Dra. Josefina Bressan
Universidade Federal de Viçosa - UFV


Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira (Coorientadora)
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte, 7 de dezembro de 2016.

Doutoranda: _____
Marina Campos Zicker

Orientadora: _____
Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Co- Orientadora: _____
Profa. Dra. Renata Adriana Labanca

Co- Orientadora: _____
Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

Linha de Pesquisa PPGCA:

Nutrição, Alimentação e Saúde.

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES):

5.00.00.00-4 - CIÊNCIAS AGRÁRIAS

5.07.00.00-6 - Ciência e Tecnologia de Alimentos

5.07.01.00-2 - Ciência de Alimentos

5.07.01.06-1 - Avaliação e Controle de Qualidade de Alimentos

4.00.00.00-1 - CIÊNCIAS DA SAÚDE

4.05.00.00-4 - Nutrição

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR/UFMG), na pessoa da Coordenadora Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira.

Aos Laboratórios de Bromatologia (Unidades de Pesquisa - Química de Alimentos, Análise de Alimentos e Nutrição Experimental) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR/UFMG) por disponibilizarem sua infraestrutura para realização das análises físico-químicas.

Ao Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Mecânica da Escola de Engenharia da UFMG (DEMEC/UFMG) por disponibilizar sua infraestrutura para realização das análises de espectroscopia na região do infravermelho.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB/UFMG) por disponibilizar sua infraestrutura para realização dos ensaios biológicos.

Ao Laboratório de Patologia Bucal Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO/UFMG), por disponibilizar sua infraestrutura para realização das análises de histomorfometria óssea.

Ao Laboratório de Pesquisa em Saúde da UNIMONTES/Hospital Universitário Clemente Faria, por disponibilizar sua infraestrutura para realização das análises pela técnica de PCR.

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À professora Adaliene Ferreira pela orientação. Obrigada por sempre estar presente, auxiliando, orientando, transmitindo toda a sua valiosa carga de conhecimento e experiência. Tenho muito orgulho e alegria por ter sido acolhida por você e ter aprendido tanto ao longo desses anos. Obrigada pela paciência em ajudar, aconselhar e pelo enorme interesse e dedicação para construirmos de forma conjunta, um grande trabalho de pesquisa. Você é, tenho certeza que não somente para mim, mas para todos que a cercam, um modelo de pesquisadora, nutricionista, professora e ser humano. Obrigada acima de tudo, pelo exemplo, no qual pretendo sempre me espelhar.

À professora Renata Labanca pela confiança, acolhimento, orientação e colaboração na realização desse trabalho. Agradeço por sempre me receber com simpatia e disponibilidade em ajudar.

À professora Mila Madeira por ter me acolhido e me orientado. Agradeço pelas sugestões e contribuições sempre valiosas. Obrigada pela disposição em ajudar e sempre estar presente quando precisei da sua colaboração.

À professora Tarcília Silva por ter aberto as portas do seu laboratório e assim, permitido a realização de análises. Obrigada pelas sugestões e por toda a sua colaboração científica.

Ao professor Sérgio Henrique Santos por ter me recebido com muita simpatia no seu local de trabalho em Montes Claros e assim, permitido a realização de análises muito importantes para a conclusão do trabalho. Obrigada ainda pelas sugestões e colaboração na realização desse trabalho.

À professora Raquel Linhares, pela enorme colaboração e disposição em ajudar. Obrigada por oferecer seu laboratório e recursos para a realização de análises. Sua colaboração foi essencial para a concretização desse trabalho.

Ao Professor Roberto Junqueira e à professora Scheilla Vitorino, que na condição de coordenadores do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA), sempre se mostraram disponíveis e cordiais para colaborar e esclarecer dúvidas.

À funcionária Úrsula, exemplar e dedicada secretária do PPGCA, que sempre apresentou disponibilidade em auxiliar, sanar dúvidas e resolver dificuldades.

À funcionária Edna Souza técnica do laboratório de Nutrição Experimental, que me salvou tantas vezes de adversidades e sempre se dedicou ao máximo para

que tudo pudesse funcionar da melhor forma possível no laboratório. Obrigada pela sua maestria em organizar, limpar, providenciar soluções e resolver problemas. Obrigada também pela alegria e risadas compartilhadas, que tornavam os dias e os problemas mais leves.

Ao IME (Grupo de Pesquisa Imunometabolismo), pela enorme colaboração, acolhimento e por todas as alegrias compartilhadas. Fazer parte desse generoso grupo de pesquisa me auxiliou muito na construção de uma profissional melhor, mas acima de tudo, de um ser humano melhor.

À Ana Letícia (Nildoca). Obrigada pela enorme colaboração, interesse e dedicação em ajudar. Você foi essencial na realização desse trabalho e gostaria que você soubesse da minha enorme admiração por você, pela profissional e pessoa que é. Nossa relação vai muito além do coleguismo profissional, te vejo como uma amiga que empregou alegria, companheirismo e cumplicidade na minha vida. Terei sempre na lembrança os experimentos estressantes (mas sempre divertidos) que fizemos juntas, nossas conversas sobre o futuro, técnicas capilares, desilusões e alegrias. Obrigada Nilda, por ter deixado esses anos de doutorado, mais leves, divertidos e sempre permeados da sua simpatia e solidariedade.

À Débora Romualdo (Romilda). Obrigada pela imensurável ajuda na realização de análises e pelo seu enorme interesse em colaborar. Você é para mim, não somente um modelo de profissional, por toda a sua dedicação, empenho e seriedade, mas acima de tudo, um modelo de ser humano. Obrigada por ter me ajudado a mostrar que muito além de conquistas profissionais, a realização pessoal é moldada pelas nossas relações pessoais e que o mais importante nessa vida são os encontros e as marcas da passagem de cada pessoa em nossos caminhos.

À Débora F. Rodrigues (Debsleia). Obrigada pela colaboração, paciência em ensinar as práticas mais elementares, com toda tranquilidade e amor. Agradeço muito por você ter sido a primeira pessoa a ter me acolhido, me ajudado e me mostrado que com alegria e simplicidade, a vida pode ser muito mais fácil. Obrigada por todo o seu esforço em ajudar, sempre.

À Cíntia Tarabal Oliveira (Cintilante). Obrigada por toda colaboração, mesmo nos momentos em que você era quem mais precisava de ajuda. Mesmo com as adversidades da vida, você sempre esteve presente e fazia questão de colaborar. Minha gratidão por isso é imensurável. Obrigada por ter sido também uma amiga,

por nesses anos termos compartilhado alegrias, tristezas, insatisfações, fofocas e risadas.

À Katia Costa (Katita). Obrigada por ajudar, pura e simplesmente por bondade. Você me mostrou que a maior retribuição que podemos ter em ajudar o próximo é ver a alegria e a gratidão que despertamos. Obrigada também pelos momentos que compartilhamos angústias, dúvidas, insatisfações, medos e também, alegrias.

À Cynthia Honorato Val. Obrigada por ser essa pessoa solidária, amiga, com um coração enorme. Infelizmente não tivemos muito tempo de convivência, mas o pouco tempo que esteve presente em minha vida deixou importantes marcas.

À Marina Oliveira pela ajuda no esclarecimento de dúvidas e dificuldades na realização das análises. Obrigada pela transmissão do seu vasto conhecimento, que foi essencial para a realização de muitos experimentos.

À Carina Montalvany pela enorme e essencial colaboração nas análises ósseas. Obrigada pela sua grande dedicação e interesse na condução do trabalho. Agradeço ainda pela amizade, pelas conversas divertidas, as constantes risadas, o compartilhamento de alegrias, mas também de angústias e incertezas.

À Nathália Pacífico que colaborou enormemente na elaboração de protocolos operacionais e sempre demonstrou dedicação e envolvimento nas suas atividades como aluna de iniciação científica.

À Mariana Emídio (Mari) e Déborah Oliveira (Debs), por terem sido sempre tão dedicadas e empenhadas em fazer um ótimo trabalho. Obrigada pela enorme e valiosa colaboração de vocês e também pelas alegrias e risadas que sempre compartilhamos. Sempre tive muito orgulho de ter vocês como alunas de iniciação científica e espero que a vida lhes reserve tantas realizações e sucesso quanto vocês merecem.

À dupla de TCC Mariana Emídio (Mari) e Ludmila Souza (Lud), por serem tão empenhadas, me despertarem orgulho e satisfação por orientá-las. Saibam que nesses meses de TCC, eu sempre aprendi muito mais com vocês, do que ensinei.

Aos sempre dedicados alunos de iniciação científica: Matheus Amaral, Brenda Monteiro, Josiana Sabino e Amanda Carla, que sempre foram muito empenhados, proativos e disponíveis em colaborar.

À Aline Domingues (Crau), que foi uma amiga divertida e companheira de análises. Compartilhamos muitas alegrias e dificuldades e lhe agradeço por tantos momentos de cumplicidade no lab.

À Ana Paula Cr Ca (Nety), por compartilharmos a elaboração do trabalho de espectroscopia no infravermelho. Agradeço por toda a sua dedicação, empenho, inteligência e por oferecer a valiosa oportunidade de trabalharmos juntas. Obrigada também pela sua amizade, que sempre trouxe alegria, companheirismo e inspiração para minha vida.

Ao Leandro Ceotto pela colaboração e por sua alegria e senso de humor, que tornava os momentos mais leves e felizes. Agradeço pela dedicação e esforço, mesmo quando o destino não estava muito a nosso favor. Obrigada pelos momentos de alegrias e angústias, aventuras e desventuras compartilhadas em Montes Claros (Moc Hell).

À Alanna Paraiso (Lanety) pela enorme ajuda e dedicação na realização dos PCRs. Sou muito grata pelo acolhimento na sua casa em Montes Claros, onde fui muito bem tratada e recebida e onde compartilhamos muitas risadas, almoços, desilusões amorosas, fofocas e alegrias.

À Jaciara Neves (Jacy) que com sua alegria, seu coração enorme e seu abraço quentinho acalentou muitas manhãs angustiadas em Montes Claros.

Ao João Marcus e a Deborah Lelis, por terem me recebido de forma sempre muito cordial e simpática em Montes Claros.

À Érica Leandro pela essencial colaboração na realização das análises de citometria de fluxo. Obrigada pela disponibilidade em ajudar.

À minha amada mãe, Luiza Trancoso que sempre me apoiou incondicionalmente, me ofereceu amor, carinho e muitas palavras de motivação, para que eu continuasse em frente. Obrigada por ser meu porto seguro, minha melhor amiga e por se dedicar sempre para garantir a minha felicidade.

Ao meu amado pai, Alberto Zicker que sempre acreditou no meu potencial e me ofereceu apoio, amor, incentivo e colaboração. Obrigada por ter sido sempre a minha maior inspiração de sucesso e dedicação. Por toda a vida me inspirei em você para ser uma profissional melhor e se hoje conquisto esse título, grande parte da responsabilidade é sua.

Ao meu amado irmão Marcelo C Zicker (Minino), por sempre ter sido, mesmo há milhares de quilômetros de distância, a pessoa mais presente na minha vida.

Obrigada por ter sido meu maior companheiro ao longo da vida, me aconselhando, me apoiando, me oferecendo seu amor e cumplicidade.

Aos meus amados irmãos Taís (Taticrazy) e Gustavo Birchal Zicker (Guzi), por terem empregado amor e alegria na minha vida. Apesar de não convivermos muito, saibam que são uma parte importante da minha vida e da minha história e trago sempre em mente, a presença divertida e amorosa de vocês.

Ao meu amado namorado Fidelis Chevreux, por ter me dado força, motivação, amor e apoio para me manter dedicada ao trabalho. Mesmo com o seu lamento devido aos inúmeros finais de semana, feriados e madrugadas que precisei abrir mão de estar com você, para me dedicar ao doutorado, eu tenho certeza que tinha seu apoio incondicional. Obrigada por ter sido uma inspiração e um motivo para que eu me tornasse uma pessoa e uma profissional cada vez melhor. Sou muito grata por você fazer parte da minha vida e oferecer toda a felicidade e plenitude necessárias para me fazer enxergar o sentido de existir, dia após dia. Devido à sua presença na minha vida eu tive forças e vontade de seguir sempre adiante e conquistar tudo que conquistei.

Às queridas amigas, que empregaram muitas alegrias e companheirismo nesta dura e gratificante caminhada, em especial a Ana Soares (Susu), Raphaela Fabri (Raphoca), Priscila Soares (Prisca), Graziela Silveira (Graciane), Bárbara Almeida (Barba), Isabela Ramos (Bellys) e Letícia Scarpa (Leuta).

E à todos cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1.INTRODUÇÃO	23
2.OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.1 Objetivos específicos	26
3. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1 A obesidade.....	27
3.1.1Obesidade e comorbidades associadas.....	27
3.1.2 Estratégias para tratamento da obesidade.....	32
3.2 O óleo de coco.....	34
3.2.1 Propriedades benéficas do óleo de coco extravirgem na saúde	37
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO I Qualidade físico-química de óleos de coco extravirgem comercializados no Brasil	55
CAPÍTULO II Quantitative analysis of acidity level in virgin coconut oils by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics	80
CAPÍTULO III Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice.....	98
CAPÍTULO IV Protective effect of virgin coconut oil on bone dysfunction-induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice.....	138
5.CONCLUSÕES INTEGRADAS	167
ANEXO I: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEUA/UFMG	168

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos do óleo de coco extravirgem.....	34
---	----

Capítulo 1

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos dos óleos de coco extra virgem (%) e avaliação de conformidade em relação aos padrões de identidade e qualidade.....	66
---	----

Tabela 2 - Composição em ácidos graxos do óleo de coco extravirgem de acordo com diferentes estudos.....	69
--	----

Tabela 3 – Análise físico química dos óleos de coco extravirgem (%) e avaliação de conformidade em relação aos padrões de identidade e qualidade.....	70
---	----

Tabela 4 – Período de indução (horas) dos óleos de coco extravirgem.....	74
--	----

Capítulo 2

Tabela 1 – FFA (%) of virgin coconut oil samples.....	86
---	----

Tabela 2 - Performance results of full spectrum PLSR models based on different data preprocessing techniques Model.....	88
---	----

Tabela 3 - Performance results of PLSR models based on different spectral regions Model.....	90
--	----

Tabela 4 - Figures of merit of the optimized FTIR method for the determination of FFA levels in VCO.....	92
--	----

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 – Expansão do tecido adiposo é associada à inflamação e desregulação metabólica.....	28
Figura 2 - Uma visão esquemática do sistema RANKL/RANK/OPG.....	30
Figura 3 – Mecanismos envolvidos no aumento da reabsorção óssea na obesidade.....	31
Figura 4 – Modulação do ganho de adiposidade e da inflamação por compostos alimentares bioativos	33
Figura 5 - Digestão e absorção de triglicérides de cadeia longa e média.....	38

Capítulo 1

Figura 1 – Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa das amostras 1 (A), 2 (B) e 3 (C).....	68
--	----

Capítulo 2

Figura 1 – Average of FFA from each commercial brand of VCO samples classified as appropriate for consumption or expired.....	86
Figura 2 – Mean average FTIR spectra obtained for coconut oil.....	88
Figura 3 – Mean average spectra of coconut oil obtained by FTIR submitted to SNV and first derivative.....	89
Figura 4 - VIP scores of the full-spectrum (3100-2800/1800- 680cm ⁻¹) PLSR model based on SNV followed by first derivative spectra.....	90
Figura 5 - Outlier removal strategy based on (a) Hotelling's T-squared distribution versus Q-residues plot and (b) leverage versus Student- t-student residues plot.....	91

Figura 6 - (a) Measured versus predicted levels of acidity (%), and (b) residual versus levels of acidity (%) in virgin coconut oil, based on the optimized PLS model (1778-1670/1527-1350/1220-1035cm ⁻¹) after outlier removal.....	91
---	----

Capítulo 3

Figura 1 – Experimental design of obesity induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice and VCO treatment.....	103
Figura 2 – Effect of dietary VCO supplementation in body weight gain, adipose tissues weight and adipocyte size.....	111
Figura 3 – Effect of dietary VCO supplementation in the oxygen consumption (VO ₂), energy expenditure (EE) and respiratory exchange ratio (RER).....	112
Figura 4 - Effect of dietary VCO supplementation in the mRNA expression in epididymal adipose tissue.....	113
Figura 5 - Effect of VCO supplementation on glucose tolerance, fasting glucose and serum lipids.....	115
Figura 6 - Effect of VCO supplementation on adipocytokine levels, on total leukocyte count and differential count of mononuclear cells and polymorphonuclear cells.....	117
Figura 7 - Effect of VCO supplementation on leukocyte-endothelium and on production of cytokines in epididymal adipose tissue.....	119
Figura 8 - Effect of VCO supplementation on stroma vascular cells from epididymal adipose tissue	121
Figura 9 - Effect of VCO supplementation on liver parameters.....	123

Capítulo 4

Figura 1 – Effect of HC diet and VCO supplementation on percentage of trabecular bone in proximal and distal femur.....	147
Figura 2 – Effect of HC diet and VCO supplementation on percentage of trabecular bone in tibia and in lumbar vertebrae.....	148
Figura 3 - Micro-CT analysis of trabecular bone in the femur.....	150

Figura 4 - Micro-CT analysis of maxillary bone.....	152
Figura 5 - Effect of dietary VCO supplementation in the mRNA expression in the maxilla.....	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil CoA Carboxilase
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
AGL	Ácidos graxos livres
AGSCL	Ácidos graxos saturados de cadeia longa
AKT	Proteína quinase B (<i>protein kinase B</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Brasileira de Vigilância Sanitária
AOCS	<i>American Oil Chemists Society</i>
APCC	<i>Asian and Pacific Coconut Community</i>
AST	Aspartato aminotransferase
ATR	Reflectância total atenuada (<i>attenuated total reflectance</i>)
AT-SVC	Células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo (<i>adipose tissue-derived stromal vascular cells</i>)
AUC	Área sob a curva (<i>area under the curve</i>)
AV	Valor de acidez (<i>acid value</i>)
BMD	Densidade óssea mineral (<i>bone mineral density</i>)
BV	Volume ósseo (<i>bone volume</i>)
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo por volume de tecido (<i>percentage of trabecular bone volume/total volume</i>)
BW	Peso corporal (<i>body weight</i>)

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CVD	Doença cardiovascular (<i>cardiovascular disease</i>)
DLATGS	Deuterated triglycine sulfate doped with L-alanine
EE	Gasto energético estimado (<i>estimate energy expenditure</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FFA	Ácidos graxos livres (<i>free fat acid</i>)
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>)
GSH	Glutathiona reduzida (<i>reduced glutathione</i>)
HC	Dieta rica em carboidrato refinado (<i>high-refined carbohydrate-containing diet</i>)
HVCO	Grupo experimental alimentado com dieta rica em carboidratos refinados acrescida de dosagem elevada de óleo de coco extravirgem (9000 mg/Kg de peso corporal)
IL-1 β	Interleucina-1 β (<i>interleukin 1β</i>)
IL-4	Interleucina-4 (<i>interleukin 4</i>)
IL-6	Interleucina-6 (<i>interleukin 6</i>)
IL-10	Interleucina-10 (<i>interleukin 10</i>)
IL-13	Interleucina-13 (<i>interleukin 13</i>)
LCFA	Ácidos graxos de cadeia longa (<i>long-chain fatty acid</i>)
Lmax	Carga máxima de fratura (<i>maximum load</i>)
LV	Variável latente (<i>latent variable</i>)
LVCO	Grupo experimental alimentado com dieta rica em carboidratos refinados

	acrescida de baixa dosagem de óleo de coco extravirgem (1000 mg/Kg de peso corporal)
MCFA	Ácidos graxos de cadeia média (<i>medium-chain fatty acid</i>)
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulante da colônia de macrófagos (<i>macrophage colony stimulation factor</i>)
MCT	Triglicerídeos de cadeia media (<i>medium-chain triglyceride</i>)
MicroCT	Micro tomografia computadorizada (<i>micro computed tomography</i>)
MIF	Fator inibitório da migração de macrófagos
Mres	Macrófagos resolutivos (<i>resolution-phase macrophages</i>)
MSC	Célula tronco mesenquimal (<i>mesenchymal stem cells</i>)
MVCO	Grupo experimental alimentado com dieta rica em carboidratos refinados acrescida de dosagem média de óleo de coco extravirgem (3000 mg/Kg de peso corporal)
NEFA	Ácidos graxos não esterificados (<i>non-esterified fatty acids</i>)
OCEV	Óleo de coco extravirgem
OPG	OPG – Osteoprotegerina (<i>osteoprotegerin</i>)
PCR – RT	Reação em cadeia da polimerase <i>em tempo real</i> (<i>real-time polymerase chain reaction</i>)
PIQ	PIQ
PLSR)	Regressão de mínimos quadrados parciais (<i>partial least squares regression</i>)
PNS	PNS - <i>Philippine National Standard</i>
PPAR γ	PPAR γ
R	Coefficiente de correlação (<i>correlation coefficient</i>)
RANK	Receptor de ativação nuclear <i>kappa B</i> (<i>receptor activator of nuclear factor NF-kB</i>)

RANKL	Ligante do receptor de ativação nuclear kappa B (<i>receptor activator of nuclear factor NF-kB ligand</i>)
REF	Reganho de peso (<i>bodyweight gain rebound</i>)
RER	Taxa de trocas respiratórias (<i>respiratory exchange ratio</i>)
RMSEC	Raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (<i>root mean square error of calibration</i>)
RMSECV	Raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (<i>root mean square error of cross validation</i>)
RMSEP	Raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (<i>root mean square error of prediction</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
RPD	Relação de desempenho de desvio (<i>relative prediction deviation</i>)
RUNX2	Fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (<i>Runt related transcription factor 2</i>)
SEL	Erro padrão do laboratório (<i>standard error of the laboratory</i>)
SF	Gordura saturada (<i>saturated fat</i>)
SNV	Padronização pelo desvio (<i>standard normal variate</i>)
St	Rigidez (<i>stiffness</i>)
Tb.N	Número de trabéculas (<i>trabecular number</i>)
Tb.Pf	Grau de conectividade entre as trabéculas (<i>trabecular parttern factor</i>)
Tb.Th	Espessura da trabécula (<i>trabecular thickness</i>)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>total thiobarbituric acid-reactive substance</i>)
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)

TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (<i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>)
VCO	Óleo de coco virgem (<i>virgin coconut oil</i>)
VIP	Importância da variável para projeção (<i>variable importance in the projection</i>)

RESUMO

A obesidade, doença caracterizada pelo excessivo acúmulo de gordura corporal, por ser associada à inflamação crônica e à importante estresse oxidativo, está envolvida no desenvolvimento de comorbidades metabólicas e ósseas. Estudos demonstram que determinados alimentos podem promover efeitos benéficos na obesidade e alterações associadas, por induzirem redução do ganho de peso e da inflamação, além de promoverem aumento da defesa antioxidante. Dentre esses alimentos, apesar de incipiente grau de evidência científica, cita-se o óleo de coco extravirgem (OCEV). A esse produto têm sido atribuídas ações benéficas à saúde devido ao seu conteúdo significativo de compostos antioxidantes (compostos fenólicos e vitaminas) e de ácidos graxos de cadeia média, lipídios com potencial efeito na redução da adiposidade e no estabelecimento de homeostase metabólica. O objetivo desse estudo foi realizar uma criteriosa análise de qualidade e identidade do OCEV e posteriormente, avaliar o potencial desse produto em controlar a obesidade e as alterações metabólicas, inflamatórias e ósseas associadas, induzidas por dieta rica em carboidratos refinados (HC), em camundongos. A suplementação de OCEV resultou em menor adiposidade associada a menor área de adipócitos, efeito atribuído à menor expressão da enzima acetil coa carboxilase (ACC). O consumo de OCEV ocasionou ainda manutenção de homeostase glicêmica, menor concentração sérica de lípidos (colesterol e triglicérides), ácidos graxos livres e leptina, aumento da concentração de adiponectina no soro, redução de lípidios totais e colesterol no fígado, menor rolamento de leucócitos no endotélio vascular do tecido adiposo epididimal, menores concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) nos tecidos adiposos epididimal e inguinal, assim como menor contagem de leucócitos totais e células mononucleares e polimorfonucleares no sangue. Uma das alterações decorrentes do consumo de dieta HC é o prejuízo na saúde óssea. Entretanto, o consumo de OCEV reverteu tal efeito, uma vez que promoveu aumento no percentual de osso trabecular em diferentes sítios ósseos (tíbia, fêmur, vértebras lombares e maxila), assim como, maior densidade mineral óssea do fêmur e do osso alveolar. Conclui-se que a suplementação de OCEV foi efetiva para controlar o excesso de adiposidade e as alterações metabólicas, inflamatórias e ósseas associadas, em modelo experimental de obesidade.

Palavras chave: óleo de coco extravirgem, obesidade, alterações metabólicas.

ABSTRACT

The obesity is characterized by excessive fat storage and since it is associated with chronic low grade inflammation and significant oxidative stress, this disease is involved in triggering metabolic and bone disorders. Studies have shown that certain foods could promote beneficial effects in obesity and related comorbidities, once they induce lower weight gain, decrease of inflammation and higher oxidative defense. Among those foods, despite low scientific evidence, we can mention virgin coconut oil (VCO). Health benefits have been attributed to VCO consumption that may be related to the content of bioactive ingredients such as polyphenols, vitamins and medium chain fatty acids (MCFA), lipids that could act to decrease adiposity gain and to promote metabolic homeostasis. The aim of the present study was to investigate the physical and chemical properties of VCO, evaluating their quality and identity, and thus, analyzing the potential in treating obesity and related metabolic, inflammatory and bone disorders, induced by a high-refined carbohydrate-containing diet in mice. The VCO supplementation induced lower adiposity associated with lower adipocyte area, due to acetyl coa carboxylase lower expression. The VCO consumption has also promoted maintenance of glycemic homeostasis, lower serum concentration of lipids (cholesterol and triglycerides), non-esterified fatty acids and leptin, higher adiponectin serum concentration, decrease of total lipids and cholesterol in liver, lower leukocytes rolling in epididymal adipose tissue, lower concentration of proinflammatory cytokines (IL-6 e TNF- α) in epididymal and inguinal adipose tissues, as well as lower blood count of total leukocytes, mononuclear and polymorphonuclear cells. Animals that were fed with VCO also exhibited greater percentage of trabecular bone in different bone sites (tibia, femur, lumbar vertebrae and maxillae) in addition to higher femur and alveolar bone mineral density. In conclusion, VCO supplementation was effective to control obesity and related metabolic, inflammatory and bone disorders in experimental obesity model.

Keywords: virgin coconut oil, obesity, metabolic disorders.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença de elevada prevalência em todo o mundo (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016), caracterizada pela excessiva adiposidade corporal (WHO, 2012). Essa condição, por ser associada à inflamação crônica e de baixo grau (OSBORN & OLEFSKY, 2012) e a significativo estresse oxidativo (FURUKAWA et al., 2004; HOPPS et al., 2010), favorece o desenvolvimento de comorbidades, tais como diabetes melito tipo 2, dislipidemias, doença hepática gordurosa não alcoólica, doenças cardiovasculares (MCARDLE et al., 2013; HILL et al., 2014), assim como, prejuízos na saúde óssea (ZHAO et al., 2008; HALADE et al., 2011). Além disso, a obesidade é associada ao aumento da perda óssea espontânea e, conseqüentemente, à diminuição da densidade mineral óssea (HALADE et al., 2010; CAO, 2011), não somente dos ossos longos, mas também de ossos faciais como a maxila e a mandíbula (CAVAGNI et al. 2014). Sendo assim, a obesidade relaciona-se a piora da qualidade de vida dos indivíduos e a significativo número de mortes e invalidez, além de elevados custos governamentais com saúde (WITHROW & ALTER, 2011; WHO, 2015).

Considerando que as estratégias tradicionais aplicadas no tratamento da obesidade (dieta hipocalórica, prática de atividade física e uso de fármacos), apresentam baixos índices de adesão e, portanto, de sucesso em longo prazo (KOEHNLEIN et al. 2008; MCARDLE et al., 2013), almejam-se medidas alternativas para possibilitar efetivo controle e tratamento dessa doença e suas comorbidades associadas.

Dentre essas medidas alternativas, cita-se a inclusão na dieta de determinados alimentos, com alegação de funcionalidade (BRASIL, 2005), que podem auxiliar no tratamento da obesidade, devido à suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e termogênica (HIRAI et al., 2010; DULLOO, 2011; SIRIWARDHANA et al., 2013).

Recentemente, o óleo de coco extravirgem (OCEV), que se trata do produto resultante da primeira prensagem da polpa de coco fresca, a frio, sem aplicação do processo de refinamento, tem ganhado elevada popularidade como um alimento dotado de alegação de funcionalidade (MARINA et al., 2009c). Tal atribuição de funcionalidade do OCEV ocorre devido ao seu conteúdo significativo de compostos

antioxidantes (compostos fenólicos, vitamina E e pró vitamina A) (SENEVIRATNE et al., 2009; ZAKARIA et al., 2010; MANSOR et al., 2012), assim como da presença majoritária em sua composição de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), lipídios com 6 a 12 carbonos na cadeia (MARINA et al., 2009c). Estudos experimentais e clínicos mostram os AGCM possuem potencial efeito benéfico na redução da adiposidade e no estabelecimento de homeostase metabólica (PORTILLO et al., 1998; ASSUNÇÃO et al., 2009; LIAU et al., 2011; SILVA et al., 2011).

O óleo de coco apresenta, em sua maior parte, ácidos graxos de cadeia saturada, aos quais, tradicionalmente, são atribuídos efeitos indesejáveis a saúde, tais como aumento do colesterol e da inflamação sistêmica (MAHLEY, 1982; LOTTENBERG et al., 2009; SANTOS et al., 2013) e, portanto, do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sendo assim, apesar das recentes alegações benéficas atribuídas ao OCEV, a recomendação de incluir esse produto na dieta permanece controversa (EYRES, et al., 2016). Estudos epidemiológicos realizados em populações da África, da Ásia e do Pacífico Sul, cujas dietas apresentam predominância do óleo de coco como fonte de lipídios, demonstram baixa incidência de doenças cardiovasculares, dislipidemia e outros agravos normalmente associados ao consumo de gordura saturada. Tal fato corrobora que os ácidos graxos saturados presentes de forma majoritária no óleo de coco (AGCM), parecem exercer um papel metabólico diferenciado, em relação aos ácidos graxos saturados de cadeia longa (AGSCL). Em comparação aos AGSCL, os AGCM apresentam metabolização mais rápida e eficiente (MARTEN et al., 2006), ocasionam em maior gasto energético (BABA et al., 1982; ST-ONGE et al., 2003; TURNER et al., 2009; DULLOO, 2012; ZHANG et al., 2015), apresentam baixa e não significativa contribuição no aumento de colesterol sérico (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008; ZAKARIA et al., 2010), além de ocasionarem redução da lipogênese (GUO et al., 2000; HAN et al., 2003; SUN et al., 2013) e aumento na taxa de beta-oxidação (CLEGG, 2010). Os AGCM podem ter ainda, ação importante na melhora da homeostase glicêmica devido ao aumento na produção e na sensibilidade à insulina (FELTRIN et al., 2004; NAKAMURA et al., 2004; TERADA et al., 2012; SUN et al., 2013; VEECH et al., 2013). Sendo assim, infere-se que o OCEV, por ser um alimento formado em sua maior parte por AGCM, possa contribuir para redução do ganho de peso corporal e para manutenção de um perfil metabólico adequado (MARINA et al., 2009c).

A composição e as propriedades físico-químicas do óleo de coco diferem significativamente de acordo com o tipo de processo utilizado para sua obtenção (SENEVIRATNE et al., 2009; ZAKARIA et al., 2010; MANSOR et al., 2012), a aplicação de refinamento (GORDON & RAHMAN, 1991; DAYRIT et al., 2011), o uso de calor no processamento (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008; SENEVIRATNE & DISSANAYAKE, 2008; NEVIN & RAJAMOHAN, 2009) e o local e as condições de cultivo do coco (PORTILLO et al., 1998; KHAN et al., 2008; MARINA et al., 2009a; GOPALA et al., 2010; KUMAR & KRISHNA, 2015). Considerando que as características físico-químicas do óleo de coco relacionam-se diretamente com o potencial do mesmo em promover efeitos desejáveis à saúde (MARINA et al., 2009c) e que esse produto é alvo importante de fraudes, devido ao seu elevado custo e dificuldade de obtenção (MANAF et al., 2007) faz-se necessária a caracterização físico-química e o controle de qualidade criteriosos do OCEV.

Levando em consideração que até o presente momento são inexistentes estudos da composição físico-química do OCEV produzido/comercializado no Brasil e que é ainda incipiente o grau de evidência científica dos benefícios à saúde associados ao consumo desse produto (EYRES et al., 2016), os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização físico-química do OCEV e, posteriormente, avaliar os efeitos desse, na obesidade e alterações metabólicas, inflamatórias e ósseas induzidas por dieta rica em carboidratos refinados, em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação do consumo do óleo de coco extravirgem no tratamento da obesidade e suas comorbidades associadas em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química, a análise da composição de ácidos graxos e a determinação da estabilidade oxidativa de óleos de coco extravirgem comercializados no Brasil;
- Desenvolver modelo de análise da acidez do óleo de coco extravirgem por meio da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria;
- Analisar a influência do óleo de coco extravirgem na adiposidade e alterações metabólicas e inflamatórias induzidas por dieta rica em carboidratos refinados, em camundongos.
- Analisar a influência do óleo de coco extravirgem nas alterações ósseas induzidas por dieta rica em carboidratos refinados, em camundongos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Obesidade

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que, por sua vez, compromete a saúde dos indivíduos, acarretando em prejuízos tais como: alterações metabólicas, respiratórias, locomotoras e ósseas (WANDERLEY & FERREIRA, 2010; WHO, 2012). É um importante problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido, não somente, à gravidade das comorbidades associadas, mas também à elevada prevalência dessa condição. Em 2014 foram detectados 614 milhões de indivíduos obesos no mundo e, caso o ritmo de crescimento da obesidade mantenha-se elevado, estima-se que em 2025 aproximadamente 18% dos homens e 21% das mulheres serão obesos (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016). No Brasil estima-se que aproximadamente 15% da população adulta (30 milhões de pessoas) apresenta obesidade, sendo 12 milhões de homens e 18 milhões de mulheres (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

A obesidade, além de reduzir a qualidade e a expectativa de vida dos indivíduos (WHO, 2012), onera significativamente o orçamento governamental com saúde. Estima-se que obesos geram 30% mais gastos com assistência médica, em comparação aos indivíduos eutróficos (WITHROW & ALTER, 2011).

O significativo crescimento da obesidade no mundo associa-se ao aumento do sedentarismo e do consumo de alimentos com alta densidade energética, ricos principalmente em carboidratos refinados (WHO, 2015). A combinação dessas condições, somadas ou não a uma predisposição genética e a fatores hormonais, é determinante no desencadeamento da obesidade, assim como suas comorbidades associadas (MCARDLE et al., 2013).

3.1.1 Obesidade e comorbidades associadas

A associação da obesidade com diversas comorbidades é em parte determinada pela inflamação crônica de baixo grau e pelo significativo estresse oxidativo associados a essa condição (Figura 1). A expansão do tecido adiposo resulta em adipócitos hipertrofiados e conseqüentemente, em hipóxia dessas

células, devido a insuficiente vascularização desse tecido (MCARDLE et al., 2013). A hipóxia de adipócitos gera importante ativação do sistema imunológico associado a aumento de quimiocinas (MIF - fator inibitório da migração de macrófagos e MCP-1 - proteína quimiotática para monócitos), efeito responsável pelo aumento no recrutamento e infiltração de células imunológicas (linfócitos T, macrófagos, neutrófilos). Além disso, indivíduos obesos demonstram alteração na homeostase celular do tecido adiposo, uma vez que se observa aumento importante e predominância da presença de macrófagos com fenótipo M1 (característica inflamatória), em detrimento de macrófagos com fenótipo M2 (característica anti-inflamatória e predominante como população celular residente no tecido adiposo de indivíduos magros) (OSBORN & OLEFSKY, 2012). O aumento de células inflamatórias no tecido adiposo expandido gera maior produção local de moléculas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas 6 (IL-6) e 1 β (IL1 β), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as adipocinas: quemerina, leptina e resistina (OSBORN & OLEFSKY, 2012; MCARDLE et al., 2013; HILL et al., 2014), assim como, redução de adiponectina, uma adipocina com perfil anti-inflamatório. A obesidade está associada ainda à maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ocasionam em estresse oxidativo, dano celular e exacerbação da inflamação (FURUKAWA et al., 2004; HOPPS et al., 2010).

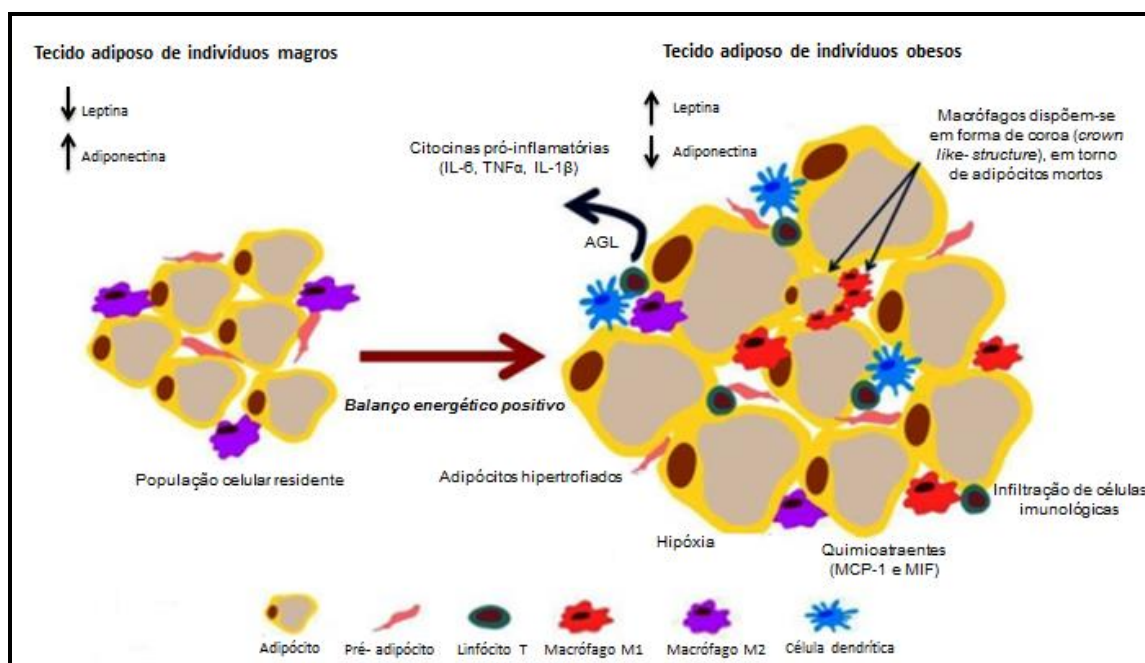


Figura 1 – Expansão do tecido adiposo é associada à inflamação e desregulação metabólica (adaptado de MCARDLE et al., 2013).

A resposta inflamatória gerada nos adipócitos hipertrofiados resulta em menor sensibilidade à insulina, por indução de fosforilação em serina do receptor de insulina, o que pode reduzir a sua funcionalidade (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005). A redução da sensibilidade à insulina, e, portanto, da ação anti-lipolítica desse hormônio, em adipócitos hipertrofiados, torna essas células mais susceptíveis à lipólise induzida por catecolaminas. Desta forma, gera-se maior concentração de ácidos graxos livres (AGL) na circulação, situação essa que eleva o grau de inflamação e de estresse oxidativo (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; ERION & SHULMAN, 2010).

O estresse oxidativo e o aumento da resposta inflamatória local (no tecido adiposo) e sistêmica contribuem para a maior predisposição ao desenvolvimento de comorbidades, tais como diabetes melito tipo II, dislipidemias, doença hepática gordurosa não alcoólica, doenças cardiovasculares (BOZAOGLU et al., 2007; WANDERLEY & FERREIRA, 2010; OSBORN & OLEFSKY, 2012; MCARDLE et al., 2013; HILL et al., 2014) e danos no tecido ósseo (ZHAO et al., 2008; HALADE et al., 2011).

Para compreensão dos efeitos do excesso de adiposidade na integridade óssea faz-se necessário realizar uma elucidação do funcionamento do tecido ósseo. O osso é um tecido metabolicamente ativo, o qual sofre contínuo remodelamento, isto é, reabsorção e deposição mineral. As principais células envolvidas nesse processo são os osteoblastos e os osteoclastos, responsáveis pela formação e reabsorção ósseas, respectivamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; ROBBINS et al., 2013).

Os osteoblastos produzem os componentes da matriz orgânica do osso e participam da mineralização desta, executando, portanto, ações essenciais a formação óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; GARTNER & HIATT, 2010). Entretanto, os osteoblastos também possuem papel importante na osteoclastogênese e na reabsorção óssea. Essas células expressam a molécula ligante do receptor de ativação nuclear *kappa* B (RANKL), a qual se liga ao receptor de ativação nuclear *kappa* (RANK), presente em precursores de osteoclastos, sendo que tal ligação desencadeia a maturação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros (GARTNER & HIATT, 2010; ROBBINS et al., 2013). Por outro lado, os osteoblastos produzem a osteoprotegerina (OPG), ligante com forte afinidade pelo

RANKL, e ao se ligar a essa molécula, impede a osteoclastogênese (GARTNER & HIATT, 2010; ROBBINS et al., 2013) (Figura 2). O sistema RANKL/RANK/OPG atua, portanto, na manutenção da homeostase óssea e desequilíbrios nessa via, podem acarretar em prejuízo da integridade do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; GARTNER & HIATT, 2010; ROBBINS et al., 2013).

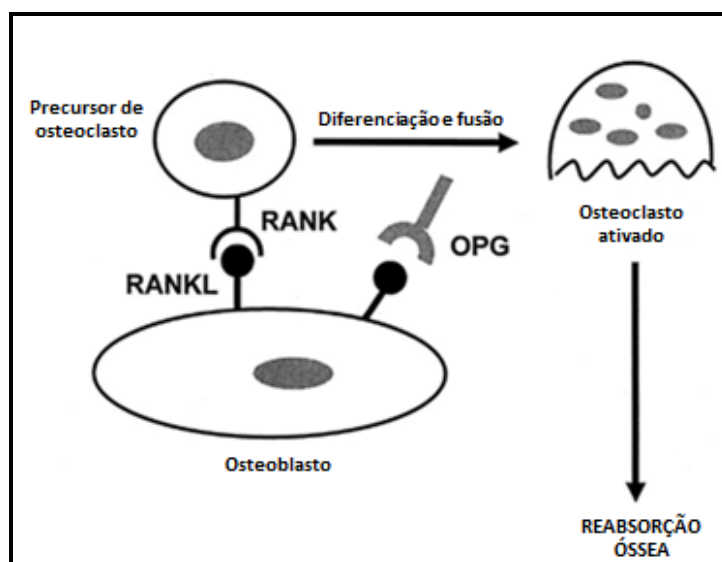


Figura 2 – Visão esquemática do sistema RANKL/RANK/OPG (adaptado de COETZEE & KRUGER, 2004).

Em estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos, o excesso de adiposidade é positivamente correlacionado com menor massa óssea (WEILER et al., 2000; POLLOCK et al., 2007; ZHAO et al., 2008; CAO, 20011; HALADE et al., 2011) e maior número de fraturas ósseas (GOUDING et al., 2001; HSU et al., 2006). Sabe-se que a origem da correlação entre obesidade e prejuízo da saúde óssea reside, em grande parte, no aumento da inflamação, do estresse oxidativo e da lipotoxicidade associadas à expansão do tecido adiposo. Tais condições podem intensificar a reabsorção óssea e, portanto, ocasionar em diminuição da densidade mineral óssea, devido a um estímulo na produção da citocina RANKL e diminuição de seu receptor *decoy* OPG (Figura 3) (ZHAO et al., 2008; HALADE et al., 2011).

Os adipócitos e os osteoblastos possuem a célula tronco mesenquimal (MSC) da medula óssea, como um precursor comum, sendo que diferentes estímulos (citocinas, fatores de transcrição, etc), determinam a diferenciação da MSC, em um tipo celular específico (HALADE et al., 2011). A obesidade é associada a aumento na expressão de um fator de transcrição que estimula a adipogênese, o receptor

ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ), em detrimento do estímulo da expressão do fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX2), molécula essencial para a osteoblastogênese. Sendo assim, na condição de acúmulo de adiposidade corporal ocorre prejuízo no processo de remodelamento ósseo, devido ao estímulo aumentado para adipogênese, em detrimento da osteoblastogênese (HALADE et al., 2011) (Figura 3).

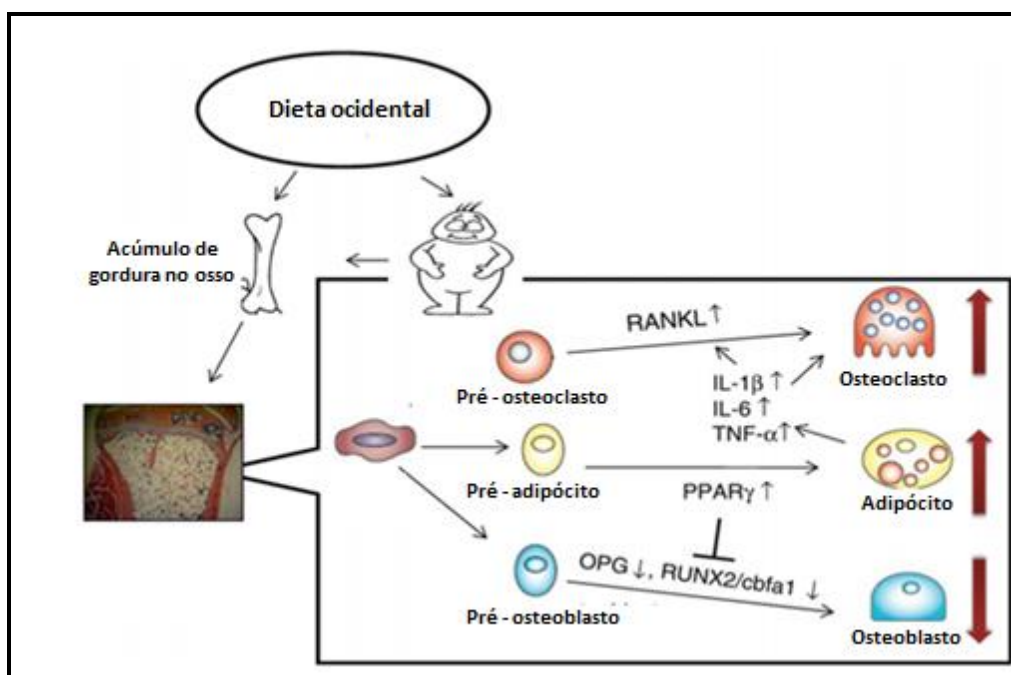


Figura 3 – Mecanismos envolvidos no aumento da reabsorção óssea e redução da osteoblastogênese na obesidade (adaptado de HALADE et al., 2011).

A hiperglicemia associada à resistência à insulina, que pode estar presente na obesidade, resulta em distúrbios ósseos, tais como: redução da mineralização e aumento da fragilidade do tecido ósseo (HAMILTON et al., 2009; LUMACHI et al., 2009; WONGDEE & CHAROENPHANDHU, 2011). A redução na concentração sérica de adiponectina, evento comum na obesidade, também pode estar relacionada à menor integridade óssea, uma vez que essa adipocina parece atuar na inibição da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (OSHIMA et al., 2005).

Assim como os ossos longos são afetados negativamente pela obesidade e suas respectivas alterações metabólicas e inflamatórias, sabe-se que ossos faciais como a maxila e a mandíbula também podem ser prejudicados (BENSLE et al., 2011). Estudos mostram que a incidência e a gravidade da doença periodontal, por exemplo, uma doença inflamatória de etiologia infecciosa que atinge as estruturas de suporte dos dentes, podendo estar associada à perda óssea do osso alveolar, é

diretamente proporcional ao acúmulo de gordura corporal e à intensidade das alterações metabólicas associadas (TOMOFUJI et al., 2009; SAITO & SHIMAZAKI, 2010).

A obesidade induz aumento do recrutamento de neutrófilos, do estresse oxidativo e ocasiona redução da atividade de enzimas antioxidantes no tecido gengival (TOMOFUJI et al., 2009), fatores que podem desencadear ou piorar o quadro inflamatório periodontal, contribuindo para aumento na reabsorção óssea nesse local. Além disso, alterações metabólicas, tais como hiperglicemia e dislipidemias e o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias circulantes, TNF- α e IL-6, decorrentes do excesso de adiposidade, correlacionam-se positivamente com o aumento da incidência e da gravidade da perda óssea alveolar (MARCHETTI et al., 2012; JANKET et al., 2015).

3.1.2 Estratégias para o tratamento da obesidade

Considerando a elevada incidência da obesidade e a significativa gravidade das comorbidades associadas a essa condição, muitas estratégias têm sido empregadas para tratar e reduzir a gravidade dessa doença. As estratégias terapêuticas tradicionais são a recomendação de dietas hipocalóricas altamente restritivas e o uso de fármacos que induzem o maior gasto energético e redução do apetite. Entretanto, tais estratégias mostram-se ineficazes em longo prazo, pois a redução do consumo calórico é de difícil adesão permanente (KOEHNLEIN et al. 2008) e o uso de fármacos acarreta em elevado número de efeitos colaterais indesejáveis (KANG & PARK, 2012; MCARDLE et al., 2013).

Dessa forma, torna-se necessária a busca por soluções alternativas às referidas estratégias tradicionais para o tratamento da obesidade. Nesse contexto, portanto, surge o interesse pelo estudo de fatores dietéticos como coadjuvantes no tratamento e prevenção da obesidade e comorbidades associadas (SIRIWARDHANA et al., 2013).

Estudos atribuem ações positivas na prevenção e tratamento da obesidade a uma série de alimentos, devido à presença de fatores dietéticos benéficos, tais como: compostos fenólicos, carotenoides, ácidos graxos de cadeia média, gordura mono e poli-insaturada e vitaminas, tais como A, C, D e E (MARTEN et al., 2006; BASTOS et al., 2009; BAKKER et al., 2010; SIRIWARDHANA et al., 2013).

Componentes dietéticos podem atuar de forma benéfica na obesidade e suas comorbidades, por diversos mecanismos, tais como: redução da lipogênese, da inflamação e do estresse oxidativo e promoção do estímulo da lipólise e da beta oxidação (Figura 4) (SIRIWARDHANA et al., 2013).

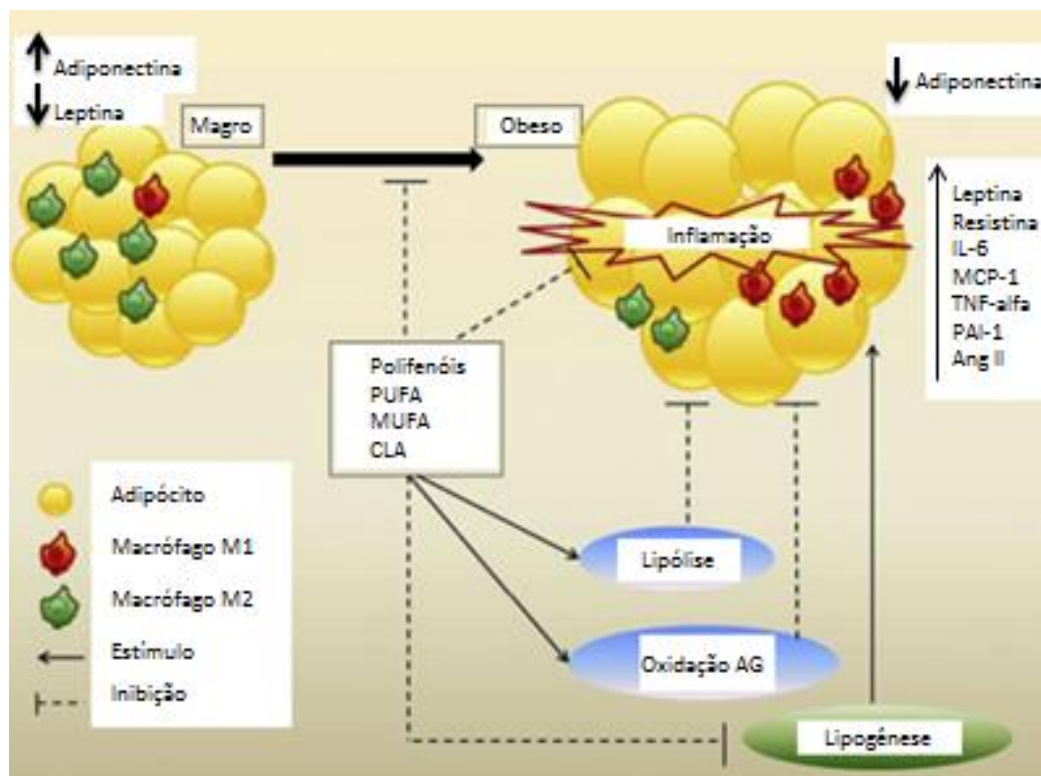


Figura 4 – Modulação do ganho de adiposidade e da inflamação por compostos alimentares bioativos (adaptado de SIRIWARDHANA et al., 2013)

Os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) (aqueles que apresentam entre 6 a 12 carbonos na cadeia) são lipídios associados a ações benéficas na obesidade e comorbidades, uma vez que potencialmente atuam no aumento da termogênese, do gasto energético e da saciedade e reduzem a ativação de vias lipogênicas, apresentando, portanto, papel como adjuvantes na perda de peso (BABA et al., 1982; DOUGLAS et al., 1990; GUO et al., 2000; KROTKIEWSKI, 2001; HAN et al., 2003; ST-ONGE et al., 2003; HAN et al., 2007; TURNER et al., 2009; BOSH et al., 2011; DULLOO, 2012; SUN et al, 2013; ZHANG et al., 2015;). Os AGCM podem atuar, ainda, no estabelecimento de homeostase metabólica (BATH et al., 1996; FELTRIN et al., 2004; NAKAMURA et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2006; TERADA et al., 2012; SUN et al., 2013), ao contribuírem para prevenir e/ou amenizar os quadros de resistência à insulina/hiperglicemia, que são altamente prevalentes na obesidade (OSBORN & OLEFSKY, 2012).

Considerando que existem poucos alimentos na dieta ocidental que apresentam conteúdo significativo de AGCM, uma das estratégias para viabilizar o consumo dessa gordura, a fim de obter seus respectivos efeitos benéficos à saúde, é a introdução de óleo de coco extravirgem (OCEV) na dieta, uma vez que esse é composto majoritariamente por AGCM (MARINA et al., 2009a). O OCEV apresenta ainda, em sua composição, substâncias com ações antioxidante e anti-inflamatória comprovadas, tais como compostos fenólicos, pré vitamina A e vitamina E (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008; SENEVIRATNE et al., 2009; MARINA et al., 2009b; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Dessa forma, o OCEV tem sido apontado como um provável alimento com alegação de funcionalidade, podendo atuar de forma benéfica em uma série de comorbidades (MARINA et al., 2009a).

3.2 O Óleo de coco

De acordo com a Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA), o óleo de coco é definido como o óleo obtido do fruto *Cocos nucifera L.* (coco), utilizando-se processos tecnológicos adequados (descorticação, trituração da polpa e prensagem mecânica) (MORETTO & FETT, 1998; BRASIL, 1999).

O óleo de coco é composto majoritariamente por gordura saturada (mais de 90%), sobretudo pelos triglicerídeos de cadeia média (aproximadamente 70%), sendo que o ácido graxo láurico está presente em maior concentração (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos do óleo de coco extravirgem

Ácido Graxo	KUMAR & KRISHNA 2015	GOPALA et al., 2010	EQBAL et al., 2010
Ácido caprílico (8:0)	7,52%	7,00%	6,60%
Ácido cáprico (10:0)	6,38%	5,40%	5,07%
Ácido láurico (12:0)	55,75%	48,90%	46,46%
Ácido mirístico (14:0)	18,74%	20,20%	20,57%
Ácido palmítico (16:0)	7,90%	8,40%	9,16%
Ácido esteárico (18:0)	0,27%	2,50%	2,94%
Ácido oléico (18:1)	3,31%	6,20%	7,21%
Ácido linoléico (18:2)	0,30%	1,40%	1,65%

Os AGCM em comparação com os ácidos graxos saturados de cadeia longa (AGSCL), apresentam ponto de fusão mais baixo (oscilando entre 23 e 26°C), sendo

que são normalmente líquidos à temperatura ambiente e ocasionam em menor concedimento de calorias (8,25Kcal/g, enquanto os AGCL proporcionam 9,2 Kcal/g) (SÁYAGO-AYERDI et al., 2008).

O óleo de coco apresenta-se bastante resistente à rancificação e possui elevado índice de saponificação (de 250 a 260 mg.KOH g⁻¹), sendo que ambas as características relacionam-se ao elevado teor de ácidos graxos saturados de baixo peso molecular que compõe esse produto (CALLADO E PAULA JR., 1999; MARINA et al.,2009b).

Existem dois métodos para extração do óleo de coco: o método úmido e o método seco (THIEME, 1970), sendo esse último o mais comum. No método seco, é utilizada a polpa da fruta seca (desidratada sob radiação solar), ou seja, a copra, que é prensada em equipamento específico e o produto obtido (óleo de coco bruto) apresenta muitos interferentes e elevada acidez (em torno de 5%). Para que esse óleo possa ser utilizado na alimentação, é necessário, portanto, que o mesmo seja submetido ao processo de refino, visando à eliminação de substâncias indesejáveis (ácidos graxos livres, fosfolipídios, corantes e etc). O refinamento é constituído de três etapas: neutralização (para diminuir a acidez do produto), descoloração (para clarear o óleo) e desodorização (para eliminar odores indesejáveis). Tais etapas ocasionam muitas transformações químicas no óleo de coco, levando-o a perder qualidade sensorial, nutricional e parte do teor de compostos fenólicos e de vitaminas, substâncias que promovem benefícios ao organismo, quando ingeridas (CALLADO & PAULA JR, 1999; SENEVIRATNE et al., 2009; ZAKARIA et al, 2010; MANSOR et al., 2012). Outro fator que resulta em redução dessas substâncias benéficas é a exposição prolongada da polpa do coco aos raios ultravioletas, para desidratação (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008). Quando o método seco de extração é utilizado, o óleo de coco é denominado óleo de copra ou óleo de coco refinado (CALLADO & PAULA JR, 1999).

No método úmido, o óleo é resultante da prensagem da polpa fresca do coco, para que seja obtido o produto, conhecido como leite de coco, que é uma emulsão de óleo em água. A partir do leite de coco, após a quebra da emulsão e com a separação das fases (fase aquosa e fase lipídica), é possível realizar a extração do óleo de coco (THIEME, 1970). A separação da emulsão do leite de coco pode ser realizada de diversas maneiras: por fermentação, cocção, centrifugação, congelamento com posterior descongelamento, adição de enzimas e acidificação.

Esses processos podem ser aplicados, isoladamente ou em conjunto (SENEVIRATNE et al., 2009).

O óleo de coco obtido pelo método úmido é claro e tem acidez de 0,1 a 0,5%, precisando apenas de desinfecção para ser consumido, ou seja, as etapas de neutralização, descoloração e desodorização são dispensadas. Por este motivo, esse produto apresentará melhor qualidade nutricional, maior conservação de suas características químicas e sensoriais (sabor e aroma característicos) e do seu potencial benéfico à saúde de seres humanos (CALLADO & PAULA JR, 1999; VERALLO-ROWELL, et al., 2008; SENEVIRATNE et al., 2009; MARINA et al., 2009b; MARINA et al., 2009c).

No método úmido podem ser aplicadas temperaturas baixas (10°C - 40°C) ou altas (100-120°C). Quando é utilizado o método úmido em baixas temperaturas o óleo de coco é denominado óleo de coco extravirgem (OCEV) ou óleo de coco virgem (OCV), que se trata de um produto de melhor qualidade nutricional e sensorial, devido a não utilização de altas temperaturas, que por sua vez podem afetar negativamente a composição do produto (VERALLO-ROWELL, et al., 2008; SENEVIRATNE et al., 2009).

Em estudo realizado por Seneviratne & Dissanayake (2008) o óleo de coco extraído pelo método úmido apresentou teor sete vezes maior de compostos fenólicos em comparação ao óleo de coco extraído pelo método seco (618 ± 46 vs. 91 ± 11 mg/kg, respectivamente). Em estudo executado por Zakaria e colaboradores (2010), foram encontrados teores de compostos fenólicos de 12,8 e 23,5 mg GAE/100 g para o óleo extraído pelo método seco e o óleo extraído pelo método úmido-fermentativo, respectivamente. A atividade antioxidante dos óleos variou de acordo com o teor de fenólicos, sendo de 82,4% e de 75,2% para o óleo obtido pelo método úmido-fermentativo e para o óleo obtido pelo método seco, respectivamente.

Sendo assim, constata-se que o método úmido, proporciona a obtenção de um óleo com características nutricionais desejáveis e com um maior potencial de efeitos benéficos à saúde, em comparação com o óleo obtido pelo método seco.

A composição físico-química, o perfil de ácidos graxos e a presença de compostos benéficos no óleo de coco relacionam-se diretamente com o potencial desse produto em promover efeitos benéficos à saúde quando ingerido (MARINA et al., 2009c). Estudos mostram que a composição do óleo de coco difere significativamente de acordo com o tipo de processo de obtenção (SENEVIRATNE

et al., 2009; ZAKARIA et al., 2010; MANSOR et al., 2012), a aplicação de refinamento (GORDON & RAHMAN, 1991; DAYRIT et al., 2011), o uso de calor no processamento (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008; SENEVIRATNE & DISSANAYAKE, 2008; NEVIN & RAJAMOHAN, 2009), o local e as condições de cultivo do coco (PORTILLO et al., 1998; KHAN et al., 2008; MARINA et al., 2009a; GOPALA et al., 2010; KUMAR & KRISHNA, 2015).

O Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ), de um produto alimentício, estabelece a identidade por meio de um conjunto de requisitos e determina os aspectos mínimos de qualidade. Os PIQs correspondem aos documentos que estabelecem as características inerentes aos produtos, como seus aspectos sensoriais e os parâmetros físico-químicos (SANDI, 2010).

A Ásia e a Oceania concentram países com o maior consumo mundial de óleo de coco (DAYRIT, 2011). Sendo assim, dezesseis países desses continentes (Estados Federados da Micronésia, Fiji, Índia, Indonésia, República do Kiribati, Malásia, Ilhas Marshall, Papua Nova Guiné, Filipinas, Samoa, Ilhas Salomão, Sri Lanka, Tailândia, Tonga, Vanuatu e Vietnã) se reuniram para criação do órgão APCC (*Asian and Pacific Coconut Community*) que possui como objetivos promover, coordenar e harmonizar todas as atividades da indústria do coco (APCC, 2016). O APCC desenvolveu, em 2006, o primeiro PIQ para o OCEV. Em 2007, um segundo PIQ para o produto foi criado nas Filipinas, pelo PNS (*Philippine National Standard*). O Brasil não possui, em sua legislação, um PIQ para o OCEV, apenas para o óleo de coco refinado (BRASIL, 1999).

Dessa forma, considerando que as propriedades físico-químicas e a composição do OCEV produzido no Brasil são ainda pouco conhecidas é essencial que o estudo do efeito terapêutico da suplementação desse produto em modelo experimental de indução da obesidade, esteja associado à caracterização e controle de qualidade criteriosos do OCEV.

3.2.1 Propriedades benéficas do óleo de coco extravirgem na saúde

Os AGCM, presentes de forma majoritária no OCEV, apresentam digestão, absorção e metabolização muito diferenciadas dos AGCL (Figura 5). Os AGCM são digeridos somente pela lipase gástrica, no estômago, sendo que a atuação da lipase pancreática é normalmente, dispensada. Os AGCM por possuírem cadeia

carbonada menor que os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), apresentam menor hidrofobicidade, dispensando, portanto, a emulsificação por sais biliares para serem absorvidos. Os AGCM após serem absorvidos, se ligam à albumina e são rapidamente levados ao fígado, onde são transportados para dentro das células. Para serem oxidados são transportados através das membranas mitocondriais de forma independente da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1) e metabolizados por beta-oxidação (MARTEN et al., 2006; SILVA et al., 2011). Diferentemente dos AGCL, os AGCM parecem ter menor capacidade de elevar lipídios e lipoproteínas plasmáticas, pois são eficientemente oxidados nos hepatócitos e são, portanto, em pequena escala incorporados em lipoproteínas (quilomícrons e VLDL). Os AGCM por serem mais susceptíveis à oxidação, mesmo em condições de repouso, não são facilmente incorporados ao tecido adiposo (FERREIRA et al., 2003; ST-ONGE et al., 2003; AOYAMA et al., 2007; KRAUSE et al., 2013; SUN et al., 2013).

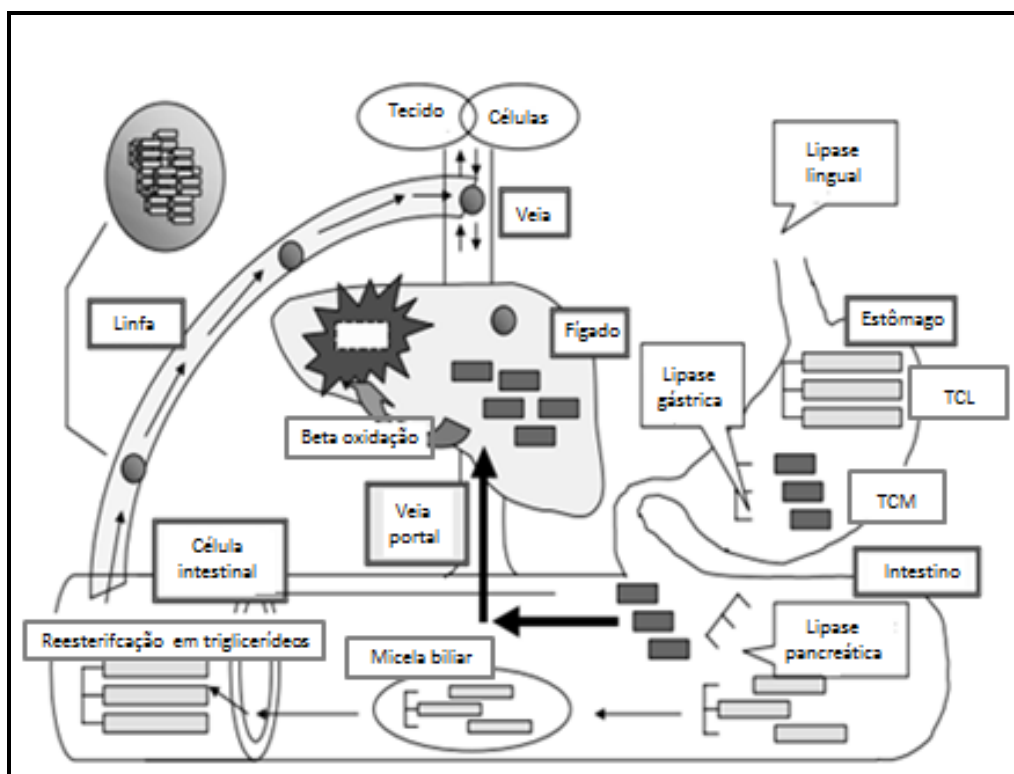


Figura 5 – Digestão e absorção de triglicerídeos de cadeia longa e média (adaptado de AOYAMA et al., 2007).

Estudos experimentais e clínicos mostram que o consumo de AGCM, associa-se à perda de peso e à redução da adiposidade (BABA et al., 1982; MATSUO & TAKEUSHI, 2004; BOSH et al., 2011; SILVA et al., 2011). Os AGCM apresentam

caráter cetogênico, uma vez que parte significativa do acetil-CoA, produzido abundantemente durante a oxidação dessa gordura, é direcionada para a produção de corpos cetônicos (NAKAMURA et al., 1994; KROTKIEWSKI, 2001; FERREIRA et al., 2003; SÁYAGO-AYERDI et al., 2008). Reconhece-se que o acúmulo de corpos cetônicos na corrente sanguínea associa-se ao aumento da saciedade, sendo esse um possível mecanismo auxiliar do emagrecimento relacionado ao consumo de AGCM (DOUGLAS et al., 1990; KROTKIEWSKI, 2001; HAN et al., 2007; BOSH et al., 2011). Outros mecanismos associados aos efeitos dos AGCM na redução de massa corporal e adiposidade são: maior gasto energético (BABA et al., 1982; DULLOO, 2012; ST-ONGE et al., 2003; TURNER et al., 2009; ZHANG et al., 2015), redução da lipogênese (GUO et al., 2000; HAN et al., 2003; SUN et al., 2013) e aumento na taxa de beta-oxidação (CLEGG, 2010).

Em estudo conduzido por Matsuo & Takeushi (2004) foi observado, em ratos alimentados com dieta composta por 200 g/kg de AGCM, menor ganho de peso e de deposição da gordura no abdômen. Uma dieta para ratos, composta de AGCM como fonte majoritária de lipídio, acarretou em maior oxidação lipídica, menor deposição de gordura no músculo esquelético e no fígado e menor ganho de peso dos animais, em comparação a uma dieta composta basicamente por AGCL como fonte de gordura (BOSH et al., 2011).

Em relação ao uso na dieta de AGCM, estudos realizados com humanos corroboram com os achados de trabalhos experimentais. Em estudo conduzido por Wymelbeke e colaboradores (2001), constatou-se menor ingestão de energia por indivíduos que haviam ingerido previamente uma refeição rica em AGCM. Estudo realizado por Han e colaboradores (2007) mostrou que a ingestão energética diminuiu significativamente no grupo de voluntários que consumiu 18 g por dia de AGCM, em relação à ingestão no dia zero do experimento e em comparação ao grupo de indivíduos que consumiu a mesma quantidade de AGCL. Mulheres obesas em dieta com muito baixo teor de calorias (cerca de 580 Kcal/dia), quando alimentadas com AGCM, apresentaram maior perda de peso e massa adiposa, além de maior sensação de saciedade, em comparação às voluntárias que se alimentaram de AGCL (KROTKIEWSKI, 2001). Resultados similares foram encontrados no estudo de Tsuji e colaboradores (2001), no qual indivíduos com índice de massa corporal acima de 23 Kg/m², que possuíam a dieta composta majoritariamente por AGCM como fonte lipídica, apresentaram maior perda de peso,

sobretudo de gordura corporal, em comparação aos voluntários que ingeriram principalmente AGCL como fonte de lipídios.

Diante da abundância de AGCM no OCEV tem-se sugerido que esse óleo possa acarretar em redução de peso corporal e de adiposidade. Em estudo clínico não controlado com 32 voluntários, a suplementação de OCEV (30 mL/dia) por três meses resultou em significativa perda de peso, redução do índice de massa corporal, da relação abdômen-quadril e do perímetro abdominal (SILVA et al., 2011). Outro estudo clínico não randomizado, não controlado e *open-label*, conduzido por de Liao e colaboradores (2011) mostrou que o OCEV induziu a redução do perímetro abdominal em voluntários que consumiram esse produto durante 4 semanas. Em estudo clínico controlado, duplo-cego e randomizado realizado com 40 voluntários, durante 12 semanas, observou-se que o consumo diário de 30 mL de OCEV promoveu perda de peso e da circunferência da cintura (ASSUNÇÃO et al., 2009). Em contrapartida, o estudo clínico conduzido por Cox e colaboradores (1995) mostrou que o consumo de óleo de coco não foi capaz de promover perda de peso e nem de adiposidade.

Além de potencialmente atuar como adjuvante no emagrecimento, estudos mostram que o consumo de OCEV pode promover ainda, benefícios na concentração de lipídios séricos e lipoproteínas, acarretando em redução de colesterol total, LDL e triglicérides (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008; ZAKARIA et al., 2010), assim como aumento de HDL (NEVIN & RAJAMOHAN, 2004; NORTON et al., 2004; CARDOSO et al., 2015). Esses efeitos podem ser justificados pelas características particulares de metabolização dos AGCM, e à presença, neste produto, de fitoesteróis (KUMAR & KRISHNA, 2015) (que aumentam a excreção de colesterol dietético) (BRUFAU et al., 2008). Entretanto, o estudo clínico *open label* realizado com 70 indivíduos conduzido por Sabitha e colaboradores (2009), mostrou que não houve diferença no perfil lipídico entre indivíduos que consumiram óleo de coco, em relação a aqueles que ingeriram óleo de girassol. Além disso, o estudo *cross-over* e randomizado conduzido por Voon e colaboradores (2011), com 45 voluntários mostrou que o consumo de óleo de coco promoveu aumento de lípidos séricos (triglicérides, colesterol total e LDL), em relação ao consumo de azeite de oliva. Em conjunto esses estudos mostram que permanece controversa a ação do óleo de coco sob os parâmetros lipídicos.

O consumo de AGCM pode também estar relacionado ao aumento na produção de insulina devido ao maior estímulo das ilhotas de Langerhans. Esse efeito pode ser atribuído aos próprios AGCM ou pelos corpos cetônicos provenientes da metabolização dessa gordura (NAKAMURA et al., 2004; VEECH et al., 2013). O efeito positivo dos AGCM na homeostase glicêmica, também pode estar relacionado ao aumento na secreção de adiponectina (TAKEUCHI et al., 2006; TERADA et al., 2012); à elevação na fosforilação da AKT (Proteína quinase B, molécula essencial na sinalização da insulina) (SUN et al., 2013) e ao aumento de secreção de GLP-1 (Peptídeo semelhante a glucagon 1) (FELTRIN et al., 2004). Indivíduos diabéticos que consumiram 18 g por dia de AGCM apresentaram menor resistência à insulina no 90º dia de experimento, em comparação aos voluntários que receberam AGCL. Além disso, ao fim do experimento, apresentaram concentração significativamente maior do peptídeo C (indicador da produção de insulina), o que demonstra que a administração de AGCM, além de diminuir a resistência à insulina, também promove incremento na produção desse hormônio (HAN et al., 2007).

Dessa forma, sugere-se que o consumo de OCEV também poderia ocasionar melhora da homeostase glicêmica, devido ao seu elevado conteúdo de AGCM. Em estudo clínico não controlado, a suplementação de 30 mL/dia de óleo de coco em pacientes intolerantes à glicose (glicemia de jejum superior a 100 mg/dL), resultou na redução da glicemia para concentrações de normalidade (SILVA et al., 2011). A administração de OCEV para ratos com resistência a insulina ocasionou melhora da homeostase glicêmica, efeito atribuído ao aumento da defesa antioxidante (NARAYANANKUTTY et al., 2016). Estudo conduzido por Piot e colaboradores (1999) mostrou que ratos alimentados com óleo de coco apresentaram menor glicemia e insulinemia, em comparação aos ratos alimentados com gordura animal (PIOT et al., 1999). Entretanto, no estudo de Poppitt e colaboradores (2010) foi demonstrado que a ingestão de óleo de coco não promoveu alteração na liberação de insulina e nem mesmo na concentração de glicose sérica, em comparação ao consumo de gordura de porco e gordura láctea. Em outro estudo, conduzido por Assunção e colaboradores (2009), o grupo de indivíduos (n=20) que recebeu OCEV apresentou um aumento na liberação de insulina em relação ao grupo alimentado com óleo de soja (n=20). Tal aumento, embora não estatisticamente significativo (P= 0,09), foi suficiente para aumentar significativamente o valor de HOMA-s (P= 0,03), um índice de resistência à insulina.

Estudos prévios que avaliaram o efeito do OCEV *in vitro* demonstraram que esse óleo aumenta a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase e peroxidase) (NEVIN & RAJAMOHAN, 2006; NEVIN & RAJAMOHAN, 2009) e previne a oxidação de LDL (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008). Além disso, as concentrações de produtos de lipoperoxidação lipídica (4-hidroxinonenal e 8-oxi-desoxiguanosina) no fígado de animais que consumiram óleo de coco apresentaram-se reduzidas em comparação aos que consumiram os óleos de oliva, girassol e colza (EDER et al., 2006). Em outro estudo foi demonstrado que animais alimentados com OCEV apresentaram maior proteção contra a peroxidação lipídica em microssomos do fígado (partículas sub-celulares derivadas do retículo endoplasmático das células hepáticas) (NARDINI et al., 1993). O estudo conduzido por Dosumu e colaboradores (2010) mostrou que animais alimentados com OCEV e submetidos ao estresse oxidativo induzido por ingestão de etanol, apresentaram menor concentração de malonaldeído (produto da peroxidação lipídica) e maior atividade de glutatona redutase e catalase no tecido testicular. Em conjunto esses estudos sugerem que o OCEV apresenta significativo efeito benéfico na defesa antioxidante do organismo, o que confere proteção contra uma série de comorbidades.

Poucos trabalhos avaliaram o efeito do óleo de coco no metabolismo ósseo. Hayatullina e colaboradores (2012) demonstraram que o consumo de OCEV por animais com osteoporose induzida por ovariectomia, resultou em melhora da integridade óssea do fêmur, evidenciada por maior volume ósseo, maior número de trabéculas e menor separação entre essas e redução da reabsorção óssea. Abujazia e colaboradores (2012) ao avaliarem o status oxidativo do osso (tíbia) de animais ovariectomizados suplementados com OCEV, observaram menor concentração de malonaldeído e maior atividade de glutatona peroxidase e superóxido dismutase. Em conjunto, esses estudos demonstram que o OCEV parece induzir melhora da integridade dos ossos longos, por proporcionar aumento da defesa antioxidante. Ressalta-se, entretanto, que os efeitos da suplementação desse produto em outros sítios ósseos, tais como ossos faciais, ainda não foram avaliados.

A ação antioxidante do OCEV pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos em sua composição, que por sua vez também parecem contribuir para uma ação anti-inflamatória (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Em um modelo animal de indução de artrite, animais alimentados com a fração isolada de compostos fenólicos

provenientes do OCEV apresentaram, em comparação com o grupo controle, menor concentração de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no soro e na pata, redução de proteína C reativa (PCR) e na contagem total de leucócitos no soro, maior inibição na formação de edemas e menor expressão de COX-2 (ciclo-oxigenase-2, enzima envolvida em processos inflamatórios), TNF- α e IL-6 na pata. Nesse trabalho os desfechos relacionados ao consumo de OCEV (menor estresse oxidativo e inflamação), foram similares aos obtidos pelo uso da indometacina, um potente anti-inflamatório não esteroide (VYSAKH et al, 2014).

Apesar de estudos mostrarem efeitos benéficos do consumo de OCEV, em uma série de comorbidades, esses são, ainda, escassos e em conjunto, fornecem baixo grau de evidência científica, uma vez que muitos desses trabalhos apresentam resultados consideravelmente controversos e/ou uma série de vieses que prejudicam a credibilidade dos desfechos obtidos. Além disso, especificamente na obesidade e suas respectivas alterações metabólicas, inflamatórias e ósseas, ainda são pouco conhecidos os efeitos e mecanismos de ação relacionados, ao consumo de OCEV. Sendo assim, o presente estudo pretende esclarecer os efeitos e respectivos mecanismos biológicos, do OCEV na obesidade e nas referidas comorbidades associadas.

A tese de doutorado será apresentada em quatro capítulos, redigidos na forma de artigo científico, sendo que cada capítulo abordará, respectivamente, o conteúdo referente a cada um dos objetivos específicos referidos anteriormente. O capítulo 1 engloba a caracterização físico-química, a análise da composição de ácidos graxos e a determinação da estabilidade oxidativa de três marcas de óleo de coco extravirgem comercializadas no Brasil. No capítulo 2 é apresentado o modelo desenvolvido de análise da acidez do OCEV por meio da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria. A influência do OCEV no tratamento da adiposidade e alterações metabólicas e inflamatórias induzidas por dieta rica em carboidratos refinados em camundongos é apresentada no capítulo 3. Finalmente, o capítulo 4 aborda a influência do óleo de coco extravirgem nas alterações ósseas induzidas por dieta rica em carboidratos refinados em camundongos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJAZIA, M.A; MUHAMMAD, N; SHUID, A.N; SOELAIMAN, I.N. The effects of virgin coconut oil on bone oxidative status in ovariectomised rat. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n.3, p. 1-6, 2012.

ACOSTA-ESTRADA, B. A; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

AOYAMA, T.; NOSAKA, N.; KASAI, M. Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids. **The journal of medical investigation : JMI**, v. 54, n. 3-4, p. 385–388, 2007.

ASIAN AND PACIFIC COCONUT COMMUNITY (APCC), 2006. Disponível em: <http://www.apccsec.org/standards.htm>. Acesso em: 21/04/2016.

ASSUNÇÃO, M.L; FERREIRA, H.S; DOS SANTOS, A.F; CABRAL, C.R; FLORÊNCIO, T.M.M.T. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. **Lipids**, v. 44, n. 7, p. 593–601, 2009.

BABA, N; BRACCO, E.F; HASHIM, S.A. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 678–682, 1982.

BAKKER, G.C; VAN ERK, M.J; PELLIS, L; WOPERIS, S; RUBINGH, C.M; CNUBBEN, N.H.P; KOOISTRA, T; VAN OMEN, B; HENDRIKS, H.F.J. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, p.1044–1059, 2010.

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, 2009.

BATH, A.C; INGENBLEEK, Y; ANNY, F. The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? **Journal of Lipid Research**, v.37, p. 708-726, 1996.

BENSLEY, L.; VANEENWYK, J.; OSSIANDER, E. M. Associations of self-reported periodontal disease with metabolic syndrome and number of self-reported chronic conditions. **Preventing Chronic Disease**, v. 8, n. 3, p. A50, 2011.

BOSH, J.D.V-V.D; BERG, V-D.S.A; BIJLAN, S; VOSHOL, P.J; HAVEKES, L.M; ROMIJN, H.A. High-fat diets rich in medium- versus long-chain fatty acids induce distinct patterns of tissue specific insulin resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 366–371, 2011.

BOZAOGLU, K; BOLTON, K; MCMILLAN, J; ZIMMET, P; JOWETT, J; COLLIER, G; WALDEN, K; SEGAL, D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4687–4694, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº278, 2005. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Anexo II. Atualizado em agosto/2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 24/04/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. **Aprova o regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acesso em: 23/04/2016.

BRUFAU, G; CANELA, A.M; RAFECAS, M. Phytosterols physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v.28, n.4, p.217-225, 2008.

CALLADO, N. H; PAULA JR. Gerenciamento de resíduos de uma indústria de processamento de coco - estudo de caso. In: ANAIS DO 19º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Rio de Janeiro. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999.

CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 6, n. 1, p. 30, 2011.

CARDOSO, D.A; MOREIRA, A.S.B; OLIVEIRA, G.M M; RAGGIO R. L.; ROSA, G. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 5, p. 2144–2152, 2015.

CAVAGNI, J; MACEDO, I.C, et al. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. **Journal of periodontology**, v. 87, n. 2, p.1–15, 2015.

CLEGG, M. E. Medium-chain triglycerides are advantageous in promoting weight loss although not beneficial to exercise performance. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 7, p. 653–679, 2010.

COETZEE M; KRUGER MC. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? **The Southern Medical Journal**, v. 97,n. 5, p. 506-11, 2004.

COSTA, N.M.B; ROSA, C.O.B. **Alimentos Funcionais**. Viçosa: UFV, Ed. Newton Paiva, 2006. 202 p.

COX, C; MANN, J; SUTHERLAND, W; CHISHOLM, A; SKEAFF, M. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with

moderately elevated cholesterol levels. **Journal of lipid research**, v. 36, n. 8, p. 1787–1795, 1995.

CUPPARI, L; SCHOR, N. **Guia de nutrição: nutrição clínica do adulto**. 2.ed. Barueri: Manole, 2005. 569 p.

DAYRIT, C. S. COCONUT OIL: Atherogenic or Not? (What therefore causes Atherosclerosis?). **Philippine Journal of Cardiology**, v. 31, n. 3, p. 97–104, 2003.

DAYRIT, F. M. et al. Quality characteristics of virgin coconut oil: Comparisons with refined coconut oil. **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 9, p. 1789–1799, 2011.

DOSUMU, O; DURU, F.I.O; OSINUBI, A.A; OREMOSU, A, A; NORONHA, C.C. Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion. **Agriculture and biology Journal of North America**, v. 1, n. 6, p. 1126–1132, 2010.

DOUGLAS, B; JANSEN, J. B; DE JONG, A,J; LAMERS, C.B. Effect of various triglycerides on plasma cholecystokinin levels in rats. **Journal of Nutrition**, v.120, n. 7, p. 686–690, 1990.

DULLOO, A. G. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: From pharmaceuticals to functional food ingredients. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 10, p. 866–883, 2011.

EDER, E; WACKER, M; LUTZ, U; NAIR, J; FANG, X; BARTSCH, H; BELAND, F. A; SCHLATTER, J.; LUTZ, W. K. Oxidative stress related DNA adducts in the liver of female rats fed with sunflower-, rapeseed-, olive- or coconut oil supplemented diets. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 2, p. 81–89, 2006.

EQBAL M. A; DAUQAN, E.M.A; SANI, H.A; ABDULLAH, A; KASIN, Z.M. **Fatty Acids Composition of Four Different Vegetable Oils (Red Palm, Olein, Palm Olein, Corn Oil and Coconut Oil) by Gas Chromatography**. In: 2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, v.14, 2011.

EYRES, L. Eyres, M.F; Chisholm, A; Brown, R.C. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. **Nutrition Reviews**, v. 74, n. 4, p. 267–280, 2016.

FELTRIN, K..L; LITTLE, T. J; MEYER, J.H; HOROWITZ, M; SMOUT, A. J.P.M; WISHART, J; PILICHIEWICZ, A. N; RADES, T; CHAPMAN, I.M; FEINLE-BISSET, C. Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 287, n. 2004, p. 524–533, 2004.

FERREIRA, A. M. D.; BARBOSA, P. E. B.; CEDDIA, R. B. A influência da suplementação de triglicerídeos de cadeia média no desempenho em exercícios de ultra-resistência. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.9, n. 6, p. 413–425, 2003.

FURUKAWA, S; TAKUYA, F; SHIMABUKURO,M; IWAKI, M; YAMADA, Y; NAKAJIMA, Y; NAKAYAMA, O; MAKISHIMA, M; MATSUDA, M; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.

GARTNER, L.P; HIATT, J. **Atlas colorido de histologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 435 p.

GOPALA, K. A.G. ; RAJ, G; BHATNAGAR, A.S; KUMAR P. P.K; CHANDRASHEKAR, P. Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review. **Indian Coconut Journal**, p.15-27, 2010.

GORDON, M. H.; RAHMAN, I. A. Effect of processing on the composition and oxidative stability of coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 8, p. 574–576, 1991.

GOULDING, A; JONES, I.E; TAYLOR, R.W; WILLIAMS, S.M; MANNING, P.J. Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: A dual-energy x-ray absorptiometry study. **J Pediatr.**, v.139, p. 509–515, 2001.

GUO, W; CHOI, J.K; KIRKLAND, J.L; CORKEY, B.E; HAMILTON, J.A. Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. **The Biochemical journal**, v. 349, n. Pt 2, p. 463–471, 2000.

HALADE, G.V; EL JAMALI, A; WILLIAMS, P.J; FAJARDO, R.J; FERNANDES, G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 1, p. 43–52, 2011.

HALADE, G. V; RAHMAN, M.M; WILLIAMS, P.J; FERNANDES, G. high fat diet induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1162–1169, 2010.

HAMILTON, E.J; RAKIC, V; DAVIS, W.A; CHUBB, S.A; KAMBER, N; PRINCE, R.L; DAVIS, T.M. Prevalence and predictors of osteopenia and osteoporosis in adults with type 1 diabetes. **Diabet Med.**, v.26, p. 45-52, 2009.

HAN, J. R; DENG, B; SUN, J; CHEN, C.G; CORKEY, B.E; KIRKLAND, J.L; MA, J; GUO, W. Effects of dietary medium-chain triglyceride on weight loss and insulin sensitivity in a group of moderately overweight free-living type 2 diabetic Chinese subjects. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 56, n. 7, p. 985–991, 2007.

HAN, J; HAMILTON, J.A; KIRKLAND, J.L; CORKEY, B.E; GUO, W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. **Obesity research**, v. 11, n. 6, p. 734–744, 2003.

HAYATULLINA, ZIL; MUHAMMAD, N;MOHAMED, N; SOELAIMAN, I.N. Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

HILL, A.A; BOLUS, W.R; HASTY, A.H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. **Immunological Reviews.**, v. 262, n. 1, p. 134–152, 2014.

HIRAI, S. Takahashi, N; Goto, T; Lin, S; Uemura, T; Yu, R; Kawada, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

HOPPS, E; NOTO, D; CAIMI, G; AVERNA, M. R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 72–77, 2010.

HSU, Y.H; VENNERS, S.A; TERWEDOW, H.A; FENG, Y; NIU, T; LI, Z; LAIRD, N; BRAIN, J.D; CUMMINGS, S.R; BOUXSEIN, M.L; ROSEN, C.J; XU, X. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. **Am J Clin Nutr.**, v. 83, p.146–154, 2006.

IQBAL, S.; NASEEM, I. Role of vitamin A in type 2 diabetes mellitus biology: Effects of intervention therapy in a deficient state. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 901–907, 2015.

JANKET, S.-J. et al. Oral Infections , Metabolic Inflammation , Genetics , and Cardiometabolic Diseases. **Journal of Dental Research**, v. XX, n. X, p. 1–9, 2015.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KANG, J. G.; PARK, C.-Y. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. **Diabetes & metabolism journal**, v. 36, n. 1, p. 13–25, 2012.

KHAN, M. I; ASHA, M.R; BHAT, K.K; KHATOON, S. Studies on quality of coconut oil blends after frying potato chips. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1165–1172, 2008

KOEHNLEIN, E.A; SALADO, G. A; YAMADA, A.N. ORIGINAL, A. Adesão à reeducação alimentar para perda de peso: determinantes, resultados e a percepção do paciente. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n.1, p.56-65, 2008.

KRAUSE, M. V.; ESCOTT-STUMP, S; MAHAN, L. K; RAYMOND, J.L. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. xxi, 1228 p.

KROTKIEWSKI, M. Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 25, n. 9, p. 1393–1400, 2001.

KUMAR, P. K. P.; KRISHNA, A. G. G. Physicochemical characteristics of commercial coconut oils produced in India. **Grasas Y Aceites**, v. 66, n. March, p. 1–11, 2015.

LACERDA, D. R; SERAKIDES, R; OCARINO, N. D. M; FERREIRA, A. V. M; MORAES, M. M; BOELONI, J. N; SILVA, J. F; OLIVEIRA, M. C.; BARCELLOS, L. A. M.; RODRIGUES, L. O. C; SOARES, D. D. Osteopetrosis in obese female rats is

site-specifically inhibited by physical training. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 1, p. 44–56, 2015.

LIAU, K.M; LEE, Y. Y; CHEN, C. K; RASOOL, A.H. G. An Open-Label Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Virgin Coconut Oil in Reducing Visceral Adiposity. **ISRN Pharmacology**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

LIU, Y-H; ZHANG, Y; XU, Q; YU, X-M; ZHANG, X-S; WANG, J; XUE, C; YANG, X-Y; ZHANG, R-X; XUE, C-Y. Increased Norepinephrine by Medium-Chain Triglyceride Attributable to Lipolysis in White and Brown Adipose Tissue of C57BL/6J Mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1213–1218, 2012.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LUMACHI, F; CAMOZZI, V; TOMBOLAN, V; LUISETTO, G. Bone mineral density, osteocalcin, and bone-specific alkaline phosphatase in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Ann N Y Acad Sci** v.1173, p.64-67, 2009.

MAHLEY, R. W. Atherogenic hyperlipoproteinemia: the cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol. *Medical Clinics of North America*, v. 66, p. 375-402, 1982.

MANAF, M.A; CHE MAN, Y.B SHEIKH, N.; HAMID, A.; ISMAIL, A. Analysis of Adulteration of Virgin Coconut Oil By Infrared Spectroscopy. **Journal of Food Lipids**, v. 14, p. 111–121, 2007.

MANSOR, T. S. T., CHE MAN, Y. B., SHUHAIMI, M., ABDUL AFIQ, M. J., KU NURUL, F. K. M. Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. **International Food Research Journal**, 2012, 19, 837-845.

MARCHETTI, E; MONACO, A; PROCACCINI, L; MUMMOLO, S; GATTO, R; TETÈ, S; TECCO, S; MARZO, G. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 88, 2012.

MARINA, A M; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H; AMIN, I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60 Suppl 2, n. 914048297, p. 114–123, 2009a.

MARINA, A. M; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H; AMIN, I. Chemical Properties of Virgin Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.86, p.301–307, 2009b.

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

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1374–1382, 2006.

MATSUO, T; TAKEUCHI, H. Effects of structured medium- and long-chain triacylglycerols in diets with various levels of fat on body fat accumulation in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 219–225, 2004.

MCARDLE, M. A. FINUCANE, O.M; CONNAUGHTON, R.M; MCMORROW, A.M; ROCHE, H.M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1–23, 2013.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

NAKAMURA, T; YOSHIHARA, D; OHMORI, T; YANAI, M; TAKESHITA, Y. Effects of Diet High in Medium-Chain Triglyceride on Plasma Ketone, Glucose, and Insulin Concentrations in Enterectomized and Normal Rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 40, p. 147-159, 1994.

NARAYANANKUTTY, A; MUKESH, R.K; AYOOB, S.K; RAMAYAMA, S.K; SUSEELA, I.M. Virgin coconut oil maintains redox status and improves glycemic conditions in high fructose fed rats. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 895–901, 2016.

NARDINI, M; SCACCINI, C; D'AQUINO, M; CORCOS BENEDETTI, P; DI FELICE, M; TOMASSI, G. Lipid peroxidation in liver microsomes of rats fed soybean, olive, and coconut oil. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.4, n. 1, p. 39–44, 1993.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

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.

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

NEVIN, K.G; RAJAMOHAN, T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed SpragueDawley rats. **The European Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v.3, p.1-8, 2008.

NEVIN, K.G; RAJAMOHAN, T. Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol coadministered rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.87, n.8, p.610-616, 2009.

NORTON, D.; ANGERMAN, N.; ISTFAN, N.; LOPES, S. M.; BABAYAN, V. K.; PUTZ, M. C.; STEEN, S. N.; BLACKBURN, G. L. Comparative study of coconut oil, soybean

oil, and hydrogenated soybean oil. **The Philippine Journal of Coconut Studies**, vol. 29, no. 1 e 2, 2004.

OSBORN, O; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 363–74, 2012.

OSHIMA, K; NAMPEI, A; MATSUDA, M, et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.331, p. 520–526, 2005.

PIOT, C ; HOCQUETTE, J-F; VEERKAMP, J.H ; DURAND, D ; BAUCHART, D. Effects of dietary coconut oil on fatty acid oxidation capacity of the liver, the heart and skeletal muscles in the preruminant calf. **British Journal of Nutrition**, v. 82, 299–308, 1999.

POLLOCK, N. K. et al. Is adiposity advantageous for bone strength? A peripheral quantitative computed tomography study in late adolescent females. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1530–1538, 2007.

POPPITT, S. D.; STRIK, C. M.; MACGIBBON, A. K. H.; MCARDLE, B. H.; BUDGETT, S. C.; MCGILL, A. T. Fatty acid chain length, postprandial satiety and food intake in lean men. **Physiology and Behaviour**. vol. 10, p. 161-167, 2010.

PORTILLO, M. P. et al. Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 22, n. 10, p. 974–9, 1998.

PRIOR, I. A; DAVIDSON, F; SALMOND, C. E; CZOCHANSKA, Z. Cholesterol, coconuts, and diet on Polynesian atolls: A natural experiment: The Pukapuka and Tokelau Island studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 8, p. 1552–1561, 1981.

ROBBINS, S.L; ASTER, J.C; KUMAR, V; ABBAS, A.K; PERKINS, J.A. **Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 910 p.

SABITHA, P.; VAIDYANATHAN, K.; VASUDEVAN, D. M.; KAMATH, P. Comparison of lipid profile and antioxidant enzymes among south indian men consuming coconut oil and sunflower oil. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, vol. 21, n.1, p. 76-81, 2009.

SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 43, n. 1, p. 254–266, 2007.

SANDI, A.L.S. **Diagnósticos de pontos críticos de contaminação microbiológica em uma agroindústria pedagógica**. 2010. 103f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, R.D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, 2013. .

SÁYAGO-AYERDI, S.G; VAQUERO, M.P; SCHULTZ-MOREIRA, A; BASTIDA, S; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. **Nutricion Hospilaria**, v.23, p. 191-202, 2008.

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

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, p. 1444–1449, 2009.

SILVA, R.S.M; FORTES, R.C; SOARES, H.F. Efeitos da suplementação dietética com óleo de coco no perfil lipídico e cardiovascular de indivíduos dislipidêmicos. **Nutrição Brasil**, v.10, n.6, p. 364-369, 2011.

SIRIWARDHANA, N; KALUPAHANA, N.S;CEKANOVA, M; LEMIEUX, M; GREER, B; MOUSTAID-MOUSSA, N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 613–623, 2013.

ST-ONGE, M-P; BOURQUE, C; JONES, P.J.H; ROSS, R; PARSONS, W.E. Medium-versus long-chain triglycerides for 27 days increases fat oxidation and energy expenditure without resulting in changes in body composition in overweight women. **International Journal of Obesity**, v. 27, p. 95–102, 2003.

SUN, H; JIANG, T; WANG, S; HE, B; ZHANG, Y; PIAO, D; YU, C; WU, N; HAN, P. The effect of LXR- α , ChREBP and Elovl6 in liver and white adipose tissue on medium- and long-chain fatty acid diet-induced insulin resistance. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 102, n. 3, p. 183–192, 2013.

TAKEUCHI, H; NOGUCHI, O; SEKINE, S; KOBAYASHI, A; AOYAMA, T. Lower Weight Gain and Higher Expression and Blood Levels of Adiponectin in Rats Fed Medium-Chain TAG Compared with Long-Chain TAG. **Lipids**, v. 41, n. 2, p. 207 - 213, 2006.

TERADA, S; YAMAMOTO, S; SEKINE, S; AOYAMA, T. Dietary intake of medium- and long-chain triacylglycerols ameliorates insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 92–97, 2012.

THIEME, J. G. **La industria del aceite de coco**. Roma: FAO, 1970. 267p.

TOMOFUJI, T; YAMAMOTO, T; TAMAKI, N; EKUNI, D; AZUMA, T; SANBE, T; IRIE, K; KASUYAMA, K; UMAKOSHI, M; MURAKAMI, J; KOKEGUCHI, S; MORITA, M. Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. **Journal of periodontology**, v. 80, n. 8, p. 1324–9, 2009.

TSUJI, H; KASAI, M; TAKEUCHI, H; NAKAMURA, M; OKAZAKI, M; KONDO, K. Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2853-2859, 2001.

TURNER, N; HARIHARAN, K; TIDANG, J; FRANGIOUDAKIS, G; BEALE, S. M; WRIGHT; L. E; ZENG, X.Y; LESLIE, S. J; LI, JING-YA; KRAEGEN, E.W; COONEY, G. J; YE, J-M. Enhancement of Muscle Mitochondrial Oxidative. **Diabetes**, v. 58, n. November, p. 2547–2554, 2009.

VEECH, R. L. Ketone esters increase brown fat in mice and overcome insulin resistance in other tissues in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1302, n. 1, p. 42–48, 2013.

VERALLO-ROWELL, V.C; 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. 308–315, 2008.

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

VOON P.T, NG TK, LEE V.K, et al. Diets high in palmitic acid (16:0), lauric and myristicacids (12:0p 14:0), or oleic acid (18:1) do not alter postprandial or fasting plasma homocysteine and inflammatory markers in healthy Malaysian adults. **Am J Clin Nutr.**, v.94, p.1451–1457, 2011

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185–194, 2010.

WEILER, H.A; JANZEN, L; GREEN, K; GRABOWSKI, J; SESHIA, M.M; YUEN, K.C. Percent body fat and bone mass in healthy Canadian females 10 to 19 years of age. **Bone**, vol.27, n.2, p. 203-207, 2000.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation , stress , and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WHO (World Health Organization). **Fact sheet: obesity and overweight**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> Acesso em: 21 de abril de 2016.

WHO (World Health Organization). Fact sheet: The top 10 causes of death. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> Acesso em: 21 de abril de 2016.

WITHROW, D; ALTER, D. A. The economic burden of obesity worldwide: A systematic review of the direct costs of obesity. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 2, p. 131–141, 2011.

WYMELBEKE, V.V; LOUIS-SYLVESTRE, J; FANTINO, M. YAGO-AYERDI, S.G; VAQUERO, M.P; SCHULTZ-MOREIRA, A; BASTIDA, S. Substrate oxidation and control of food intake in men after a fat-substitute meal compared with meals supplemented with an isoenergetic load of carbohydrate, long-chain triacylglycerols, or medium-chain triacylglycerols. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p. 620-630, 2001.

WONGDEE, K; CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. **World journal of diabetes**, v. 2, n. 3, p. 41–8, 2011.

ZAKARIA, Z.A; AHMAD, Z; SOMCHIT, M. N; ARIFAH, A. K; KHAIRI, H. M; SULAIMAN, M. R ; TEH, L. K; SALLEH, M. Z; LONG, K. Antihypercholesterolemia property and fatty acid composition of mardi-produced virgin coconut oils. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.4, n.9, p. 636-644, 2010.

ZHANG, Y; XU, Q; LIU, Y.H; ZHANG, X.S; WANG, J; YU, X.M; ZHANG, R.X; XUE, C; YANG, X.Y; XUE, C.Y. Medium-chain triglyceride activated brown adipose tissue and induced reduction of fat mass in C57BL/6J mice fed high-fat diet. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 28, n. 2, p. 97–104, 2015.

ZHAO, L-J; JIANG, H; PAPASIAN, C.J; MAULIK, D; DREES, B; HAMILTON, J; DENG, H-W Correlation of Obesity and Osteoporosis: Effect of Fat Mass on the Determination of Osteoporosis. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 23, n. 1, p. 17–29, 2008.

CAPÍTULO 1 – QUALIDADE FÍSICO QUÍMICA DE ÓLEOS DE COCO EXTRAVIRGEM COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Artigo submetido em: 08/08/2016

Periódico: Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos

QUALIDADE FÍSICO QUÍMICA DE ÓLEOS DE COCO EXTRAVIRGEM COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Marina Campos Zicker^{*1}, Déborah de Oliveira Ramiro², Mariana Nunes de Lima Emídio², Érika Maria Roel Gutierrez³, Raquel Linhares Bello de Araújo¹; Renata Adriana Labanca¹; Adaliene Versiani Matos Ferreira².

¹*Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil*

²*Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil*

³*Faculdade de Tecnologia Deputado Roque Trevisan, Piracicaba, Brasil*

*Email: marizicker@yahoo.com.br

RESUMO

Foram realizadas análises físico-químicas (perfil de ácidos graxos, índice de saponificação, índice de iodo, índice de peróxido, índice de acidez, umidade, densidade e a determinação da estabilidade oxidativa) de três diferentes marcas de óleo de coco extravirgem (OCEV) comercializadas no Brasil. Uma vez que é inexistente na legislação brasileira um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para o OCEV, os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os PIQs para este produto, desenvolvidos em países da Ásia e da Oceania pelo órgão APCC (*Asian and Pacific Coconut Community*) e nas Filipinas, onde o documento oficial é o PNS (*Philippine National Standard*). Todas as marcas de OCEVs apresentaram-se em conformidade com os PIQs no que se refere aos teores dos ácidos graxos caprílico, cáprico, láurico, mirístico e palmítico e em relação aos índices de peróxido e de iodo. Entretanto, o mesmo não foi observado para os teores dos ácidos esteárico e oléico e apenas uma marca atendeu ao preconizado para a concentração do ácido linoléico. Nenhuma das marcas de OCEV apresentou densidade e teor de umidade de acordo com os PIQs, uma delas estava não conforme em relação ao índice de saponificação e duas estavam com valores de acidez acima do limite preconizado pelos PIQs. Observou-se que os OCEVs apresentaram estabilidade oxidativa adequada e tal fato deve-se ao elevado conteúdo de ácidos graxos saturados nestes produtos. As marcas de óleos de coco extravirgem analisadas apresentaram diferença entre si no que se refere à umidade, aos índices de acidez e iodo, aos teores de ácidos graxos mirístico e linoléico e em relação à estabilidade oxidativa. Tais diferenças estão, provavelmente, relacionadas às distintas condições de produção e conservação dos produtos.

Palavras chave: óleo de coco extravirgem, características físico-químicas, óleos, ácidos graxos.

ABSTRACT

Physicochemical properties (fatty acid composition, saponification value, iodine value, peroxide value, free fatty acid value, moisture content, density and the oxidative stability) were conducted in three different extra virgin coconut oil brands (OCEVs) marketed in Brazil. The results were compared with the international Identity and Quality Standards of extra virgin coconut oil, since this document is nonexistent in the current Brazilian legislation. All OCEVs brands were in accordance with the IQSs in relation to the content of fatty acids caprylic, capric, lauric, myristic and palmitic and peroxide and iodine values. The samples did not have optimal levels of stearic and oleic fatty acids and only one of them was in agreement of established by IQSs by regarding the concentration of linoleic fatty acid. None of OCEVs brands presented density and moisture content according to IQSs and only one was not in accordance to IQSs in relation to the saponification value. It was observed that OCEVs showed high oxidative stability in comparison with the refined coconut oil. The different brands of extra virgin coconut oils produced in Brazil showed difference in relation to moisture, free fatty acid and iodine values, in the levels of myristic and linoleic fatty acids and in relation to oxidative stability. Such differences are related to the different conditions of production and storage of products.

Keywords: extra virgin coconut oil, physicochemical properties, oils, fatty acids.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) o óleo de coco é definido como o óleo obtido do fruto *Cocos nucifera L.* (coco), empregando-se processos tecnológicos adequados (BRASIL, 1999), ou seja: limpeza, descorticação, trituração da polpa e finalmente, prensagem mecânica (MORETTO & FETT, 1998).

Este alimento é composto majoritariamente por triglicerídeos de cadeia média, ou seja, que apresentam ácidos graxos saturados de baixo peso molecular, com 6 a 12 moléculas de carbono. O principal ácido graxo do óleo de coco é o láurico (ZAMBIAZI et al., 2007; SÁYAGO-AYERDI et al., 2008).

As gorduras láuricas são muito importantes na indústria de alimentos, uma vez que são resistentes à oxidação não enzimática e, ao contrário de outras gorduras saturadas, elas têm temperatura de fusão baixa. Desta forma, são muito usadas no preparo de alimentos, em substituição a gordura vegetal hidrogenada, em produtos de confeitaria, sorvetes e sobremesas (MACHADO et al., 2006).

As características físicas e químicas do óleo de coco variam de acordo com o método de obtenção do produto, com a origem e com as condições de armazenamento do mesmo (MARINA et al., 2009b).

Existem dois métodos principais de extração do óleo de coco: o método úmido e o método seco (THIEME, 1970).

No método seco é utilizada a polpa da fruta seca (desidratada sob radiação solar), que é prensada em equipamento específico (prensa mecânica), sendo que o produto obtido apresenta muitos interferentes (impurezas, tais como: resíduos da casca, produtos de decomposição do óleo, pigmentos) e elevada acidez (em torno de 5%) e, portanto, para que o óleo possa ser utilizado na alimentação é necessário que o mesmo seja submetido ao processo de refino, para eliminação de substâncias indesejáveis, descoloração e desodorização (MORETTO & FETT, 1998; CALLADO & PAULA JR, 1999). Tais etapas acarretam diversas transformações químicas no óleo de coco, levando-o a perder qualidade sensorial e parte do seu conteúdo de compostos fenólicos e vitaminas lipossolúveis (A e E), substâncias que promovem benefícios ao organismo, quando ingeridas (MARINA et al., 2009b). Quando é utilizado o método seco de extração, o óleo de coco é denominado de óleo de copra

ou óleo de coco refinado (CALLADO & PAULA JR, 1999; SENEVIRATNE et al., 2009).

No método úmido, a polpa fresca do coco é prensada, para que o produto conhecido como leite de coco, seja obtido. A partir deste, após a quebra da emulsão e com a separação das fases (fase aquosa e fase lipídica), é possível realizar a extração do óleo de coco (THIENE, 1970). A separação da emulsão do leite de coco pode ser realizada de diversas maneiras, como por exemplo, pela aplicação da fermentação, da cocção, da centrifugação, do congelamento com posterior descongelamento, da adição de enzimas e da acidificação. No método úmido podem ser aplicadas temperaturas baixas (10°C - 40°C) ou altas (100 - 120°C). Quando é utilizado o método úmido em baixas temperaturas, o óleo de coco obtido é denominado de óleo de coco extravirgem (OCEV), que se trata de um produto de melhor qualidade nutricional e sensorial e baixa acidez (0,1 a 0,2%), devido a não utilização de altas temperaturas e não realização de refino, processos que podem afetar negativamente a composição do produto (VERALLO-ROWELL, et al., 2008; SENEVIRATNE et al., 2009).

O OCEV é um produto que tem despertado muito interesse entre os consumidores, devido a uma potencial atividade antioxidante (atribuída à presença de compostos fenólicos e vitaminas A e E) e efeitos positivos na redução do peso corporal e deposição de gordura (relacionada a um significativo conteúdo de triglicerídeos de cadeia média, gorduras com provável efeito termogênico) (MARINA et al, 2009a; SENEVIRATNE et al., 2009; ZAKARIA et al, 2010; GOPALA et al., 2010).

Para caracterização, determinação da qualidade, verificação do efeito de processamentos, adequação nutricional e estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQs) de óleos comestíveis, uma série de análises físico-químicas precisa ser efetuada. A composição em ácidos graxos e a determinação de índices, tais como os de iodo, peróxido, acidez e saponificação, são as principais análises utilizadas para a determinação da identidade dos óleos (IAL, 2004; MACHADO et al., 2006). Outro parâmetro físico-químico de análise da qualidade integral dos óleos vegetais é a avaliação da estabilidade oxidativa, normalmente determinada pelo uso do equipamento Rancimat, que induz a uma oxidação acelerada da amostra, para estabelecimento do grau de estabilidade da mesma (CASTELLO BRANCO & TORRES, 2011).

Considerando que a composição de ácidos graxos e as propriedades físico-químicas do OCEV produzido no Brasil são ainda pouco conhecidas, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição em ácidos, realizar a caracterização físico-química e determinar a estabilidade oxidativa de três diferentes marcas de OCEV comercializadas no país. Os resultados contidos neste trabalho podem auxiliar a elaboração de um Padrão de Identidade e Qualidade brasileiro do OCEV, uma vez que este documento é inexistente na legislação vigente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material analisado

Foram utilizadas três marcas de óleo de coco extravirgem *in natura*, contendo três lotes de produção diferentes, comercializadas na cidade de Belo Horizonte (Minas Gerais), doadas pelos produtores. .

As amostras foram devidamente identificadas, mantidas acondicionadas em seus respectivos recipientes e armazenadas sob refrigeração (4 - 10°C), protegidas da luz, até o momento dos ensaios.

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação do perfil de ácidos graxos

Para determinação do perfil de ácidos graxos da amostra, inicialmente foi realizada a metilação dos ácidos graxos de acordo com o método proposto por Hartman & Lago (1973).

A amostra foi pesada (100 mg) em um tubo de ensaio com tampa de rosca. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de reagente de saponificação (solução metanólica de NaOH a 0,5 M, grau cromatográfico) e agitou-se vigorosamente em vortex (Minishaker IKA MS2, EUA). Os tubos foram levados ao banho-maria (Quimis, 226.11) a 70°C durante 5 minutos. Após resfriamento dos tubos em temperatura ambiente (25°C), adicionou-se 5 mL do reagente de esterificação (solução composta por NH₄Cl, H₂SO₄ e metanol grau cromatográfico). As etapas de aquecimento e resfriamento se repetiram e em seguida, foram adicionados 10 mL de n-hexano (grau cromatográfico) agitando-se vigorosamente por 30 segundos em vortex. Uma solução salina saturada (5 mL) foi adicionada e após agitação manual ocorreu a separação das fases. Foi coletada a fase superior e a mesma foi transferida para outro tubo de vidro com tampa de rosca, no qual se adicionou água destilada (5 mL), ocasionando em separação de fases. Novamente a porção superior foi coletada e transferida para um terceiro tubo, contendo 0,1 g de Na₂SO₄ anidro. Os tubos foram agitados por inversão e os ésteres metílicos foram coletados. As amostras foram armazenados em frascos de vidro, fechados a vácuo sob atmosfera de nitrogênio gasoso, e armazenadas em freezer a -20 °C, até o momento das análises.

A análise cromatográfica dos ésteres metílicos provenientes dos OCEVs foi realizada de acordo com a metodologia proposta pela American Oil Chemists Society (AOCS, 1990). Foi utilizado cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010, equipado com injetor split e detector de ionização de chama) e coluna Stabilwax (30m x 0,53mm x 1µm), com programação isotermal a 180 °C/5 min e aumento de 5°C /min para 210°C, e manutenção desta temperatura por 15 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 180°C e a 250°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio. Foi utilizado um mix de padrão de ácidos graxos contendo ácidos saturados e insaturados entre 8 e 22 carbonos (Supelco 37 FAME Mix, Sigma, EUA).

2.2.2 Análises físico-químicas dos óleos de coco extravirgem

2.2.2.1 Índice de acidez

Para determinação do índice de acidez das amostras, foi aplicado o método oficial de acidez titulável, de acordo com a AOCS (Ca – 5a40) (AOCS, 1990).

As amostras foram homogeneizadas e pesadas (2 g) em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Foram adicionados 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) neutra e duas gotas do indicador fenolftaleína. A solução foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L até o aparecimento da coloração rósea.

O índice de acidez foi expresso como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessários para neutralizar os ácidos livres de 1 g de amostra.

2.2.2.2 Índice de peróxido

Para a determinação do índice de peróxido, foi aplicada a metodologia oficial da AOCS (Cd 8-53) (AOCS, 1990).

As amostras foram homogeneizadas e pesadas (5 g) em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados 30 mL da solução ácido acético-clorofórmio (3:2) e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio, deixando em repouso ao abrigo da luz por exatamente um minuto. Acrescentou-se 30 mL de água destilada e realizou-se a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol/L, até que a coloração amarela desaparecesse. Adicionou-se 0,5 mL de solução de amido

indicadora e prosseguiu-se com a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul.

2.2.2.3 Índice de iodo

Para a determinação do índice de iodo, foi aplicada a metodologia oficial da AOCS (Cd 1b-87), (AOCS, 1990).

As amostras foram homogeneizadas e pesadas (3 g) em frasco Erlenmeyer de 500 mL. Foram adicionados 1 mL de solução cicloexano-ácido acético (1:1) e 25 mL da solução Wijs. Aguardou-se 1h para que a reação ocorresse e logo após adicionou-se 20 mL de solução de iodeto de potássio 15% e 150 mL de água deionizada. Procedeu-se a titulação com tiossulfato de sódio 0,1 mol/L até o desaparecimento da cor amarela. Adicionou-se 1 mL de solução indicadora de amido e prosseguiu-se a titulação até que a cor azul desaparecesse completamente.

2.2.2.4 Índice de saponificação

Para a determinação do índice de saponificação foi aplicado o método oficial da AOCS (Cd 3-25), (AOCS, 1990).

As amostras foram homogeneizadas e pesadas (5 g) em frasco Erlenmeyer de 500 mL e foi adicionado de 50 mL da solução alcoólica de hidróxido de potássio. Conectou-se o condensador, para fervura até a completa saponificação da amostra (aproximadamente uma hora). Após o resfriamento do frasco, a amostra foi adicionada de solução de fenolftaleína (1 mL) e titulada com a solução de ácido clorídrico 0,5 mol/L até o desaparecimento da cor rósea.

2.2.2.5 Densidade

Para a determinação da densidade das amostras foi aplicado o método oficial da AOCS (Cc 10a-25) modificado (SANTOS et al., 2013), que determina a razão da massa da amostra por unidade de volume a 25°C e é aplicável a todos os óleos e gorduras líquidas.

2.2.2.6 Umidade e matéria volátil

O teor de umidade e matéria volátil foi determinado segundo o método oficial Ca 2c-25 da AOCS (1990).

Em uma cápsula de porcelana, colocou-se aproximadamente 25 g de areia lavada e calcinada e secou-se em estufa (marca FANEM, modelo 315 SE) com temperatura de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2h. Após este procedimento, adicionou-se o óleo de coco (10 mL), pesando o conjunto novamente. Levou-se a cápsula para estufa com a manutenção da temperatura ($103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), por 2h30min. O teor de umidade foi expresso em gramas de água por 100g de óleo de coco extravirgem.

2.2.3 Estabilidade oxidativa dos óleos de coco extravirgem

A estabilidade oxidativa das amostras foi analisada utilizando-se o equipamento Rancimat, conforme método Cd 12b-92 (AOCS, 1990).

As amostras de óleo de óleo (3 g) foram aquecidas a 110°C e submetidas a taxa de injeção de ar seco a 20 L/h.

2.2.4 Análise estatística

Após a verificação das premissas da ANOVA, as médias dos tratamentos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA) e quando o valor F foi significativo ($p < 0,05$), o Teste de Tukey foi aplicado para identificar as diferenças entre as médias, ao nível de 5% de significância (PIMENTEL-GOMES, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição em ácidos graxos dos óleos de coco extravirgem

O perfil de ácidos graxos dos OCEVs foi composto pelos ácidos saturados de cadeia longa (mirístico, palmítico, esteárico) e de cadeia média (caprílico, cáprico e láurico), assim como por ácidos de cadeia longa insaturada (oléico e linoléico) (Tabela 1).

Corroborando o que já foi mostrado em outros trabalhos (Tabela 2), os OCEVs analisados apresentaram majoritariamente em sua composição, os ácidos graxos de cadeia saturada (AGCS), sendo que dos ácidos presentes nas amostras das marcas 1, 2 e 3, 93,3%, 93,2% e 92,7%, respectivamente, eram AGCS.

O elevado grau de saturação dos OCEVs proporciona uma maior estabilidade a este produto, que em comparação com os demais óleos vegetais (compostos em sua maior parte por ácidos insaturados), são menos susceptíveis à peroxidação lipídica (ARAUJO, 2008), processo que resulta em perda de valor nutricional, surgimento de substâncias sensorialmente desagradáveis e de compostos tóxicos (FERRARI, 1998).

Do total de ácidos graxos nas marcas 1, 2 e 3, 60,61%, 60,57% e 60,36% eram de cadeia média, respectivamente. Dentre os ácidos graxos quantificados nos OCEVs, o ácido láurico, apresentou-se predominante em todas as amostras analisadas, sendo que as marcas 1, 2 e 3 apresentaram teores deste ácido de 49,76%, 48,08% e 49,18%, respectivamente (Tabela 1).

Uma predominância de ácidos de cadeia média no OCEV possibilita associar o consumo deste produto a benefícios à saúde, tais como: promoção de maior facilidade de emagrecimento, por ocasionar em aumento da saciedade (HAN et al., 2007; BOSH et al., 2011), maior gasto energético (TURNER et al., 2009; ZHANG et al., 2015) e aumento na taxa de oxidação de lipídios (CLEGG, 2010) e melhora na homeostase glicêmica, devido ao aumento na produção e na sensibilidade da insulina (SUN et al., 2013).

Ao visualizar os cromatogramas das amostras observa-se que as marcas 1 (Figura 1A), 2 (Figura 1B) e 3 (Figura 1C) apresentaram elevada similaridade entre si, em termos de composição de ácidos graxos, sendo que houve valores com diferença estatisticamente significativa entre as amostras, apenas em relação aos teores de ácidos graxos linoléico e mirístico (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos dos óleos de coco extra virgem (%) e avaliação de conformidade em relação aos padrões de identidade e qualidade

	Marca 1			Marca 2			Marca 3			Padrões de Identidade e Qualidade				
	Lote A	Lote B	Lote C	Média	Lote A	Lote B	Lote C	Média	Lote A	Lote B	Lote C	Média	APCC (2006)	PNS (2007)
Caprílico (C8)	5,17	4,56	3,37	4,37 ^a ± 0,91	6,13	4,84	7,06	6,01 ^a ± 1,11	6,05	6,09	5,40	5,84 ^a ± 0,39	4,0 - 10	4,0 - 10,0
Capríco (C10)	5,86	7,33	7,34	6,48 ^a ± 0,85	6,03	7,54	5,86	6,48 ^a ± 0,92	5,52	5,19	5,32	5,34 ^a ± 0,17	4,0 - 8,0	4,0 - 8,0
Láurico (C12)	48,61	50,85	49,82	49,76 ^a ± 1,12	47,46	48,48	48,29	48,08 ^a ± 0,54	49,15	49,00	49,39	49,18 ^a ± 0,20	45,0 - 56,0	45,1 - 56,0
Mirístico (C14)	17,32	17,69	17,40	17,47 ^b ± 0,19	17,76	17,72	17,68	17,72 ^{b±} 0,04	18,08	18,34	18,58	18,33 ^a ± 0,25	16,0 - 21,0	16,0 - 21,0
Palmitico (C16)	7,72	7,77	8,16	7,88 ^a ± 0,24	8,11	8,24	7,56	7,97 ^a ± 0,36	7,89	7,74	8,09	7,91 ^a ± 0,17	7,5 - 10,2	7,5 - 10,2
Estearico (C18)	7,05	6,94	8,05	7,34 ^a ± 0,61	7,36	7,44	6,03	6,94 ^a ± 0,79	5,37	6,82	6,20	6,13 ^a ± 0,73	2,0 - 4,0	2,0 - 5,0
Oleico (18:1)	0,00	0,00	0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,33	0,00	1,37	0,85 ^a ± 0,65	0,67	1,01	0,34	0,67 ^a ± 0,34	4,5 - 10,0	5,0 - 10,0
Linoléico (18:2)	0,81	0,55	0,59	0,65 ^b ± 0,14	1,09	1,22	0,00	1,16 ^a ± 0,67	0,28	0,00	0,24	0,26 ^c ± 0,15	0,7 - 2,5	1,0 - 2,5

O perfil de ácidos graxos das amostras de OCEVs analisadas foi verificado em termos de conformidade com os PIQs estabelecidos pelos órgãos APCC e PNS (Tabela 1).

Todas as marcas de OCEV apresentaram-se em conformidade com os PIQs estabelecidos pelo APCC (2006) e pelo PNS (2007) no que se refere aos teores dos ácidos graxos caprílico, cáprico, mirístico, láurico e palmítico. Por outro lado, foram determinadas baixas concentrações de ácidos insaturados nas amostras analisadas, sendo que somente a marca 2 apresentou quantidade de ácido graxo linoléico em conformidade com as normas de referência (APCC: 0,7 - 2,5% e PNS: 1,0 – 2,5%), sendo que todas as demais marcas apresentaram concentração deste ácido menor ao limite inferior estabelecidos pelos PIQs. Além disso, todas as marcas avaliadas apresentaram concentração de ácido oléico inferior ao que os PIQs determinam como ideal para o OCEV (APCC: 4,5 – 10,0% e PNS: 5,0 – 10,0%) (Tabela 1).

A baixa concentração de ácidos graxos insaturados nos OCEVs avaliados, em relação aos limites preconizados pelos PIQs, pode estar relacionada à peroxidação lipídica ocasionada pela exposição ao calor, luz e oxigênio, durante o processo de obtenção e /ou armazenamento dos produtos, uma vez que estes são os principais fatores envolvidos na aceleração do processo de degradação dos ácidos graxos insaturados (FERRARI, 1998; ARAUJO, 2008). Com resultados similares, Kumar & Krishna, (2015) e Marina e colaboradores (2009a) também determinaram baixos teores de ácido graxo linoléico em amostras óleos de coco, sendo estes de 0,13% e 0,79%, respectivamente (Tabela 2).

Todas as marcas de OCEV avaliadas apresentaram teor de ácido esteárico acima do limite superior estabelecido pelos PIQs (APCC: 2,0 - 4,0% e PNS: 2,0 - 5,0%). Este fato provavelmente é resultante da oxidação do ácido oléico, que se torna saturado ao ser degradado, transformando-se, portanto, em ácido esteárico (ARAUJO, 2008).

Apesar de distintas origens determinarem diferenças nas composições de ácidos graxos de óleos, relacionadas a condições particulares do cultivo em cada região (MARINA et al., 2009a), verifica-se que a composição de ácidos graxos das amostras analisadas é bastante similar àquela encontrada em outros trabalhos (Tabela 2), exceto para os ácidos graxos esteárico e os insaturados (oléico e linoléico), que apresentaram-se em quantidade maior e menor, respectivamente, ao comparar com os dados de outros estudos.

Figura 1 – Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa das amostras 1 (A), 2 (B) e 3 (C)

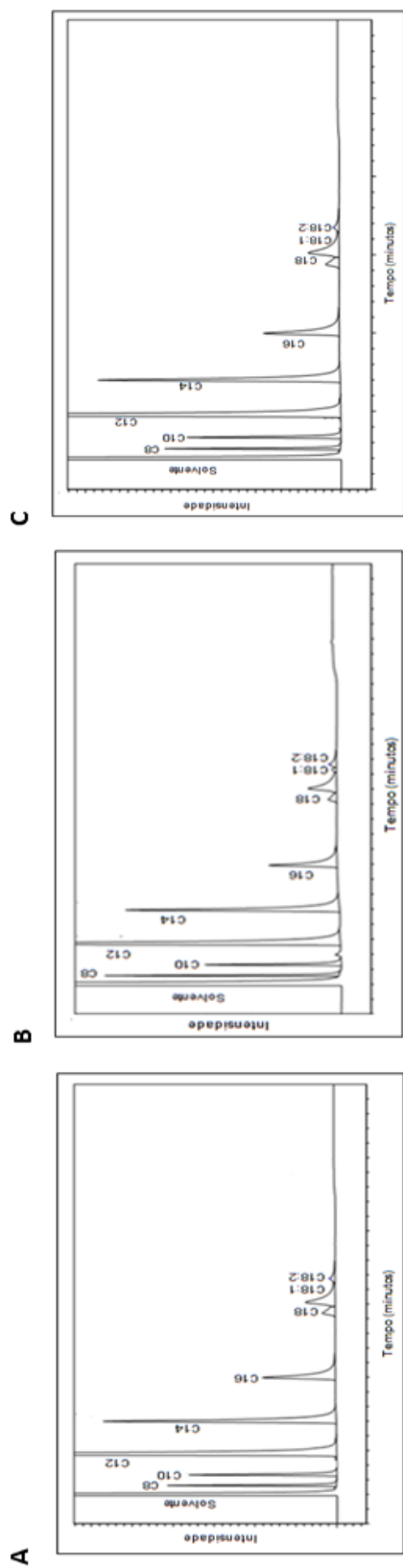


Tabela 2 - Composição em ácidos graxos do óleo de coco extravirgem de acordo com diferentes estudos

Autores	Resultados (%)							
	C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2
PORTILLO et al, 1998	8,60	6,60	47,00	17,20	9,00	2,40	6,70	1,60
KHAN et al, 2008	8,50	6,00	47,30	17,90	9,60	0,70	6,80	2,40
MARINA et al, 2008	8,41	6,08	52,48	16,93	7,19	1,24	5,36	0,79
GOPALA et al, 2010	7,00	5,40	48,90	20,20	8,40	2,50	6,20	1,40
GRESSLER et al, 2013	5,58	5,11	43,95	18,11	10,11	4,02	7,62	1,81
KUMAR, 2015	7,52	6,38	55,75	18,74	7,90	0,27	3,31	0,13

3.2 Características físico-químicas dos óleos de coco extravirgem

Os índices de acidez, peróxido, iodo, saponificação, assim como a densidade e a umidade e matéria volátil dos OCEVs foram determinados e verificou-se o grau de conformidade com os PIQs estabelecidos pelos órgãos APCC (2006) e PNS (2007) (Tabela 3).

Em relação ao índice de acidez, expresso em porcentagem de ácido láurico, as marcas apresentaram valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Apenas a Marca 1 apresentou este índice de acordo com o preconizado pelos PIQs (APCC e PNS: inferior a 0,2%). As marcas 2 e 3 apresentaram valor de acidez superior ao estabelecido por estes órgãos.

O índice de acidez revela o estado de conservação do óleo, visto que a decomposição dos glicerídeos é quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. A acidez de um óleo não é uma constante ou característica, mas é uma variável relacionada com a natureza, qualidade da matéria-prima, grau de pureza da gordura, com o processamento e, principalmente, com as condições de conservação do óleo (TODE FILHO et al., 2014).

Em relação à densidade, os OCEVs analisados apresentaram valores abaixo dos recomendados pelos PIQs, sendo que este foi de 0,905 g/L, para todas as amostras.

Tabela 3 – Análise físico química dos óleos de coco extravirgem (%) e avaliação de conformidade em relação aos padrões de identidade e qualidade

	Marca 1			Marca 2			Marca 3			Padrões de Identidade e Qualidade			
	Lote A	Lote B	Lote C	Média	Lote A	Lote B	Lote C	Média	Lote A	Lote B	Lote C	APCC (2006)	PNS (2007)
Índice de Acidez (% de Ácido Láurico)	0,089	0,094	0,096	0,093 ^c ±0,003	0,517	0,514	0,493	0,509 ^a ± 0,012	0,316	0,172	0,316	Max 0,2	Max 0,2
Índice de Saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	245,37	250,00	249,05	248,14 ^a ± 2,44	250,39	249,89	263,75	254,67 ^a ± 7,87	263,71	264,23	244,70	250 – 260	-
Índice de Iodo	5,65	5,49	5,83	5,66 ^b ± 0,17	6,95	7,47	7,36	7,26 ^b ± 0,27	6,03	6,49	6,13	4,1 – 11,0	-
Umidade (%)	0,160	0,166	0,158	0,161 ^b ± 0,004	0,226	0,275	0,188	0,230 ^a ± 0,04	0,161	0,137	0,157	Max 0,1%	Max 0,1%
Densidade (g/mL)	0,904	0,905	0,905	0,905 ^a ± 0,000	0,905	0,904	0,905	0,905 ^a ± 0,000	0,904	0,903	0,908	0,915 – 0,920	-
Índice de Peroxidos meq.kg-1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	< 3	< 3

*Médias seguidas por letra minúscula nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. LQ = Limite de quantificação

No trabalho de Mansor e colaboradores (2012) foi demonstrado que o método de produção do óleo de coco pode impactar diretamente nos valores de acidez, sendo que os óleos obtidos por métodos de refrigeração, de adição de enzimas, de fermentação e de secagem apresentaram valores de acidez de 0,31%, 0,35%, 0,29%, 0,46%, respectivamente. Óleos de coco produzidos por centrifugação, fermentação sem e com aplicação de calor apresentaram valores de acidez de 0,047 - 0,337%, 0,037 - 0,270% e 0,093 - 0,211%, respectivamente (DAYRIT et al., 2011).

Em relação ao índice de peróxido, em todas as amostras analisadas, os valores encontrados estavam abaixo do limite de quantificação, sendo que este foi estimado, considerando a resolução da bureta usada na titulação (SILVA, 2015) (Tabela 3). Uma vez que os PIQs do APCC e do PNS estabelecem que os óleos de coco devam apresentar valores de índice de peróxidos inferior a 3 meq.kg⁻¹, os OCEVs avaliados no presente trabalho estão em conformidade com estas normas.

A não detecção de peróxidos em óleos de coco também foi observada nos trabalhos de Kumar & Krishna (2015), Dayrit e colaboradores (2011) e Silva (2015). Marina e colaboradores (2009a) encontraram baixos valores de índice de peróxidos para amostras de OCEV, sendo que estes resultados variaram de 0,21 a 0,63 meq.kg⁻¹.

O índice de peróxido é um indicador da presença de produtos primários de oxidação em óleos, uma vez, que os ácidos graxos insaturados presentes na composição de óleos reagem com o oxigênio formando hidroperóxidos. A ausência de peróxidos nos OCEVs analisados indica que não há deterioração oxidativa significativa nestes produtos, provavelmente, devido a sua composição majoritária de ácidos graxos saturados (ARAUJO, 2008). No entanto, este resultado deve ser interpretado com cautela, pois sabe-se que baixos valores de índice de peróxido podem indicar que o óleo esteja na fase inicial ou fase final de oxidação devido, respectivamente, ao início do processo de oxidação ou à decomposição dos hidroperóxidos em aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, ésteres, furanos e lactonas (SILVA, 2015).

Observou-se, que todas as amostras de OCEV apresentaram resultados em conformidade com os limites estabelecidos pelo PIQ da APCC para índice de iodo (4,1 -11,0), sendo que estes valores, diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$), foram de 5,66, 7,26 e 6,21 para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 3). Os valores de índice de iodo obtidos para os OCEVs analisados se aproximam

daqueles que foram determinados por Marina e colaboradores (2009a) e Mansor e colaboradores (2012), sendo que estes variaram de 4,20 a 8,55 e 4,13 a 4,26, respectivamente.

O índice de iodo permite a identificação do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no óleo, sendo que quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior será o índice de iodo (MENDONÇA et al., 2008). Desta forma, justifica-se o menor índice de iodo do óleo de coco, em relação a outros óleos vegetais, como o de oliva (PEIXOTO et al., 1998) e o de soja (MENDONÇA et al., 2008). O baixo grau de insaturação do óleo de coco favorece uma maior estabilidade oxidativa (KUMAR & KRISHNA, 2015).

No que se refere ao índice de saponificação, foram obtidos para as amostras de OCEV analisadas os seguintes resultados: 248,14 mg.KOH g⁻¹ (Marca 1), 254,67 mg.KOH g⁻¹ (Marca 2) e 257,54 mg.KOH g⁻¹ (Marca 3) (Tabela 3), sem diferença estatística entre as marcas ($p > 0,05$). Em relação ao preconizado pelo PIQ do APCC, para este índice (250 – 260 mg.KOH g⁻¹) apenas a amostra 1 não apresentou-se em conformidade.

De acordo com Marina e colaboradores (2009a), o índice de saponificação é uma medida do peso molecular médio da cadeia de ácidos graxos que constituem o material lipídico, sendo diretamente proporcional à quantidade de ácidos graxos de cadeia curta. Desta forma, quanto menor o peso molecular do ácido graxo, maior o valor de índice de saponificação. Sendo assim, os elevados índices de saponificação nos OCEVs relacionam-se a uma significativa quantidade de ácidos graxos de cadeia curta e média nestas amostras.

Almeida e colaboradores (2011) determinaram índices de saponificação muito inferiores aos encontrados para os OCEVs, em óleos de canola, girassol e soja, sendo estes de 123,9 mg.KOH.g⁻¹, 133,7 mg.KOH g⁻¹ e 142,3 mg.KOH g⁻¹, respectivamente. Os valores encontrados no presente estudo, para índice de saponificação, são comparáveis aos resultados determinados em OCEVs por Marina e colaboradores (2009a) (250,07 a 260,27 mg.KOH g⁻¹), por Mansor e colaboradores (2012) (256,73 a 262,72 mg.KOH.g⁻¹) e por Kumar & Krishna (2015) (255,9 mg.KOH.g⁻¹).

Conhecer o teor de umidade e matéria volátil de óleos é fundamental, uma vez, que valores elevados deste parâmetro relacionam-se com o aceleração de

processos de oxidação e rancidez, enquanto valores mais baixos contribuem para um maior tempo de vida útil (ARAUJO, 2008). Os PIQs formulados pelo APCC e pelo PNS determinam um valor máximo de umidade e matéria volátil para o OCEV de 0,1%. Desta forma, todas as amostras analisadas ultrapassaram este limite, sendo que as marcas 1, 2 e 3 apresentaram teores de umidade e matéria volátil de 0,166%, 0,230% e 0,151%, respectivamente. O aumento de umidade e matéria volátil nestas amostras pode ser justificado pela forma de extração dos OCEVs. Mansor e colaboradores (2012) encontraram diferenças significativas na umidade e matéria volátil de óleos de coco produzidos de formas diferentes, sendo que o produto obtido por método enzimático e aquele produzido por fermentação apresentaram valores de umidade e matéria volátil de 0,11 e 0,06%, respectivamente.

3.3 Determinação da estabilidade oxidativa dos óleos de coco extravirgem

A estabilidade oxidativa representa uma avaliação do estado de oxidação dos óleos e gorduras e é uma determinação importante a nível industrial. Trata-se de um parâmetro comparativo muito utilizado no controle de qualidade de matérias-primas e de processos para se avaliar diferentes tipos de óleos. A estabilidade oxidativa é expressa pelo “período de indução” da reação, ou seja, o tempo necessário para se atingir um ponto crítico de oxidação. O uso do Rancimat para avaliação da estabilidade oxidativa é considerado o método oficial para avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e esta análise possui forte correlação com a capacidade antioxidante de óleos (ANTONIASSI, 2001; CASTELLO BRANCO & TORRES, 2011).

Em relação ao período de indução, os valores encontrados para as marcas analisadas foram 39h59min, 17h49min e 25h86min, para as marcas 1, 2 e 3, respectivamente, sendo que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores (Tabela 4).

Tabela 4 – Período de indução (horas) dos óleos de coco extravirgem

	Marca 1	Marca 2	Marca 3
Lote A	40,68	17,56	27,91
Lote B	30,74	17,35	23,85
Lote C	38,54	17,56	25,82
Média	39,65 ^a ± 5,23	17,49 ^c ± 0,12	25,86 ^b ± 2,03

**Médias seguidas por letra minúscula nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade*

O elevado conteúdo de gorduras saturadas no óleo de coco propicia uma maior estabilidade oxidativa em comparação com outros óleos vegetais que apresentam majoritariamente ácidos insaturados (MATTHAUS. 1996). No trabalho de Kowalski e colaboradores (2004) foram encontrados períodos de indução muito inferiores aos determinados para os OCEVs, em óleos de canola, girassol e soja, sendo estes de 11,4h, 10,2h e 7,1h, respectivamente.

Gordon & Rahman (1991) avaliaram o efeito do processo de refino, na estabilidade oxidativa de óleo de coco pelo método Rancimat a 120 °C. Estes autores verificaram que uma menor concentração de compostos antioxidantes, tais como os tocoferóis e compostos fenólicos, ocasionada pelo processo de refino, gera uma menor estabilidade oxidativa destes óleos. Neste trabalho foi demonstrado que óleos de coco crus apresentam período de indução variando de 33,6 a 36,9h, valores muito superiores quando comparados aos encontrados no óleo de coco refinado (entre 4,2 e 8h).

Desta forma, é possível inferir que a diferença estatisticamente significativa entre os períodos de indução das diferentes marcas de OCEV provavelmente relaciona-se aos diferenciados processos de obtenção dos óleos, cujas condições influenciam significativamente no conteúdo de compostos antioxidantes, e, portanto, na estabilidade oxidativa dos produtos.

É possível observar que o índice de acidez (Tabela 3), que se trata de um parâmetro relacionado à degradação de óleos, é maior quanto menor é o tempo de indução. Desta forma é possível concluir que o índice de acidez relaciona-se inversamente à estabilidade oxidativa do OCEV.

4. CONCLUSÃO

Os OCEVs analisados não se adequaram aos PIQs elaborados pela APCC (2006) e pelo PNS (2007) em relação a muitos dos parâmetros físico-químicos determinados. Além disso, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as marcas comerciais de OCEVs no que se refere à composição de ácidos graxos e às propriedades físico-químicas analisadas, sendo que tal fato relaciona-se a uma falta de padronização dos processos de obtenção e armazenamento, justificada, em parte, pela inexistência de um documento legal para normatizar a obtenção do óleo de coco extravirgem, assim como suas respectivas características físico-químicas.

Conclui-se, portanto, que faz-se necessária a elaboração de um PIQ específico para óleos de coco extravirgem produzidos e comercializados no Brasil, a fim de regulamentar os parâmetros de caracterização físico-química deste produto, assim como as condições ideais de sua obtenção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4th ed. Champaign, USA, AOCS, 1990.

ASIAN AND PACIFIC COCONUT COMMUNITY (APCC), 2006. Disponível em: <http://www.apccsec.org/standards.htm> Acesso em: 21/04/2016.

ALMEIDA, J.K.P; NUNES, G.P; TEIXEIRA, C.C.M; RODRIGUES, D.P; MELLO, J.R. Caracterizações físico-químicas de óleos vegetais utilizados para produção e biodiesel com metodologias alternativas simples. XXXI ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. 2011, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: 2011.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353–, 380, 2001.

ARAUJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008. 596p.

BOSH, J.D.V-V.D; BERG, V-D.S.A; BIJLAN, S; VOSHOL, P.J; HAVEKES, L.M; ROMIJN, H.A. High-fat diets rich in medium- versus long-chain fatty acids induce distinct patterns of tissue specific insulin resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 366–371, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Aprova o regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, de 13 de outubro de 1999. Seção 1.

CALLADO, N. H; PAULA JR. Gerenciamento de resíduos de uma indústria de processamento de coco - estudo de caso. 19º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1999.

CASTELLO-BRANCO, V.; TORRES, A. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and associations with oil quality. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173–187, 2011.

CLEGG, M. E. Medium-chain triglycerides are advantageous in promoting weight loss although not beneficial to exercise performance. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 7, p. 653–679, 2010.

DAYRIT, F. M. et al. Quality characteristics of virgin coconut oil: Comparisons with refined coconut oil. **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 9, p. 1789–1799, 2011.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, v. 11, n. 1, p. 3–14, 1998.

GOPALA, K. A.G. ; RAJ, G; BHATNAGAR, A.S; KUMAR P. P.K; CHANDRASHEKAR, P. Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review. **Indian Coconut Journal**, p.15-27, 2010.

GORDON, M. H.; RAHMAN, I. A. Effect of processing on the composition and oxidative stability of coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 8, p. 574–576, 1991.

GRESSLER, C.C. **Efeitos da dieta hiperlipídica suplementada com óleos vegetais nos parâmetros metabólicos e inflamatórios em ratos wistar**. 2013, 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HAN J.R; DENG, B; SUN. J; CHEN, C.G; CORKEY, B.E; KIRKLAND, J.L; MA, J; GUOB, W. Effects of dietary medium-chain triglyceride on weight loss an insulin sensitivity in group of moderately overweight free-living type 2 diabetic Chinese subjects. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 56, p. 985-991, 2007.

HARTMAN, L & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, 1973.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo. 2004. 1032 p.

KHAN, M. I; ASHA, M.R; BHAT, K.K; KHATOON, S. Studies on quality of coconut oil blends after frying potato chips. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1165–1172, 2008.

KOWALSKI, B. et al. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 3, p. 165–169, 2004.

KUMAR, P. K. P.; KRISHNA, A. G. G. Physicochemical characteristics of commercial coconut oils produced in India. **Grasas Y Aceites**, v. 66, n. March, p. 1–11, 2015.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição Em Ácidos Graxos E Caracterização Física E Química De Óleos Hidrogenados De Coco Babaçu. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 463–470, 2006.

MANSOR, T. S. T. et al. Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, p. 837–845, 2012.

MARINA A.M.; CHE MAN Y.B.; NAZIMAH, S.A.H.; AMIN I. Chemical properties of virgin coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.86,n.4, p. 301–307, 2009a.

MARINA, A.M; CHE MAN, Y.B; AMIN, L. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 10, p. 481-487, 2009b.

MATTHAUS, B. W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by rancimat and conductivity and chemiluminescence measurements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 8, p. 1039–1043, 1996.

MENDONÇA, M.A; BORGIO, L.A; ARAUJO, W, M,C; NOVAES, M.R.C.G. Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo de fritura em unidades de produção de refeição no distrito federal. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 19, n.2, p.115-122, 2008. Paulo. 2004. 4ª edição. 1032p.

MORETTO, E; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 150p.

NEVIN, K.G; RAJAMOHAN, T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed SpragueDawley rats. **The European Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v.3, p.1-8, 2008.

PEIXOTO, E.R.M.; SANTANA, D.M.N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva – proposta para atualização a legislação brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 444-452, 1998.

PHILIPPINE NATIONAL STANDARD (PNS), 2007. Disponível em: http://www.cocoscience.com/pdf/vco_philippine_national_standard.pdf Acesso em: 21/04/2016.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 13ª ed. Piracicaba: Nobel,1999, 467 p.

PORTILLO, M. P; SERRA, F; SIMON, E; DEL BARRIO, A.S; PALOU, A. Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 22, n. 10, p. 974–9, 1998.

SANDI, A.L.S. **Diagnósticos de pontos críticos de contaminação microbiológica em uma agroindústria pedagógica**. 2010. 103f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, J.R.M; MARTINS, J.S; FREIRE, M.S; SILVA NETO, N; SILVA, T.N.S; SANTOS, J.C.O. Caracterização físico-química do óleo de coco obtido artesanalmente. 5º CONGRESSO NORTE NORDESTE DE QUÍMICA. 2013, Natal. *Anais...* Natal: 2013.

SÁYAGO-AYERDI, S.G; VAQUERO, M.P; SCHULTZ-MOREIRA, A; BASTIDA, S; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. **Nutricion Hospilaria**, v.23,n.3, p. 191-202, 2008.

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

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, 2009.

SILVA, S.A. **Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2015. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SUN, H; JIANG, T; WANG, S; BING, H; ZHANG, Y; PIAO, D; YU, C; HAN, P. The effect of LXR *alfa*, ChREBP and Elovl6 in liver and white adipose tissue on medium- and long-chain fatty acid diet-induced insulin resistance. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 102, n. 3, p. 183–192, 2013

THIEME, J. G. **La industria del aceite de coco**. Roma: FAO, 1970. 267p.

TODE FILHO, S. et al. Deterioração de óleos vegetais expostos a diferentes condições de armazenamento. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**, v. 18, n. 2004, p. 7–13, 2014.

TURNER, N. HARIHARAN, K; TIDANG, J; FRANGIOUDAKIS, G; BEALE, S.M; WRIGHT, L; ZENG, X.Y; LI, J-Y; KRAEGEN, E.W; COONEY, G.J; YE, J-M. Enhancement of Muscle Mitochondrial Oxidative Capacity and Alterations in Insulin Action Are Lipid Species Dependent. **Diabetes**, v. 58, n p. 2547–2554, 2009.

ZAKARIA, Z.A; AHMAD, Z; SOMCHIT, M. N; ARIFAH, A. K; KHAIRI, H. M; SULAIMAN, M. R ; TEH, L. K; SALLEH, M. Z; LONG, K. Antihypercholesterolemia property and fatty acid composition of mardi-produced virgin coconut oils. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.4, n.9, p. 636-644, 2010.

ZAMBIAZI, R. C; PRZYBYLSKI, ZAMBIAZI, M.W; MENDONÇA, C.B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111–120, 2007.

ZHANG, Y. et al. Medium-Chain Triglyceride Activated Brown Adipose Tissue and Induced Reduction of Fat Mass in C57BL/6J Mice Fed High-fat Diet. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 28, n. 2, p. 97–104, 2015.

CAPÍTULO 2 - QUANTITATIVE ANALYSIS OF ACIDITY LEVEL IN VIRGIN COCONUT OILS BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRICS

Artigo publicado em: 20/12/2015

Zicker, M. C., Craig, A. P., de Oliveira Ramiro, D., Franca, A. S., Labanca, R. A. and Ferreira, A. V. M. Quantitative analysis of acidity level in virgin coconut oils by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 118: 1350-1357, 2016. doi: 10.1002/ejlt.201500407.

European Journal of
Lipid Science and Technology



Research Article

Quantitative analysis of acidity level in virgin coconut oils by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics

[Marina Campos Zicker](#), [Ana Paula Craig](#), [Déborah de Oliveira Ramiro](#),

[Adriana S. Franca](#) ✉, [Renata Adriana Labanca](#), [Adaliene Versiane Matos Ferreira](#)

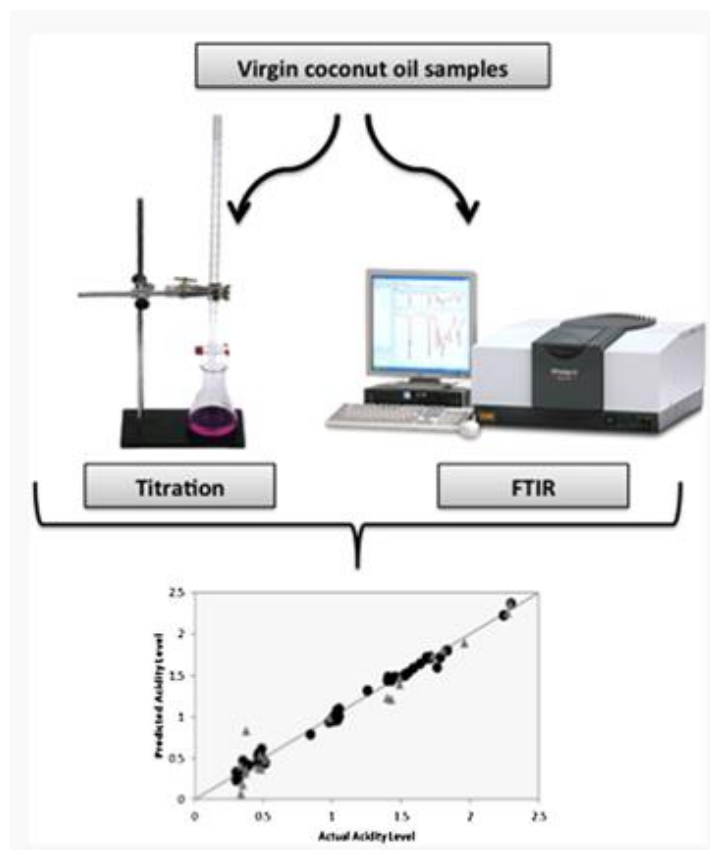
First published: 20 December 2015 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/ejlt.201500407 [View/save citation](#)

Abstract

The quality of virgin coconut oil (VCO), together with its health functionalities, is directly related to its freshness and to the levels of free fatty acids (FFA). Thus, the goal of this work was to develop a quantitative model based on partial least squares regression (PLSR) to predict FFA levels (%) in VCO. A total of 72 Brazilian commercial samples classified in accordance to their shelf life was analyzed. FFA levels ranged from 0.3 to 2.3%. FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) spectra were recorded within a range of 3100 to 680 cm^{-1} and submitted to mathematical preprocessing. Quantitative models were developed by partial least squares regression (PLSR). Excellent predictive results were obtained, indicating that the FFA levels in VCO could be accurately quantified by FTIR. The correlation coefficient (R) and the root mean squared error of prediction (RMSEP) were, respectively, as high as 0.994 and as low as 0.07.

Practical applications: According to international standards, acid-base titration is the reference method for the determination of FFA in oils. This method is laborious and time-consuming, uses toxic and flammable solvents and it is susceptible to error when detecting the color change of the indicator. Some of the advantages of FTIR over the official acid-base titration method are the short time and simplicity of analysis. Besides that, it is non-destructive and it does not require hazardous solvents and reagents. The results shown in this study indicate that FTIR spectroscopy and chemometrics can be successfully applied to the quantitative evaluation of FFA in VCO.



The quality of virgin coconut oil (VCO), together with its health functionalities, is directly related to its freshness and to the levels of free fatty acids (FFA). Acid-base titration is the reference method for the determination of FFA in oils. This method is laborious and time-consuming, uses toxic and flammable solvents and it is susceptible to error when detecting the color change of the indicator. FTIR is a rapid, non-destructive, and accurate technique that could overcome some of the drawbacks of titration methodologies and could be easily implemented in routine quality control laboratories. The results shown in this study indicate that FTIR spectroscopy and chemometrics can be successfully applied to the quantitative evaluation of FFA in VCO.

Abbreviations

ATR

attenuated total reflectance

AV

acid value

DLATGS

deuterated triglycine sulfate doped with L-alanine

FFA

free fat acid

FTIR

Fourier transform infrared spectroscopy

LV

latent variable

PLSR

partial least squares regression

R

correlation coefficient

RMSEC

root mean square error of calibration

RMSECV

root mean square error of cross validation

RMSEP

root mean square error of prediction

RPD

ratio of natural variation in the calibration or validation samples to the probable errors occurring during the prediction

SEL

standard error of the laboratory

SNV

standard normal variate

VCO

virgin coconut oil

VIP

variable importance in the projection

1 Introduction

Virgin coconut oil (VCO) is obtained from the fresh and mature coconut kernel, in general 12 months after pollination of the coconut (*Cocos nucifera* L.). The oil can be extracted by mechanical or natural means with or without the application of heat. No chemical refining, bleaching, or deodorizing is applied [1]. Particularly, VCO has become largely popular in the scientific community and among consumers due to its biologically active components with potential health benefits such as vitamin E, polyphenols, and phytosterols [2, 3]. These components have been associated with antioxidant properties, anti-inflammatory activity, lipid-lowering and antithrombotic effects [3, 4]. Furthermore, unlike the majority of oils and animal fat, VCO consists mainly of medium chain triglycerides, which have been associated with weight loss and improved glycemic profile [2]. Such benefits, however, become less effective with the oil degradation [1, 5].

FFA are naturally formed in vegetable oils during extraction and storage by hydrolysis through chemical or enzymatic mechanisms. The acid value (AV) of edible vegetable oils, which measures the amount of FFA, is an important indicator of the quality of the oil during processing and storage [6]. This determination is based on acid-base titration employing a non-aqueous solvent. Titration-based methodologies have a number of drawbacks, including the use of toxic and flammable non-aqueous solvents, the incomplete solubility of VCO in the employed solvents, and the susceptibility to error in the detection of changes in the indicator color [7]. Furthermore, this technique is laborious and time-consuming.

An example of rapid, non-destructive, and accurate technique that could overcome some of the drawbacks of titration methodologies and could be easily implemented in routine quality control laboratories is infrared spectroscopy. In particular, much attention has been given to Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, which detects fundamental molecular vibrations as a result of molecular absorption of mid-infrared radiation [8]. Many studies have shown that these techniques in association with multivariate statistics can be successfully applied to the analysis of edible oils [9]. FTIR has been applied to the monitoring of fatty acid composition [10], determination of geographical origin [11], classification based on sensory attributes [12], detection of adulteration [13], and degradation studies [14].

While a wide range of studies in the literature reports the applications of FTIR to copra oil analysis [15-17], studies on the analysis of VCO are scarce in the literature and focused on the detection of adulteration and monitoring of oxidative stability [13, 18]. Thus, the aim of this work was to investigate the potential of FTIR to evaluate the quality of commercial VCOs. The major goal was to develop a quantitative model based on partial least squares regression (PLSR) to predict the levels of FFA in VCO.

2 Materials and methods

2.1 Coconut oil samples

A total of 72 Brazilian commercial samples of VCO (four commercial brands) were purchased from supermarkets in Belo Horizonte – Minas Gerais (Brazil) and analyzed. Samples were classified in accordance to their expiration date, based on the shelf life indicated in the labels, 18 months. Samples were separated as follows: (i) 32 oil samples that were deemed appropriate for consumption (aged up to 18 months from the production date), comprising Brand 1 ($n = 1$), considered a fresh sample (2 months age), Brand 2 ($n = 25$) and Brand 3 ($n = 6$); (ii) 40 oil samples that were deemed expired, aged from 19 up to 30 months from the production date, comprising Brand 2 ($n = 6$), Brand 3 ($n = 4$), and Brand 4 ($n = 30$). Before analysis, the samples were stored in the freezer (-20°C) and wrapped in aluminum foil to avoid photo degradation.

2.2 Chemical analysis

The acid value (%), which is an indicative of the FFA content of the oil, was determined following the procedure established by AOCS (Official Method Ca-5a40) [19]. A 2 g sample was mixed with diethyl ether/ethanol 2/1(v/v) in a 250 mL Erlenmeyer flask and a few drops of phenolphthalein were added. The mixture was titrated with 0.01 M NaOH until color change (from white to pink). Samples were analyzed in duplicate.

2.3 FTIR measurements and spectral collection

A Shimadzu IRAffinity-1 FTIR Spectrophotometer (Shimadzu, Japan) with a DLATGS (deuterated triglycine sulfate doped with L-alanine) detector was used in the FTIR measurements that were performed in dry atmosphere ($20 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). A horizontal attenuated total reflectance (ATR) sampling accessory (ATR-8200HA) equipped with ZnSe cell was employed. Approximately, 10 μL of each sample were placed in the sampling accessory. The empty accessory was used to obtain the background spectrum. The approximate total time required for spectral collection was 5 min. All spectra were recorded within a range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, with a 4 cm^{-1} resolution. Each spectrum was calculated as the average of 20 scans and submitted to background subtraction. They were also truncated the range of $3200\text{--}680\text{ cm}^{-1}$, in order to eliminate noise readings present in the upper and lower ends of the spectra.

2.4 Data analysis

2.4.1 Chemical analysis

The statistical software Graph Pad Prisma (version 5.01, Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA) was used to analyze the chemical data. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were applied to compare different commercial brands and t -test was applied to compare the FFA values of samples from the same brand (expired or not).

The standard error of the laboratory (SEL) was estimated from the FFA duplicate data using the following equation [20]:

$$\text{SEL} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_{i1} - y_{i2})^2}}{n} \quad (1)$$

where n is the number of samples and y_{i1} and y_{i2} are values obtained for the replicates 1 and 2, respectively, of sample i .

2.4.2 FTIR measurements and spectral collection

Data processing (pretreatment) techniques were applied to the raw data to compensate for any changes in experimental conditions and enhance the results. The processing methods employed were the following: SNV, first and second derivatives. All data sets were mean centered prior to statistical analyses. The softwares Matlab (MathWorks, Co., Natick, MA) and the computational package PLSR_Toolbox (Eigenvector Research, Inc.) were employed for the processing calculations and model development.

PLSR was the technique of choice for the quantification of FFA. Samples were randomly separated into calibration (80%) and validation (20%) sets. The optimum number of latent variables (LV) employed in each model was chosen by leave-one-out cross-validation based on the minimum value of root mean square error for cross validation (RMSECV). The combination of Q -residues and the Hotelling's T -squared distribution (T^2) were used to detect abnormal observations in the calibration set. Given the significance level for the Q and T^2 statistics, in this case, 99% observations with Q and/or T^2 values above the threshold were classified as outliers. After the elimination of the outlier observations from the model, the procedure was continually repeated until no outliers were identified. The random behavior of the residuals of the fits was verified by visual inspection. The evaluation of the accuracy of the models was based on the following parameters: the correlation coefficient (R), that should be as close to 1 as possible; and the root mean square errors for both the calibration (RMSEC) and validation (RMSEP) sets, which should be as small as possible.

Other figures of merit explored in the final optimized FTIR method were bias and relative prediction deviation (RPD). Bias evaluates the presence of systematic errors in the model and is calculated only in the validation set. Ideally the bias should be close to zero. The RPD is the ratio of natural variation in the calibration or validation samples to the probable errors occurring during the prediction. This figure is calculated for the calibration and validation sets according to Eq. (2), where RMSE is the root mean square error of calibration or validation and SD is the standard deviation of the reference values in the calibration or validation sets [21].

$$\text{RPD} = \text{SD}/\text{RMSE} \tag{2}$$

3 Results and discussion

3.1 Chemical analysis

The FFA values obtained in this study are shown in Table 1. According to the APCC (Asian Pacific Coconut Community), FFA values in VCO should not exceed 0.20% [19]. Figure 1 shows the values obtained for samples classified as appropriate for consumption ranged from 0.38 to 1.83%, while the values obtained for expired samples ranged from 0.30 to 2.30%. Thus, none of the samples analyzed met the 0.20% limit recommended by the APCC.

Table 1. FFA (%) of virgin coconut oil samples

	Appropriate for consumption			Expired		
	Brand 1* (n = 1)	Brand 2 (n = 25)	Brand 3 (n = 6)	Brand 2 (n = 6)	Brand 3 (n = 4)	Brand 4 (n = 31)
Mean	0.38 ^c	1.58 ^a	0.87 ^b	1.93 ^a	1.03 ^b	0.42 ^c
SD	n.a.	0.08	0.37	0.71	0.02	0.12
Min	n.a.	1.26	0.32	0.51	1.01	0.30
Max	n.a.	1.83	1.05	2.30	1.05	0.98

Means followed by different letters are significantly different (Tukey $p < 0.05$).
* Fresh sample aged 2 months from the production date.

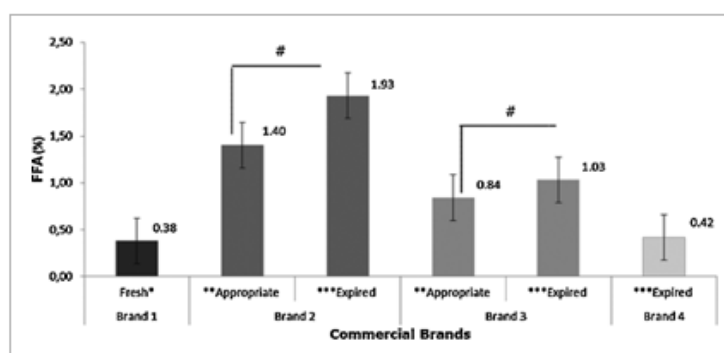


Figure 1.

Average of FFA from each commercial brand of VCO samples classified as appropriate for consumption or expired. *Fresh sample within 2 months from the production. **Appropriate, aged up to 18 months from production date. ***Expired, aged from 19 to 30 months after the production date. #Means differ among themselves by the Tukey test ($p < 0.05$).

Results of Tukey test indicated that the FFA content in the samples differed statistically ($p < 0.05$) among brands, regardless of the sample being expired or not. The fact that the FFA content differed statistically according to commercial brands could be related to the distinct VCO extraction methods employed in Brazil. These methods can be divided into wet (subdivided into chilling and thawing, fermentation, enzymatic, and pH method, or any of these in combination) and dry, when the kernel is heated to remove the moisture and pressed mechanically to obtain the oil [2].

Previous studies have demonstrated the influence of the extraction method on the overall physicochemical properties of VCO [22]. Dayrit and coworkers [6] evaluated the FFA content (mg KOH/g oil) of VCO extracted by chilling, fermentation, fresh-dry and enzymatic methods and found, respectively, the following values: 0.31, 0.29, 0.46, and 0.35%. In the study by Marina et al. [23], the FFA values for the different commercial brands of VCO available in the Malaysian and Indonesian markets ranged from 0.15 to 0.25% [23]. More recently, Balawan [24] compared the FFA levels in VCO produced by fresh-wet natural fermentation versus high or low-pressure expeller. The values ranged, respectively, from 0.33 to 0.38% to 0.05 to 0.08% and 0.10 to 0.20%. Studies reporting the FFA content in Brazilian VCO are scarce in the literature, but Silva et al. [25] and Santos et al. [26] reported FFA values of 0.84%, whereas Abreu et al. [27] reported a FFA value of 1.81%. These levels are considerably high in comparison to the ones reported in previous studies [6, 23, 24]. This discrepancy could be attributed to several differences, from the coconut cultivation to the oil extraction and storage.

Besides the significant difference in the FFA levels of VCO according to brand, it was observed that the increase in the storage time resulted in a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the FFA levels of Brands 2 and 3, as indicated in Fig. 1. The formation of FFA by hydrolytic rancidity, that is hydrolysis of an ester by lipase or moisture is, in fact, an important measure of rancidity in oils and can be a good parameter of storage stability. In the study by Srivastava et al. [28], the FFA levels of VCO samples stored at room temperature during 0, 6, and 12 months was found to increase from 0.05 to 0.19 and then to 0.23%, respectively. Ankrah [29] evaluated how the levels of FFA changed in two brands of coconut oil stored under ambient conditions. Samples were monitored monthly during a 3-month period. The FFA levels increased from 0.20 to 0.60% in Brand A, and from 0.20 to 0.80% in Brand B.

3.2 Overall characteristics of the FTIR spectra of virgin coconut oil

Figure 2 shows the average original spectra of VCO obtained by FTIR. Major peaks were observed at 2940, 2922, 2852, 1743, and at 1480–700 cm^{-1} . The bands at 2940 and 2820 cm^{-1} are assigned to symmetric and asymmetric stretching of CH bonds in CH_2 and CH_3 groups, respectively. The sharp band at 1743 cm^{-1} is assigned to C=O stretching in aliphatic ester groups. Ester groups vibrations were also observed at the peak 1230 cm^{-1} , assigned to C(=O)—O stretching, and at the peaks at 1153 and 1110 cm^{-1} , assigned to C—O and C—C stretching vibration in esters. The bands at 1465 and 1377 cm^{-1} arise from the symmetric and asymmetric scissoring of C—H in CH_2 and CH_3 , respectively. The small peak at 721 cm^{-1} corresponds to CH_2 rocking mode [30]. The overall spectra profile of the samples obtained in this study is very similar to the ones reported in the literature [13, 31]. The major difference between the spectra of VCO in relation to other edible oils such as sunflower, palm, corn, and sesame oil is the absence of a peak at 3003–3008 cm^{-1} . This peak occurs due to trans =C—H stretching [13, 31]. Another difference can be noted at the region 1120–1098 cm^{-1} , where VCO exhibits a strong peak while other edible oils such as corn and sunflower oils, exhibit two peaks, that is, one at 1098 cm^{-1} and other at 1120 cm^{-1} [13]. Sim and Ting [31] also observed a peak at 958 cm^{-1} in the spectra of a variety of oils, such as palm, sesame, sunflower, canola, and blended cooking oil, but did not observe the same in the spectra of coconut oil. This peak is attributed to the presence of trans-olefins where polyunsaturated and monounsaturated oils exhibit higher intensities. According to Yoshida and Yoshida [32], the trans-olefins may be produced during the heating of oils in the purification process.

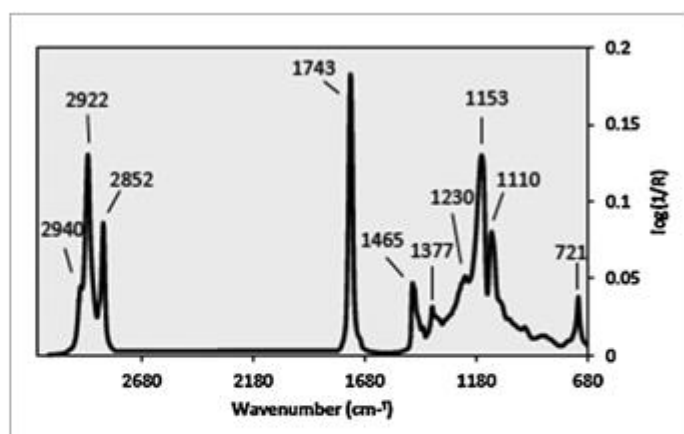


Figure 2.

Mean average FTIR spectra obtained for coconut oil.

3.3 PLSR models for the prediction of acidity level

PLSR models were constructed using the spectral data obtained from 72 samples of coconut oil. The region between 2800 and 1800 cm^{-1} was not included in the development of the models, given that in edible oils no functional group is generally expected to absorb in this region (see Fig. 2). The calibration and validation sets consisted of 80 and 20% of samples, respectively. The results obtained in the PLSR models based on the full-spectrum approach and employing different preprocessing techniques are presented in Table 2.

Table 2. Performance results of full spectrum PLSR models based on different data preprocessing techniques

Model	Preprocessing (variance explained %)	LV	RMSEC	R	RMSEP	R
(1)	None (88.44)	5	0.20	0.88	0.29	0.83
(2)	SNV (99.63)	12	0.04	0.99	0.13	0.97
(3)	SNV + first der (97.31)	7	0.09	0.97	0.14	0.96
(4)	First der (95.06)	6	0.13	0.95	0.21	0.92
(5)	Second der (86.97)	5	0.22	0.87	0.22	0.91
(6)	SNV + Second der (83.90)	3	0.24	0.84	0.28	0.84

Bold in Table refer to the models that were considered to present best performance.

The model constructed without preprocessing (only mean centering, which was applied to all datasets), as well as the model constructed with SNV plus second derivative were not considered satisfactory due to their large RMSEC and RMSEP (root mean square error of prediction) and small R -values. The preprocessing treatments that provided significant improvements in the model performance in both calibration and validation sets, that is, decrease in RMSEC and RMSEP values coupled with an increase in R -values were the following: SNV and SNV followed by first derivative. Although the first exhibited lower RMSEC and RMSEP values and higher R -values, the number of latent variables (LV) was significantly higher. The LV selection for each model was based on the smallest value of RMSECV. In reference to the American Society for Testing Material [33], the determination of the number of LVs is a critical step in the model development. In general, if too few variables are used, a less accurate model will result. If too many variables are used, the estimates from the model will be unstable, which means that small changes in the spectrum, on the order of the spectral noise, may produce statistically significant changes in the estimates. Thus, models with fewer factors are less likely to exhibit over fitting and tend to have better generalization ability. Although the model constructed with SNV solely exhibited higher performance, the high number of LV employed suggests an over fitting and low robustness. The model constructed with SNV plus first derivative (Fig. 3) was therefore chosen as the most appropriate among the preprocessing schemes evaluated.

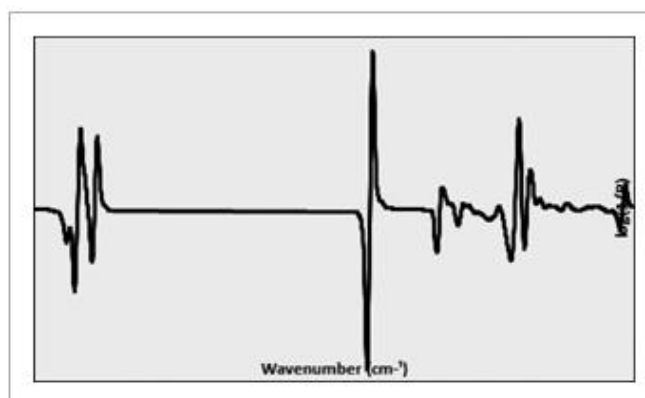


Figure 3.

Mean average spectra of coconut oil obtained by FTIR submitted to SNV and first derivative.

The plot of the variable importance in the projection (VIP) scores of the model (Fig. 4) was evaluated to verify the feasibility of improving its predictive ability. The evaluation of VIP scores is a useful and simple strategy tool to evaluate the importance of each variable or spectral wavenumber in the PLSR model and can be used for the selection of potential spectra regions [34]. The regions that mostly affect the model performance are those with higher VIP scores. In this case, the regions that contributed the most were the following: 2970–2840, 1790–1690, 1460–1380, and 1190–1050 cm^{-1} . These regions have been previously reported in the literature as important predictors for the determination of iodine values and for the quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils including coconut oil [15, 17] and detection of adulteration in VCO [13]. The PLSR models were then rebuilt using the spectral regions with VIP scores higher than 1, as indicated in Table 3. In comparison to the full spectrum model, the selection and combination of specific regions improved model performance, with the exception of Models 7 and 9. The choice of the optimum PLSR model was based on the combination of low RMSEC and RMSEP, high R , and low number of LV. Considering these three parameters, Model 5 was chosen and subjected to optimization by the detection and elimination of outliers. Particularly, this model includes all regions of the spectrum with high VIP scores, with the exception of the first region, that is, 2970–2840 cm^{-1} .

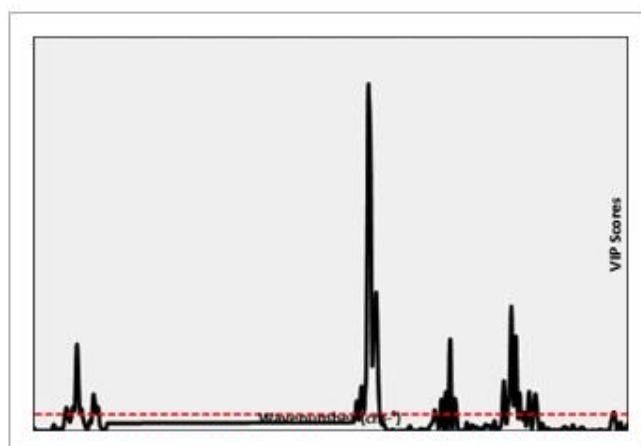


Figure 4.

VIP scores of the full-spectrum (3100-2800/1800-680 cm^{-1}) PLSR model based on SNV followed by first derivative spectra. VIP = 1.

Table 3. Performance results of PLSR models based on different spectral regions

	Model Region (cm^{-1})	LV	RMSEC	R	RMSEP	R
(1)	3100-2800/1800-1035	7	0.10	0.97	0.14	0.96
(2)	1797-1035	10	0.05	0.99	0.05	0.96
(3)	1797-1670/1527-1035	10	0.06	0.99	0.05	0.96
(4)	2991-2800/1800-1681/1479-1365/1211-1035	12	0.06	0.98	0.11	0.99
(5)	1778-1670/1527-1350/1220-1035	9	0.06	0.99	0.08	0.99
(6)	2991-2800/1800-1035	13	0.04	0.99	0.04	0.98
(7)	2991-2800/1800-1681/1479-1365	6	0.15	0.94	0.27	0.87
(8)	2991-2800/1800-1365	10	0.07	0.99	0.07	0.98
(9)	2991-2800/1800-1681	6	0.16	0.93	0.29	0.83

Bold in Table refer to the models that were considered to present best performance.

Outlier detection and removal in the calibration and validation sets were performed at 99% confidence level. In this scenario, the presence of outliers can be related to operational errors, instrumental noise, or abnormal observations originated from errors or differences during the sample preparation. Only one round of outlier detection was performed. Samples selected as outliers at the plot of leverage versus Student *t*-residues (Fig. 5a) included those selected at the Hotelling's *T*-squared distribution versus *Q*-residues plot (Fig. 5b). A total of six outliers (five calibration, one validation), corresponding to 8.3% of the total number of samples, were removed.

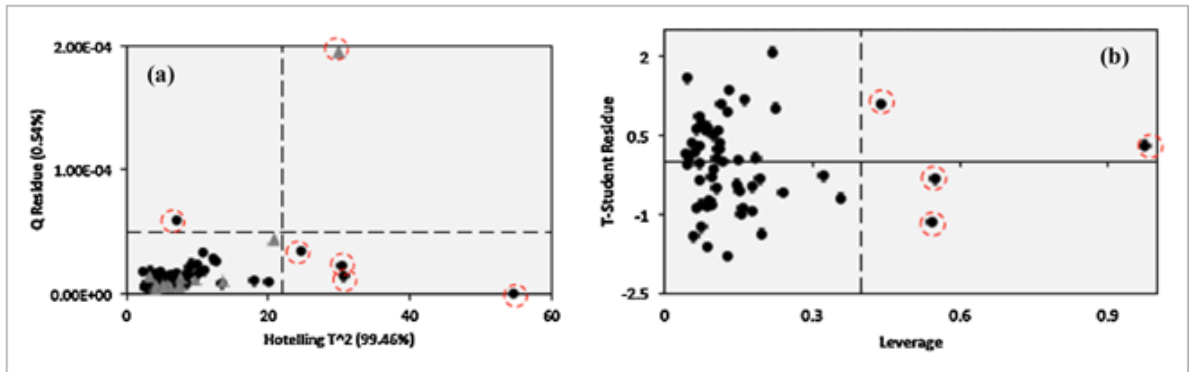


Figure 5.

Outlier removal strategy based on (a) Hotelling's *T*-squared distribution versus *Q*-residues plot and (b) leverage versus Student- *t*-student residues plot (● calibration samples; ▲ validation samples).

The scatter plots of measured and predicted values for the acidity levels are shown in Fig. 6a. A visual inspection of the plots suggests that the models could predict the acidity levels with accuracy. The residuals, which were plotted versus sample acidity level values, were distributed randomly and satisfactorily close to zero, indicating no apparent systematic trend (Fig. 6b).

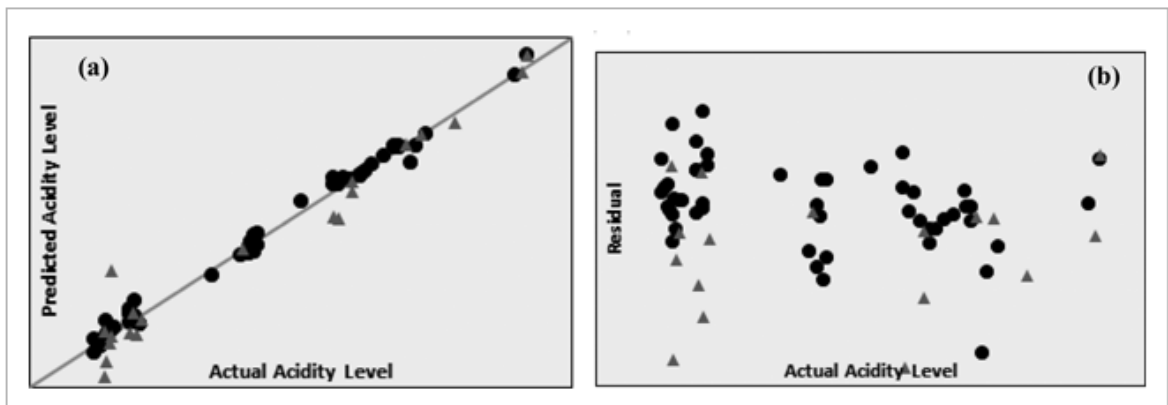


Figure 6.

(a) Measured versus predicted levels of acidity (%), and (b) residual versus levels of acidity (%) in virgin coconut oil, based on the optimized PLS model (1778-1670/1527-1350/1220-1035 cm^{-1}) after outlier removal (● calibration samples; ▲ validation samples).

Table 4 summarizes the figures of merit estimated for the proposed FTIR method. The optimized PLSR model for prediction of FFA level in VCO was constructed with 51 calibration and 14 validation samples, 9 LVs, and accounted for 98 and 99.28% of the variance in X (spectral data) and Y (level of FFA), respectively. The number of LV (9) was maintained. After the removal of outliers, the RMSEC and RMSEP decreased, respectively, from 0.06 and 0.08 to 0.05 and 0.07. The SEL associated with the FFA analysis of the reference samples was estimated as 0.029. A model with SEC and SEP values lower than three X SEL, which is the case of the model developed in this study, is generally considered of good precision [20].

Table 4. Figures of merit of the optimized FTIR method for the determination of FFA levels in VCO

Figure of merit	Parameter	Estimated value
SEL		0.029
Trueness	RMSEC	0.05
	RMSEP	0.07
Linearity	Slope ^a	0.99
	Intercept ^a	0.01
	Correlation coefficient ^a	0.99
Working range	Working range calibration	0.30–2.30%
	Working range validation	0.34–2.30%
	Mean calibration	0.95%
	Mean validation	1.02%
Bias		-0.05
RPD	RPD calibration	11.78
	RPD validation	10.97
a Values for the line fitted to the calibration samples.		

The linearity was estimated through the fit of reference versus predicted values. The R of calibration and validation sets increased, respectively, from 0.988 and 0.992 to 0.993 and 0.994, in the optimized final model. The estimated bias was as low as -0.05 in the validation set. The RPD metrics is used to classify the overall prediction quality of individual calibration models. According to Dingari et al. [35], a RPD value higher than 5 is considered to be good for quality control while a value larger than 6.5 is acceptable for process monitoring. The RPD values obtained in the present study (Table 4) were considered excellent.

4 Conclusion

The values of FFA obtained for samples within 18 months from the production ranged from 0.38 to 1.83%, while the values obtained for samples within 19–30 months from the production ranged from 0.30 to 2.3%. None of the samples analyzed met the FFA limit recommended by APCC for VCO (0.2%). The FFA values of VCO from different brands varied significantly. When analyzing FFA values of single brands, significant higher values were observed in samples stored for a longer period. FTIR in combination with PLSR were successfully applied for the quantitative prediction of FFA in VCO. The correlation coefficient and the RMSEP for the model developed and optimized in this study were, respectively, as high as 0.99 and as low as 0.07.

The authors acknowledge financial support from the Brazilian Government Agencies CNPq, CAPES, and FAPEMIG.

The authors have declared no conflicts of interest.

References

- 1 MARDI (Malaysian Agricultural Research and Development Institute), 2010. "Asian and Pacific Coconut Community." Retrieved 06/11/2011, 2011, from <http://www.apccsec.org/MALAYSIA.HTM>. Accessed Dez 2014.
- 2 Marina, A. M., Che Man, Y. B., Amin, L., Virgin coconut oil: Emerging functional food oil. *Trends Food Sci. Tech.* 2009, **20**, 481–487.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 37](#)
- 3 Nevin, K. G., Rajamohan, T., Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed *Sprague Dawley* rats. *E Spen Eur. E J. Clin. Nutr. Metab.* 2008, **3**, 1–8.
[CrossRef](#)
- 4 Vysakh, A., Ratheesh, M., Rajmohan, T. P., Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. *Int. Immunopharmacol.* 2014, **20**, 124–130.
[CrossRef](#) | [PubMed](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 9](#)
- 5 Hamsi, M. A., Othman, F., Das, S., Kamisah, Y., Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in *Sprague Dawley* rats. *Alexandria Med. J.* 2015, **51**, 53–63.
[CrossRef](#) | [Web of Science® Times Cited: 2](#)
- 6 Dayrit, F., Buenafe, O. E., Chainani, E., de Vera, I. M., Standards for essential composition and quality factors of commercial virgin coconut oil and its differentiation from RBD coconut oil and copra oil. *Philipp. J. Sci.* 2007, **136**, 121–131.
- 7 Kardash, E., Turyan, Y. I., Acid value determination in vegetable oils by indirect titration in aqueous-alcohol media. *Croat. Chem. Acta* 2005, **78**, 99–103.
[Web of Science® Times Cited: 16](#)
- 8 Larkin, P., *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, Amsterdam 2011.
- 9 Franca, A. S., Oliveira, L. S., in: Siegler, B. C. (Ed.), Potential uses of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in food processing and engineering, Food Engineering. Nova Publishers, New York, NY (USA) 2011.
- 10 Maggio, R. M., Kaufman, T. S., Del Carlo, M., Cerretani, L., Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chem.* 2009, **114**, 1549–1554.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 76](#)
- 11 Hennessy, S., Downey, G., O'Donnell, C. P., Confirmation of food origin claims by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics: Extra virgin olive oil from Liguria. *J. Agr. Food Chem.* 2009, **57**, 1735–1741.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 32](#)

- 12 Sinelli, N., Cerretani, L., Egidio, V. D., Bendini, A., Casiraghi, E., Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food Res. Int.* 2010, **43**, 369–375.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 61](#)
- 13 Rohman, A., Che Man, Y. B., The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil. *Food Chem.* 2011, **129**, 583–588.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 31](#)
- 14 Climaco Pinto, R., Locquet, N., Eveleigh, L., Rutledge, D. N., Preliminary studies on the mid-infrared analysis of edible oils by direct heating on an ATR diamond crystal. *Food Chem.* 2010, **120**, 1170–1177.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 16](#)
- 15 Hendl, O., Howell, J. A., Lowery, J., Jones, W., A rapid and simple method for the determination of iodine values using derivative Fourier transform infrared measurements. *Anal. Chim. Acta* 2001, **427**, 75–81.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 22](#)
- 16 Verleyen, T., Verhé, R., Cano, A., Huyghebaert, A., De Greyt, W., Influence of triacylglycerol characteristics on the determination of free fatty acids in vegetable oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001, **78**, 981–984.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 14](#)
- 17 Christy, A. A., Egeberg, P. K., Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* 2006, **82**, 130–136.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 27](#)
- 18 Rohman, A., Man, Y. B. C., Potential use of FTIR-ATR spectroscopic method for determination of virgin coconut oil and extra virgin olive oil in ternary mixture systems. *Food Anal. Method.* 2011, **4**, 155–162.
[CrossRef](#) | [Web of Science® Times Cited: 18](#)
- 19 Firestone, D., Official Methods and Recommended Practices of the AOCS: Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils (AOCS Method Ca 5a-40). American Oil Chemists Society, Champaign, IL (USA) 2009.
- 20 Urbano-Cuadrado, M., de Castro, M. L., Pérez-Juan, P. M., García-Olmo, J., Gómez-Nieto, M. A., Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology: Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines. *Anal. Chimica Acta* 2004, **527**, 81–88.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 89](#)
- 21 Botelho, B. G., Mendes, B. A., Sena, M. M., Development and analytical validation of robust near-infrared multivariate calibration models for the quality inspection control of mozzarella cheese. *Food Anal. Method.* 2013, **6**, 881–891.
[CrossRef](#) | [Web of Science® Times Cited: 10](#)

- 22 Mansor, T. S. T., Che Man, Y. B., Shuhaimi, M., Abdul Afiq, M. J., Ku Nurul, F. K. M., Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. *Int. Food Res. J.* 2012, **19**, 837–845.
- 23 Marina, A. M., Che Man, Y. B., Nazimah, S. A. H., Amin, I., Chemical properties of virgin coconut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009b, **86**, 301–307.
[CrossRef](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 42](#)
- 24 Balawan, D. D., Processing Manual for Virgin Coconut Oil, its Products and By-Products for Pacific Island Countries and Territories. Secretariat of the Pacific Community, Noumea (New Caledonia) 2011.
- 25 Silva M. A. S., Araujo A. G., Xavier A. F. S., Santos L. F. S., et al., Proposta de uma nova técnica para extração de óleos vegetais. Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, 19–21 October, Palmas (Brazil) 2012; <http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/1062/1141>
- 26 Santos J. R. M., Martins J. S., Freire M. S., Neto N. S., et al., Caracterização físico-química do óleo de coco obtido artesanalmente. Congresso Norte Nordeste de Química, 8–12 April, Natal (Brazil) 2013; <http://annq.org/eventos/upload/1362501330.pdf>
- 27 Abreu, M. G. P., Tavella, L. B., Ferreira, J. B., Araujo, M. L., Araujo, J. M., Potencial Fungitóxico dos óleo de Marmuru (*Astrocaryum ulei* Mart.) e coco (*Cocos nucifera* L.) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* no maracujá. *Enciclopédia Biosfera* 2014, **10**, 1515–1525.
- 28 Srivastava, Y., Semwal, A. D., Sharma, G. K., Studies on storage stability of hot extracted (HEVCO) and cold extracted virgin coconut oil (CEVCO) in different flexible and rigid packaging system. *Int. Food Res. J.* 2013, **20**, 1971–1976.
- 29 Ankrah, E. K., Shelf life studies of oil samples of coconut (*Cocos nucifera*) in Ghana. *Ghana Jnl Agric. Sci.* 1998, **31**, 127–129.
- 30 Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., Spectrometric Identification of Organic Compounds. Hoboken: John Wiley & Sons, Michigan (USA) 2005.
- 31 Sim, S. F., Ting, W., An automated approach for analysis of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra of edible oils. *Talanta* 2012, **88**, 537–543.
[CrossRef](#) | [PubMed](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 8](#)
- 32 Yoshida, S., Yoshida, H., Nondestructive analyses of unsaturated fatty acid species in dietary oils by attenuated total reflectance with Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 2003, **70**, 604–613.
[Wiley Online Library](#) | [PubMed](#) | [CAS](#) | [Web of Science® Times Cited: 16](#)
- 33 ASTM, Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis-E1655-05, ASTM International, West Conshohocken, PA (USA) 2005.
- 34 Oussama, A., Elabadi, F., Platikanov, S., Kzaiber, F., Tauler, R., Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy and PLS with variable importance of projection (VIP) scores. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012, **89**, 1807–1812.

- 35 Dingari, N. C., Barman, I., Kang, J. W., Kong, C. R., Wavelength selection-based nonlinear calibration for transcutaneous blood glucose sensing using Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2011, **16**, 087009–087009.

[CrossRef](#) | [PubMed](#) | [CAS](#) | [Web of Science®](#) Times Cited: 19 | [ADS](#)

CAPÍTULO 3 – VIRGIN COCONUT OIL IS EFFECTIVE TO TREAT METABOLIC AND INFLAMMATORY DYSFUNCTION INDUCED BY HIGH REFINED CARBOHYDRATE-CONTAINING-DIET IN MICE

Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice

Marina Campos Zicker^a, Ana Letícia Malheiros Silveira^b, Débora Romualdo Lacerda^a, Débora Fernandes Rodrigues^a, Cíntia Tarabal Oliveira^a, Leandro Ceotto Freitas Lima^c, Sérgio Henrique Sousa Santos^d, Mauro Martins Teixeira^b, Adaliene Versiani Matos Ferreira^{e*}.

^a *Department of Food Science, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

^b *Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

^c *Department of Morphology, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil.*

^d *Institute of Agricultural Sciences. Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Brazil.*

^e *Department of Nutrition, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

*Corresponding author. Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130–100, Brasil. Tel.: +55 313409 9858; fax: +55 313409-9853. E-mail address: adaliene@gmail.com (A.V.M. Ferreira).

**This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ABSTRACT

The global rise in obesity rates is alarming since this condition is associated with chronic low-grade inflammation and secondary comorbidities such as glucose intolerance, cardiovascular disease and liver damage. Therefore, a lot of dietary approaches are proposed to prevent and treat obesity and its disorders. Virgin coconut oil (VCO) is well known as a functional food due to its significant amounts of medium-chain triglycerides. This study aimed to evaluate the effect of VCO in adiposity, metabolic and inflammatory dysfunction in an obesity model induced by the use of high-refined carbohydrate-containing (HC) diet in mice. Male BALB/c mice were divided into two groups and were fed with control (C) or HC diet to induce obesity during eight weeks. From the 9th until the 12th week the animals fed with HC diet were randomly regrouped into four groups: (i) HC diet alone, HC diet supplemented with three different concentrations of VCO (ii) 1000 mg/kg, (iii) 3000 mg/kg and (iv) 9000 mg/kg. Regardless of the concentration, VCO supplementation promotes lower adiposity gain and also improvement in glucose tolerance, lower glucose and lipids serum concentrations and decrease in hepatic steatosis. Moreover, VCO intake induces a lower inflammatory response due to a decrease in leukocytes numbers, reduction in TNF- α and IL-6 concentrations in adipose tissue, as well as lower counts of leukocytes, mononuclear and polymorphonuclear circulating cells. Our data showed that VCO can be considered as an interesting potential dietary approach to attenuate obesity and its metabolic and inflammatory alterations.

Keywords: virgin coconut oil, medium-chain triglycerides, obesity, metabolism, inflammation.

INTRODUCTION

Obesity is characterized by higher accumulation of body fat which is associated with an increase in leukocytes infiltration in adipose tissue and higher levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL) 6 and IL-1 β ^{1,2}. Since obesity is associated with a chronic low-grade inflammation, this condition is linked to secondary diseases and metabolic disorders that lead to a negative impact on the quality of life and life expectancy, including insulin resistance, glucose intolerance, type 2 diabetes, dyslipidemia, cardiovascular disease and hepatic steatosis³⁻⁵. The rise in obesity rates at epidemic levels is an issue of concern worldwide^{6,7} which increases the incidence of health hazards and healthcare system costs⁸.

Obesity treatment includes conventional drugs, that are often associated with undesirable side effects⁹, and hypocaloric diets¹⁰, whose adherence is very low. Therefore, such strategies have been shown ineffective as they are associated with bodyweight gain rebound (REF). In this regard, functional foods might provide a safe and effective auxiliary strategy to be used to treat obesity and co-related disorders¹¹, as they contain bioactive compounds, such as polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, phenolic compounds, antioxidants vitamins (A, C and E) and phytosterols, able to reduce inflammation and oxidative stress¹¹⁻¹³. Another dietary component used to treat overweight due to its potential to reduce body weight and fat, are medium-chain fatty acids (MCFA) (saturated fatty acids composed of 6–12 carbons)¹⁴. MCFA shows such effect through down-regulation of adipogenic genes¹⁴⁻¹⁶, higher induction of fat oxidation rate and energy expenditure^{14,17-22} as well as reduction in food intake^{14,18,23,24}.

Consuming virgin coconut oil (VCO) is one strategy among others to obtain MCFA, since this product contains high amounts of this kind of fat, particularly lauric acid (12:0), in proportions that range from 45 to 56%²⁵. Furthermore, when obtained from fresh, mature coconut kernel without the use of heat and refining process, VCO retains significantly amounts of phytochemicals (vitamins, polyphenols and phytosterols)²⁵⁻²⁷ which can provide antioxidant, antithrombotic and anti-inflammatory effects²⁸⁻³³ as well as improvement in glucose homeostasis³⁴.

Therefore, this study aimed to evaluate whether VCO intake should be an effective strategy to reduce the adiposity gain, metabolic and inflammatory disturbances induced by a high-refined carbohydrate (HC) diet in mice.

MATERIALS AND METHODS

Virgin coconut oil

A sample of an organic virgin coconut oil from Conde, Bahia (Brazil) was identified and properly stored under refrigeration (4-10°C), protected from light until its use. The fatty acid profile of the VCO used is: 6.01% caprylic acid, 6.48% capric acid, 48.08% lauric acid, 17.72% myristic acid, 7.97% palmitic acid, 6.94% stearic acid, 0.85% oleic acid and 1.16% linoleic acid⁴².

Animals and diets

Male BALB/c mice at 5-7 weeks of age were obtained from the animal care center of Universidade Federal de Minas Gerais (Bioscience unit-CEBIO/UFMG) and kept in an environmentally controlled room under a 14/10 h light-dark cycle. Animals had free access to tap water and food and were maintained according to ethical guidelines of our institution. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the University (protocol 174/2012).

Mice were divided into two groups: at the first group (n=8), mice were fed with control diet (LABINA) (C group) and at the second group (n = 32), mice received the HC diet, during the first eight weeks. This diet was composed of 45% condensed milk, 10% refined sugar and 45% chow diet. The macronutrient composition of the chow diet (4.0 kcal/g) was 65.8% carbohydrate, 3.1% fat, and 31.1% protein; the HC diet (4.4 kcal/g) was composed of 74.2% carbohydrate, 5.8% fat and 20% protein. It is important to highlight that the HC diet contains at least 30% refined sugars, mostly sucrose³⁵. After 8 weeks, the mice fed with the HC diet were randomly redistributed equally into four groups. One group continued to receive only HC diet (HC group),

whereas the others three groups had their HC diet supplemented with VCO in amounts calculated to provide 1000mg/Kg (low dose – LVCO group), 3000mg/Kg (medium dose – MVCO group) and 9000mg/Kg body weight (high dose – HVCO group). The supplements of VCO to the HC diet was adjusted every week based on mice food intake and body weight. The dietary treatment using VCO was performed for four weeks. The experimental design is described in Figure 1.

During the experiment, mice were collectively housed, body weight and food intake were measured once and twice a week, respectively. At the end of the dietary treatment, mice were anesthetized with 130 mg/kg body weight (BW) of ketamine and 0.3 mg/kg BW of xylazine then killed by exsanguination. Liver, epididymal, inguinal, mesenteric and retroperitoneal white adipose tissues were collected, weighed and stored at -80°C until further analysis. Blood was collected for total and differential blood cell counts and to obtain serum.

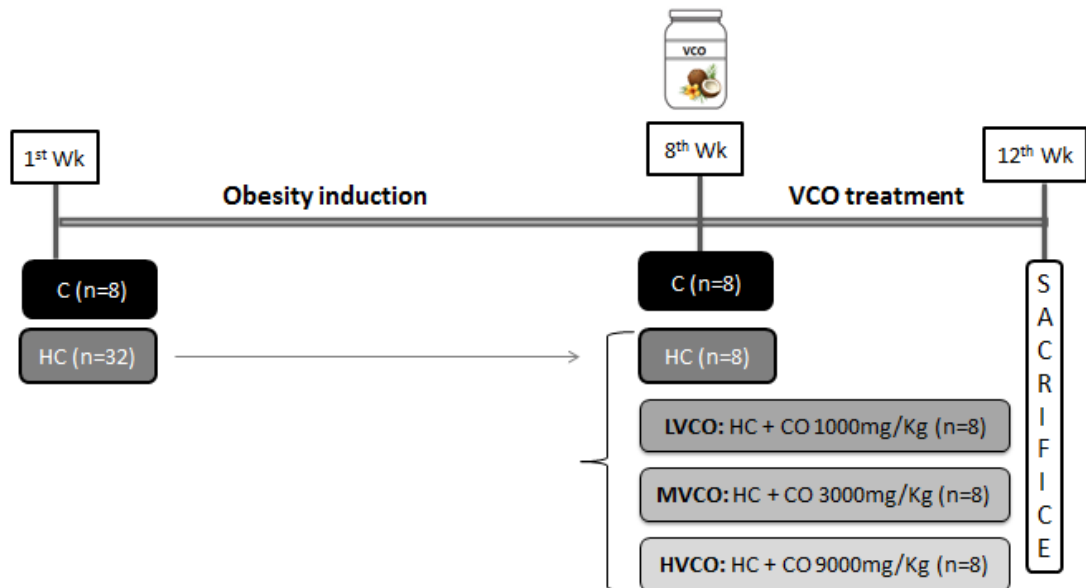


Figure 1. Experimental design of obesity induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice and VCO treatment. Mice were fed a normal diet (C), or high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. Wk: weeks.

Oral glucose tolerance test

Mice were fasted for six hours and then D-glucose (2 mg/g body weight) was given orally by gavage. Glucose levels were monitored from tail blood samples at 0, 15, 30, 60, and 90 min after glucose overload using an Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

Energy expenditure estimation

The metabolic rate was estimated using continuous recorders of oxygen consumption (VO_2) and CO_2 released with an open-flow indirect calorimeter (LE405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Spain) performed as previously described by Freire et al (2016)³⁶.

At the 12th week of diet treatments, mice were fasted for 2 hours, weighed and placed individually into the gas chamber, where they remained for 150 minutes without any external influence. VO_2 was recorded for each minute using a computerized system (Metabolism, Harvard Apparatus, Spain). The final 120 minutes were used for the analysis, while the initial 30 minutes were disregarded to allow the mice to calm and acclimate to the chamber.

The VO_2 and respiratory exchange ratio ($RER=VCO_2/VO_2$) values were used to estimate energy expenditure (EE), using the following equation: $EE = (3.815 + (1.232 \times RER) \times VO_2 \times 1.44)^{36}$. All experiments were conducted during the same period of time to prevent circadian rhythms variations and the room temperature was controlled at $25 \pm 1^\circ C$.

Total and differential blood cell counts

Tail blood samples were taken and diluted in Turk's solution. Total leukocyte count was performed using a Neubauer chamber. Peripheral blood smears were stained with a panoptic kit (Laborclin, Pinhal, Brazil) and differential white blood cell count was determined under oil immersion (1000X) using standard morphologic criteria.

Intravital microscopy in mouse epididymal adipose tissue

Intravital microscopy was performed in the epididymal adipose tissue as previously described by Oliveira et al (2013)³⁵. Briefly, mice were anesthetized by i.p. injection of 130 mg/kg ketamine and 0.3 mg/kg xylazine. The epididymal adipose tissue was exposed and the number of leukocytes rolling and adherent to the vascular wall was counted. Leukocytes were fluorescently labeled by i.v. administration of rhodamine 6G (100 μ l; Sigma, St. Louis, MO) and observed through a fluorescence microscope (Nikon H550L, 20X objective lens). Rolling leukocytes were defined as cells passing through a transverse imaginary line to the vessel for 60s and moving at a velocity less than that of erythrocytes. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for a period of 30 s or longer in a vessel fragment of approximately 100 μ m. The two parameters were measured in two or three different vessels and an average was measured for each mice.

Determination of serum parameters

Glucose, total cholesterol and triglycerides levels were assayed using enzymatic kits (KATAL, Belo Horizonte, MG, Brazil). Alanine aminotransferase (ALT)

and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured using colorimetric kits (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil) as non-esterified fatty acids (NEFA) (Wako Pure Industries, Osaka, Japan). The fasting serum levels of chemerin, adiponectin, resistin, and leptin were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D systems Europe Ltd., Abington, UK). All assays were performed according to the procedures supplied by the manufacturer.

ELISA assay

The concentrations of cytokines were determined in epididymal adipose tissue (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, and transforming growth factor beta - TGF- β), subcutaneous adipose tissue and liver (TNF- α and IL-6) using DuoSet ELISA development kits (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

Histology

Epididymal adipose tissue and liver were excised and fixed in a phosphate-buffered formaldehyde solution for 48 h and were then incubated in 70% ethanol. Sections of the tissues were stained with hematoxylin–eosin and analyzed in original magnification of 200X. In the adipose tissue, the area encompassed by 100 adipocyte cells was measured in each animal using Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, USA). ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) was used to calculate the mean adipocyte area (μm^2) and frequency distribution of adipocytes' cell surface area.

Analyze of thiobarbituric acid-reactive substances and reduced glutathione

Total thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels, an index of malonyl-dialdehyde production, were determined in the liver as previously described⁴⁰. Reduced glutathione (GSH) levels were determined as previously described by Sedlak et al⁴¹. Briefly, 100 mg of liver was homogenized. It was added in the samples trichloroacetic acid and then centrifuged after 30minutes in the ice. The clear supernatant were mixed with phosphate buffer 0.1mol/L (pH8.5) and 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoicacid) in methanol. The absorbance of the reacted solution was measured at 415 nm. Levels were determined using GSH as a standard.

Quantification of lipid content by Oil-red-O staining

Liver fragments previously fixed in 4% formaldehyde for 48 hours, were cut in a cryostat (10µm), stained with Oil Red (Sigma-Aldrich, USA) and counterstained with hematoxylin. The images were captured by high definition coupled with Canon camera magnifying glass. The quantification of lipid was performed using Image-J software (Image-J 1:35 d, NIH, 58 Bethesda, MD, USA).

Liver fat and lipid content

Total lipids were extracted from the liver tissue using the method of Folch et al. (1957)³⁷. Briefly, liver was homogenized with chloroform:metanol solution (2:1) to extract total fat from liver sample. After the extraction, the solution was filtered and mixed with 0.9% saline. The upper phase was aspirated and an aliquot of lower phase was added in a pre-weighed container. Upon evaporation, the extract previously obtained was mixed with 500 µL of isopropanol and the triglyceride and

total cholesterol levels were evaluated using enzymatic kits (KATAL, Belo Horizonte, MG, Brazil).

Analysis of adipose tissue-derived stromal vascular cells (AT-SVC) by flow cytometry

AT-SVC were obtained from epididymal adipose tissue of mice and the cells were isolated by the method of Rodbell (1964)³⁸. AT-SVC were washed with DMEM supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), counted, labeled with conjugated antibodies for CD45, CD11b, F480, Ly6G, CD4 e CD8 (BD Pharmingen), and their respective isotype controls. The macrophage population (M1, M2, Mres) identification was done by the method of Ariel & Serhan (2012)³⁹. Cells were analyzed with a FACSCalibur, and data were analyzed by FlowJo (TreeStar).

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)

The total RNA was isolated from epididymal adipose tissue using the Trizol method. Real-time PCR was performed on an ABI PRISM 7500 sequence-detection system with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) was used for the reverse transcription of 2 µg of RNA. The relative gene expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC) was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and was normalized to ribosomal 18S expression.

The following primer pairs, designated as forward (For) and reverse (Rev) for the investigated RNA sequence, were utilized: For, 50-TCCGCACTGACTGTAACCAC AT-30 and ACC Rev, 50-TGCTCCGCACAGATTCTTCA-30.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM and analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). All data were analyzed for normality of distribution using Kolmogorov-Smirnov test and were found to be normal. Comparison between two groups was performed using Student's t test and multiple comparisons were performed using one-way ANOVA with Student-Newman-Keuls post-hoc analysis. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Mice feeding VCO had low adiposity and smaller adipocytes

Despite the body weight gain (Fig. 2A) and caloric intakes (data not shown) were similar between the groups, adipose tissues weights were higher in mice fed with the HC diet compared with control group (Fig. 2B-E). VCO supplementation, in all concentration used, prevented the increase in adiposity induced by HC diet in epididymal (Fig. 2B), retroperitoneal (Fig. 2C), mesenteric (Fig. 2D) and inguinal (Fig. 2E) adipose tissues.

The higher adiposity caused by HC diet consumption was accompanied by bigger adipocytes as showed in morphometric analysis of representative photomicrographs of epididymal adipose tissue (Fig. 2F, G, H). Akin to what we observed concerning the adiposity, all groups that received VCO supplementation presented smaller adipocyte area (Fig. 2F, G and H). The HC mice showed most of adipocytes with area higher than 25,000 μm^2 , whereas mice fed with VCO presented area of adipocytes lower than 15,000 μm^2 (Fig. 2H).

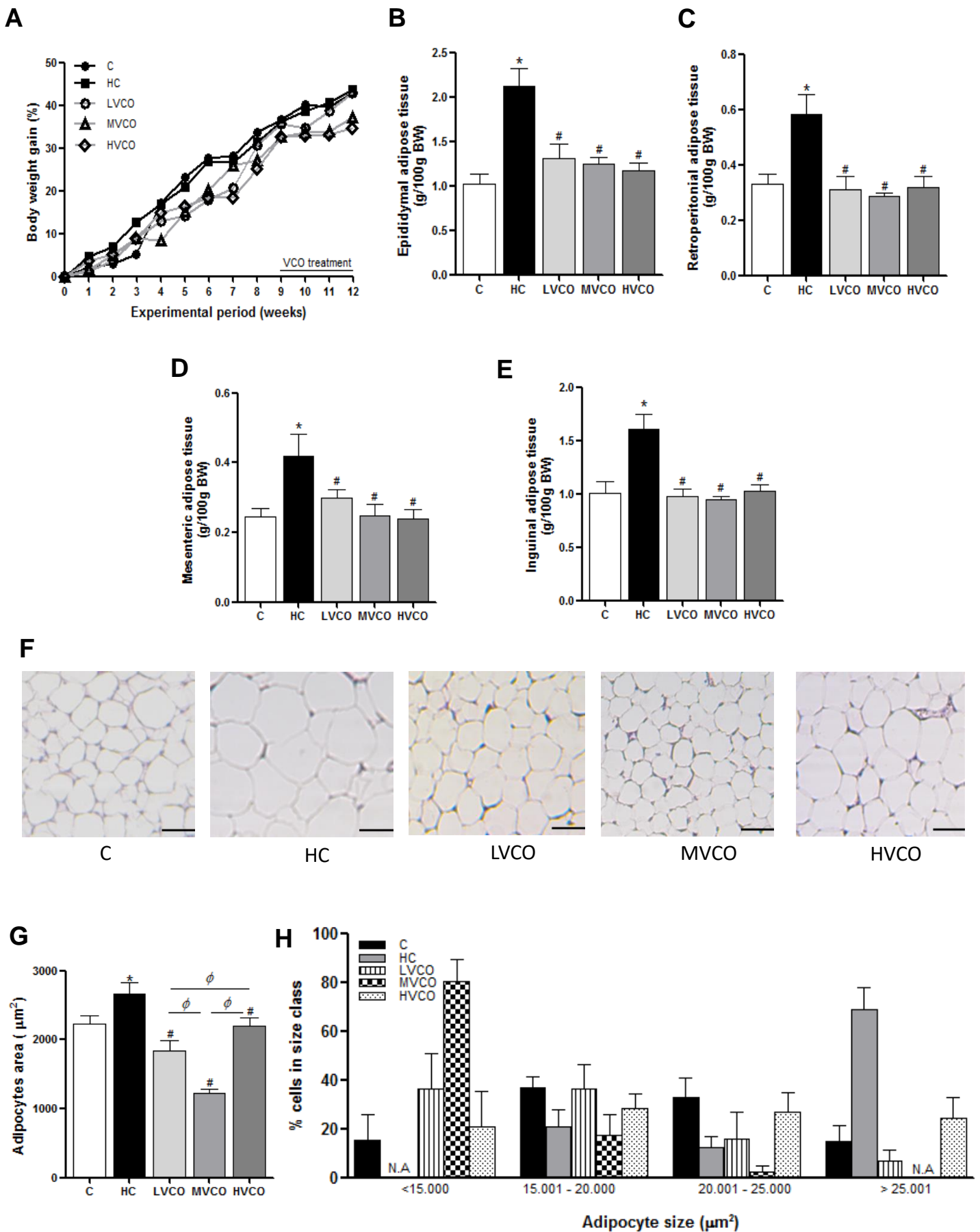


Figure 2. Effect of dietary VCO supplementation in body weight gain, adipose tissues weight and adipocyte size. (A) Body weight gain along 12 weeks. (B) Epididymal, (C) mesenteric, (D) retroperitoneal and (E) inguinal adipose tissue weight corrected for BW. (F) Representative

photomicrographs of hematoxylin-eosin-stained epididymal adipose tissue used to determine the epididymal adipocyte areas (mm^2). Bars indicate $50\mu\text{m}$. (G) Adipocyte area (mm^2) and (H) percentage of adipocyte cells in different size classes of mice fed normal diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. Values are means \pm SEM of eight animals per group. *versus control group; #versus HC group. ϕ versus LVCO, MVCO and HVCO groups. $P < 0.05$.

VCO supplementation had no effect on oxygen consumption (VO_2), energy expenditure (EE) and respiratory exchange ratio (RER)

In order to evaluate whether the loss of adiposity observed in mice fed VCO was associated any change in energy expenditure (EE) and in oxygen consumption (VO_2) we performed the indirect calorimetry test. No differences in the VO_2 (Fig. 3A), EE (Fig. 3B) and respiratory exchange ratio (RER) (Figure 3C) were observed between all the groups

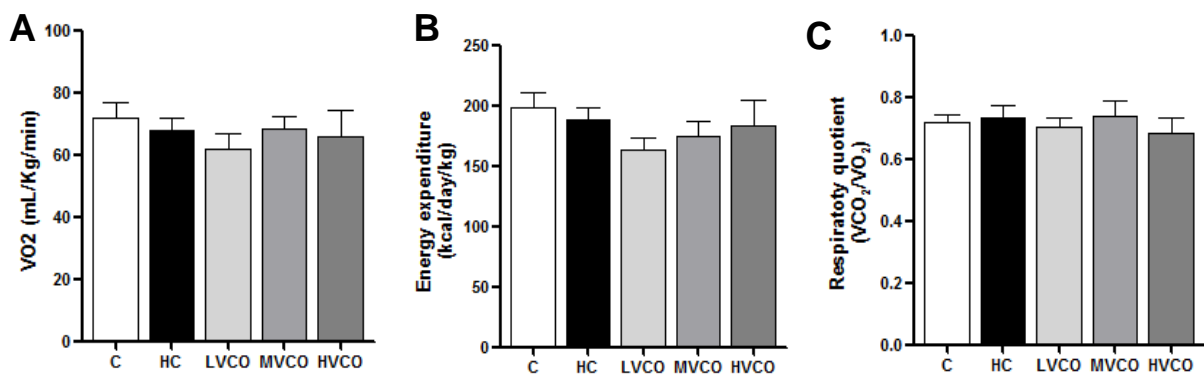


Figure 3. Effect of dietary VCO supplementation in the oxygen consumption (VO_2), energy expenditure (EE) and respiratory exchange ratio (RER). (A) Oxygen consumption measurement, (B) energy expenditure (EE) (kcal/day/kg), (C) respiratory exchange ratio ($\text{RER} = \text{VCO}_2/\text{VO}_2$) (mL/min/kg) of mice fed normal diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. Values are means \pm SEM of eight animals per group.

VCO supplementation decrease the expression of Acetyl-CoA Carboxylase

To understand whether lower adiposity due to VCO supplementation was explained by a change in lipogenic gene expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC), we perform the Real-time PCR analysis. As we could not find any difference between the doses used for VCO, in terms of adiposity, we choose only one experimental group (MVCO group: 3000 mg/kg BW dosage of VCO), to proceed this analysis.

We observed that VCO supplementation at a medium dosage decreases ACC expression, a crucial enzyme in lipogenic process (Fig. 4).

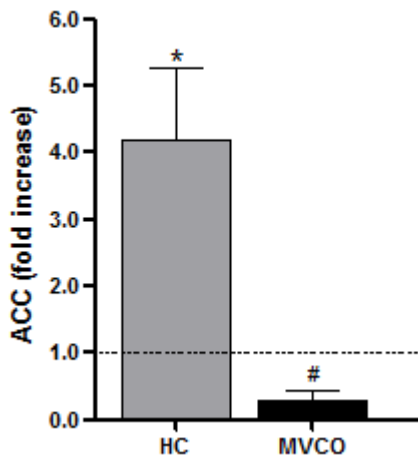


Figure 4. Effect of dietary VCO supplementation in the mRNA expression in epididymal adipose tissue of ACC. This analysis was performed in mice fed normal diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC) and HC diet supplemented with 3000 mg/kg BW of VCO (MVCO). Values are means \pm SEM of five animals per group. *versus control group; #versus HC group. $P < 0.05$.

VCO supplementation improves glucose homeostasis and serum lipid profile

To assess whether VCO supplementation influence the glucose intolerance and dyslipidemia induced by the HC diet, we performed an oral glucose tolerance test and serum analysis. Mice fed with the HC diet showed an elevated glycemic response to glucose overload (Fig. 5A and B) and high fasting glucose concentrations (Fig. 5C) compared with C group. Addition of VCO to the HC diet was sufficient to improve the oral glucose tolerance test (Fig. 5A, B) and decrease glycemia at the fasting state (Fig. 5C).

Total cholesterol and triglycerides concentrations increased in mice fed with the HC diet compared with C group (Fig. 5D-E). On the other hand, LVCO and MVCO groups showed lower total cholesterol levels and triglycerides compared with mice fed the HC diet (Figure 5D-E). HVCO group showed a decrease in triglycerides and NEFA concentrations compared with the HC group (Fig. 5E-F).

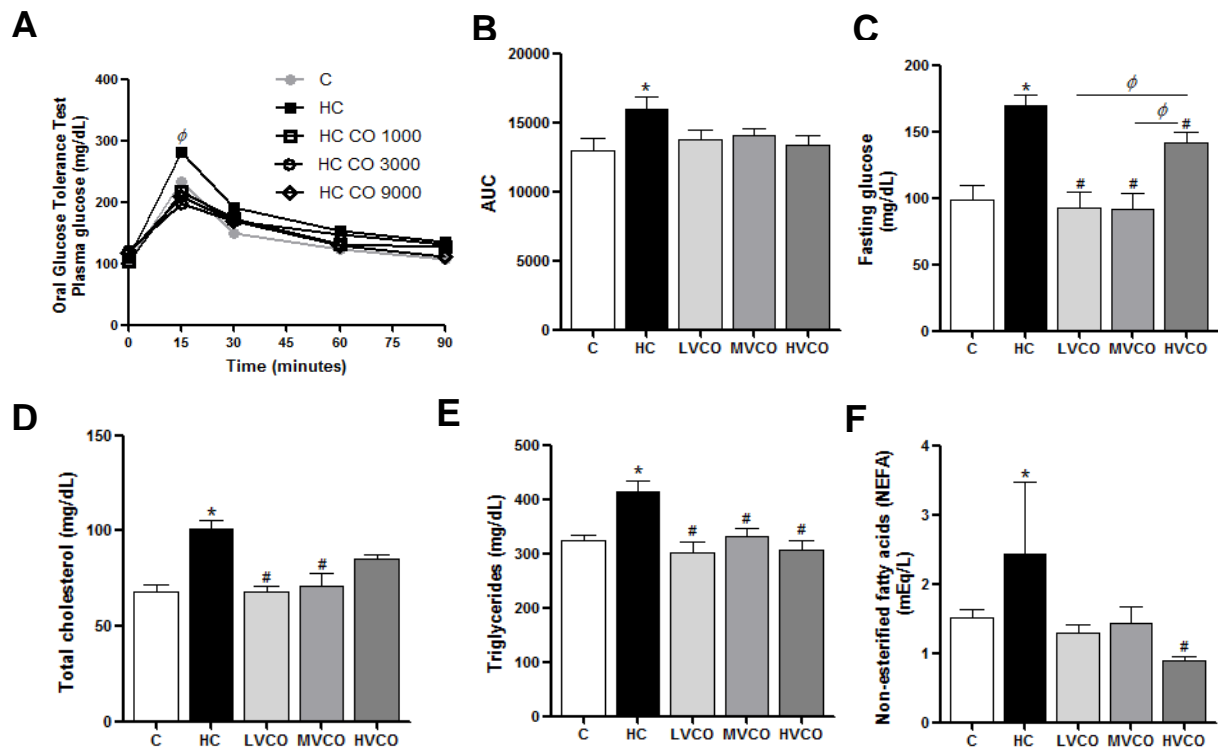


Figure 5. Effect of VCO supplementation on glucose tolerance, fasting glucose and serum lipids. (A) Oral glucose tolerance test, (B) area under curve (AUC) of oral glucose tolerance test, (C) fasting glucose, (D) total cholesterol, (E) triglycerides and (F) non-esterified fatty acids levels (NEFA) fasting in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. To evaluate the glucose tolerance, mice were fasted 6h, subjected to gavage of glucose (2 g/kg) and blood sample was collected before and after the glucose overload (15, 30, 60 and 90min). Values are means \pm SEM of six animals per group. *versus control group; #versus HC group; ϕ versus LVCO, MVCO and HVCO groups. $P < 0.05$.

VCO supplementation ameliorated adipokine profile

HC diet promoted higher and lower serum concentrations of leptin (Fig. 6A) and adiponectin (Fig. 6B), respectively, compared with control group. VCO supplementation in all doses reduced leptin concentration and at low and medium doses increased adiponectin concentrations compared with HC group (Fig. 6A, B). No differences in chemerin and resistin levels were observed between the groups (Fig. 6C and D).

VCO supplementation decreased the number of circulating immune cells

To test if the VCO supplementation was effective to decrease blood leukocytes in HC group, we performed the total and differential white blood cell count. Mice fed HC diet showed higher total leukocyte count, differential count of mononuclear and polymorphonuclear cells in blood compared with control group (Fig. 6E-G). VCO supplementation, regardless the concentration used, was able to decrease total leukocytes, mononuclear and polymorphonuclear cells in the blood induced by HC diet (Fig. 6E-G).

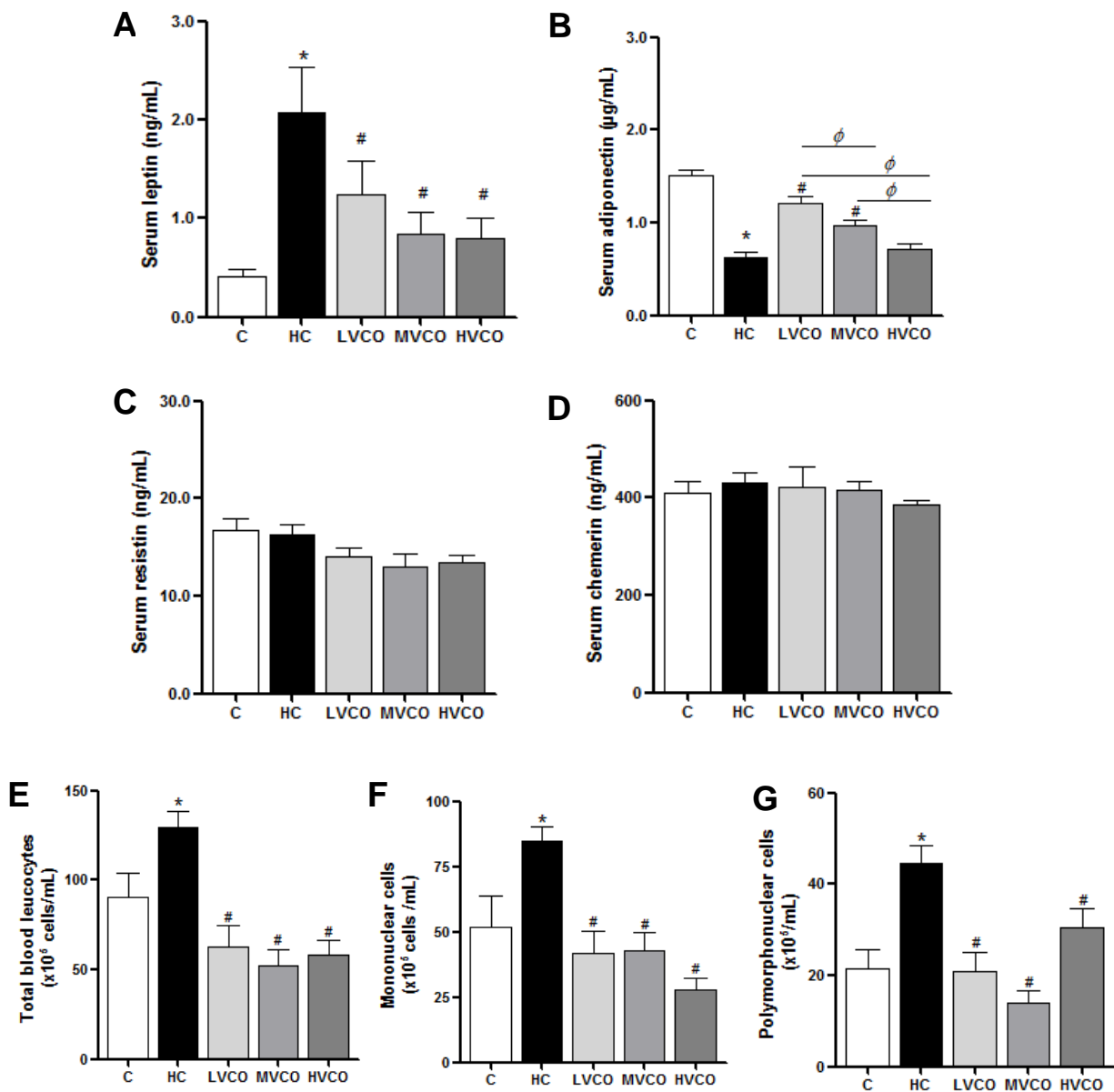


Figure 6. Effect of VCO supplementation on adipocytokine levels, total leukocyte count and differential count of mononuclear cells and polymorphonuclear cells. (A) Leptin, (B) adiponectin, (C) resistin and (D) chemerin levels assessed by ELISA. (E) Total leukocyte count from blood sample, (F) mononuclear cell count and (G) polymorphonuclear cell count from smears of blood sample in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. Values are means \pm SEM of six animals per group. *versus control group; #versus HC group; ϕ versus LVCO, MVCO and HVCO groups. $P < 0.05$.

VCO supplementation decreased inflammatory parameters in epididymal and subcutaneous adipose tissues

To evaluate whether VCO supplementation decrease the number of leukocytes rolling and adhering, we conduct an intravital microscopy in epididymal adipose tissue vessels.

Mice fed with the HC diet showed higher number of leukocytes rolling in epididymal adipose tissue vessels *in vivo*, compared with control group (Fig. 7A). On the other hand, LVCO, MVCO and HVCO groups showed a lower number (Fig. 7A). No differences in adhered leukocytes were observed between all the groups (Fig. 7B).

To test whether the lower number of leukocytes in VCO groups was associated with less production of pro- and anti-inflammatory cytokines in adipose tissue, we analyzed the concentrations of TNF- α and IL-6 in the epididymal and inguinal adipose tissues (Fig. 7).

The HC diet induced high concentrations of IL-6 and TNF- α in epididymal and inguinal adipose tissue, compared with the C group (Fig. 7C, D, E, F). The groups that were supplemented with the three doses of VCO showed lower concentrations of TNF- α in epididymal (Fig. 7C) and inguinal (Fig. 7D) adipose tissue. Levels of IL-6 also decreased in VCO fed mice compared with the HC group in inguinal adipose tissue (Fig. 7F), but not in epididymal adipose tissue (Fig. 7E). There were no differences between the groups in the concentrations of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 and TGF- β in epididymal adipose tissue (data not shown).

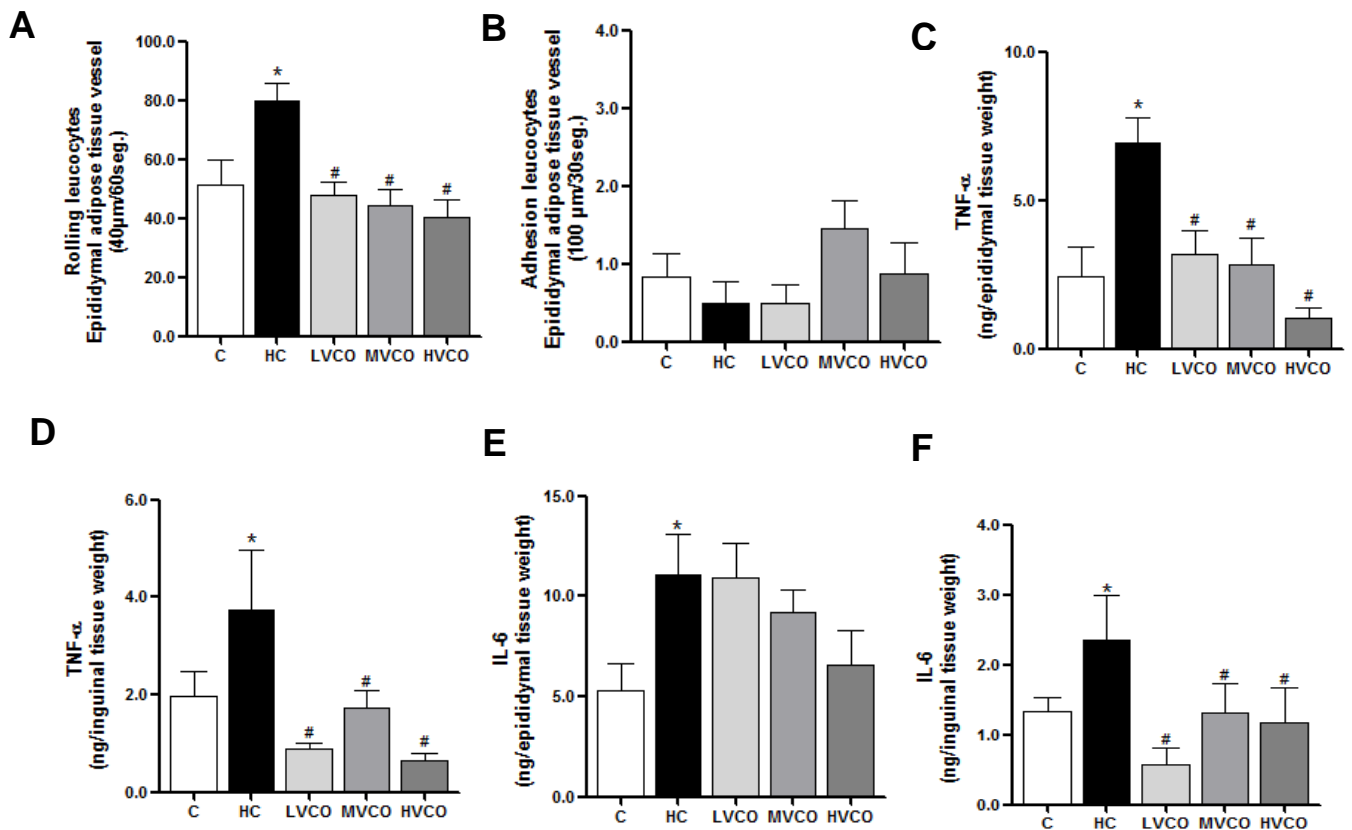


Figure 7. Effect of VCO supplementation on leukocyte-endothelium and on production of cytokines in epididymal adipose tissue. Intravital microscopy was used to assess the (A) rolling and (B) adhesion of leukocytes in epididymal adipose tissue vessels in vivo. Levels of the cytokines TNF- α (C) in epididymal adipose tissue and in (D) inguinal adipose tissue and IL-6 (E) in epididymal adipose tissue and in (F) inguinal adipose tissue in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. The data represents means \pm SEM of eight animals per group. * versus control group; #versus HC group. $P < 0.05$.

Since mice treated with VCO showed low influx of leukocytes to adipose tissue and lower content of cytokines in this tissue we performed flow cytometry analyses in adipose tissue stromal vascular fraction to check which kind of immune cells were modulated by VCO. For this analysis we choose to investigate the group treated with middle dosage of VCO (MVCO group: 3000 mg/kg BW dosage of VCO).

Despite no differences in the number of leukocytes at lymphoid gate (Fig. 8B), the MVCO group showed a higher number of leukocytes at myeloid gate (Fig. 8C). The number of neutrophils did not change between the groups (Fig. 8D, E, F, G). The consumption of HC diet rise the number of total macrophages, which was not observed when the mice received VCO supplementation (Fig. 8D-F and H). No differences in M1 macrophages population were showed between the groups (Fig. 8I). The HC group showed a higher number of M2 macrophages population (Fig. 8J) and resolution-phase macrophages (Fig. 8K). However, the supplementation of VCO at a medium dosage (MVCO group) leads to a lower number of resolution macrophages (Fig. 8K).

There was no difference in the number of CD8⁺ and CD4⁺ T cells between the groups (data not shown).

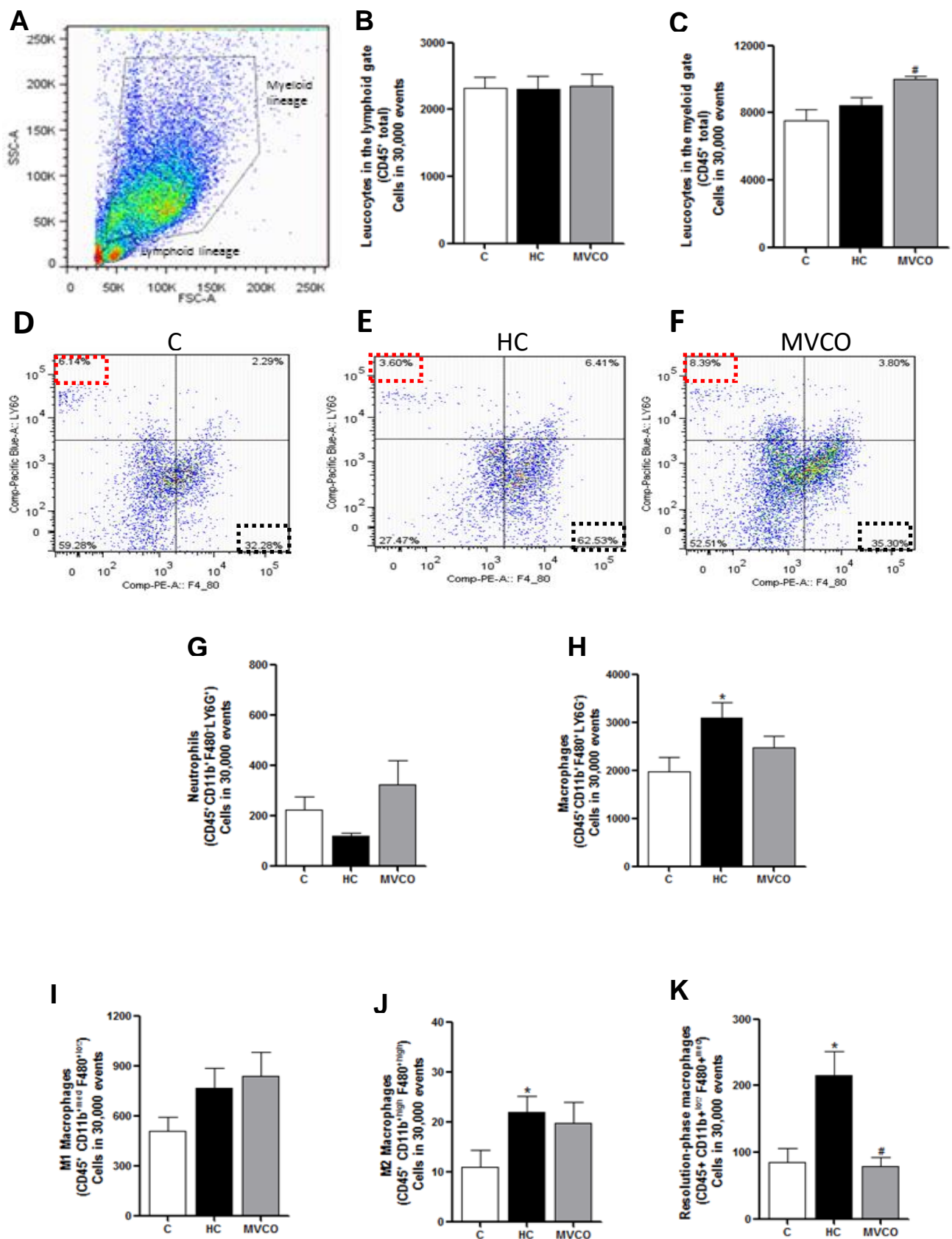


Figure 8. Effect of VCO supplementation on stroma vascular cells from epididymal adipose tissue. Flow cytometry analysis of derived stromal vascular cells from epididymal adipose tissue in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 3000 (MVCO) mg/kg BW of VCO. 30,000 events were assessed in lymphoid and myeloid gate. (A) Granulosity (SSC) versus size (FSC), demonstrating gates for identification of leukocyte populations in

lymphoid and myeloid lineages. (B) Number of total CD45⁺ cells in lymphoid and gate. (C) Number of total CD45⁺ cells in myeloid gate. The *dot plot* diagrams generated by a flow cytometer showing neutrophils (red dashed line) and macrophages (black dashed line) populations of cells in (D) Control group, (E) HC group and (F) MVCO group. (G) Number of neutrophils (CD45⁺CD11b⁺F480⁻LY6G⁺). (H) Number of total macrophages (CD45⁺CD11b⁺F480⁺LY6G⁻); (I) M1 macrophages population (CD45⁺CD11b^{+med}F480^{+low}); (J) M2 macrophages population (CD45⁺CD11b^{+high}F480^{+high}) and (K) Resolution-phase macrophages populations (CD45⁺CD11b^{+low}F480^{+med}). The data represents means \pm SEM of eight animals per group. *versus control group; #versus HC group. P<0.05.

VCO supplementation improves hepatic steatosis induced by HC diet consumption

There was no change in liver weight, total thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) and reduced glutathione (GSH) levels in liver, between the groups evaluated (data not shown). Mice fed with the HC diet presented higher fat deposition on liver (Fig. 9A-D), as well as, higher triglycerides and cholesterol levels on total fat from liver, compared with control mice (Fig. 9B-C). All doses of VCO supplementation, was sufficient to promote a decrease on hepatic steatosis and to reduce total cholesterol levels on hepatic fat content (Fig. 9A-D).

Although the presence of steatosis, no changes were observed in levels of IL-6 and TNF- α in liver between all the groups evaluated (Fig. 9E-F). The liver enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels also were evaluated in experimental animals (Fig. 9G-H). We found no change at AST levels between all the groups (Fig. 9G), however, HC diet induces increase in ALT levels, while VCO supplementation in medium and high doses reverted this effect (Fig. 9H).

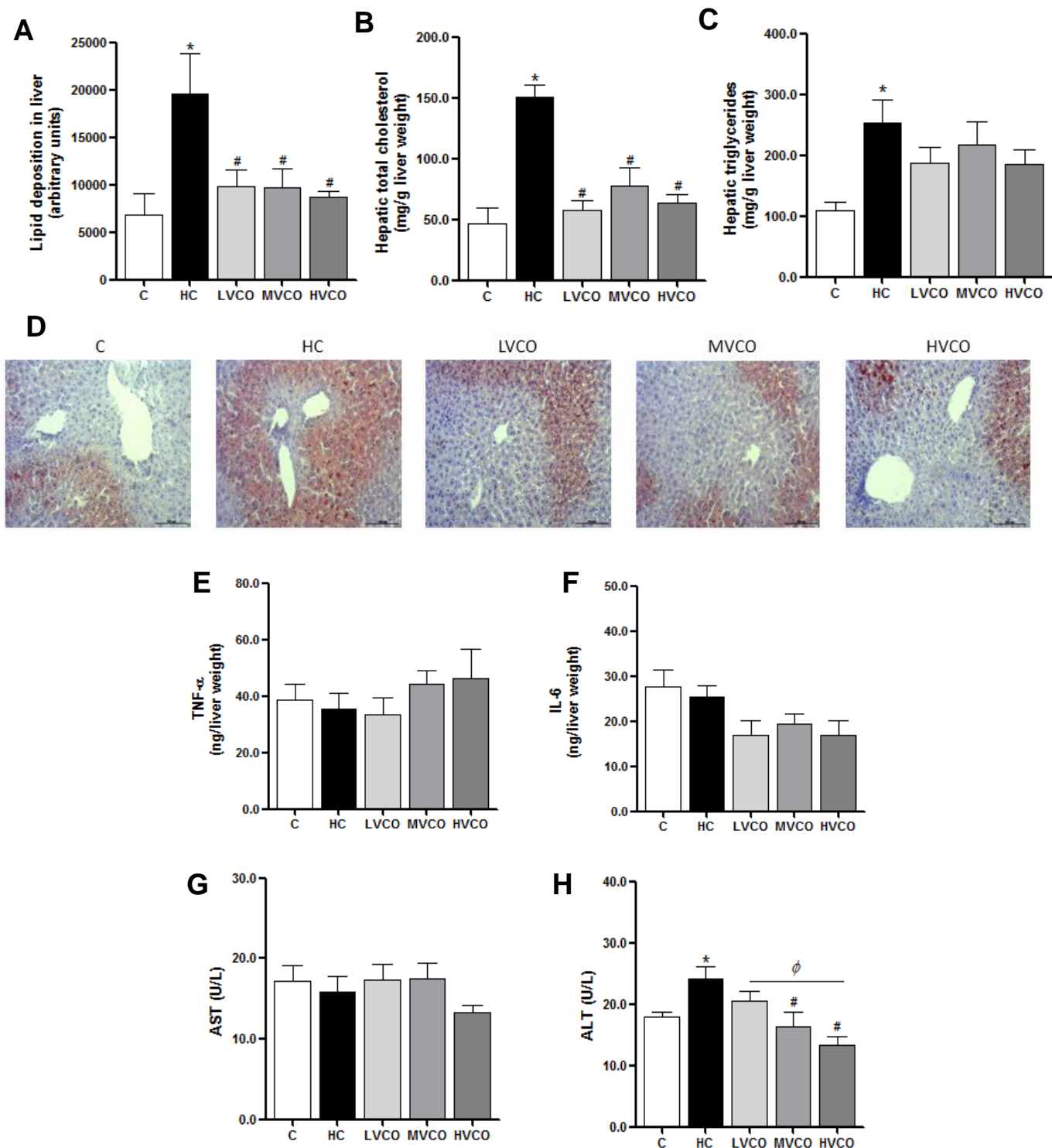


Figure 9. Effect of VCO supplementation on liver parameters. (A) Lipid deposition on liver determined by Oil red O staining. (B) Total cholesterol and (C) triglycerides in liver. (D) Representative photomicrographs of Oil red O staining epididymal adipose tissue (10X) of mice from all groups. Bars indicate 50 μ m. Concentration of (E) TNF- α and (F) IL-6 cytokines in liver sample of mice. Levels of liver enzymes (G) AST and (H) ALT on serum. Analysis were performed in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. The data represents means \pm SEM of eight animals per group. *versus control group; #versus HC group. ϕ versus LVCO, MVCO and HVCO groups. $P < 0.05$.

DISCUSSION

The incidence of overweight and obesity are increasing worldwide and are associated with sedentary lifestyle and increasing intake of industrialized foods with extremely high caloric density. Obesity is associated with chronic low-grade inflammation that in turn triggers a range of chronic diseases. Currently, obesity treatments include conventional drugs that are often associated with harmful side effects, and low adherent hypocaloric diets. Thus, it has been seeking some specific dietary compounds that could help to overwhelm the rapid increase in obesity and related comorbidities. Therefore, in the present study we evaluated whether VCO intake could be useful to reduce the adiposity gain, metabolic and inflammatory disturbances in an obesity model induced by a high-refined carbohydrate diet in mice. Our results clearly showed that, regardless of the concentration, VCO supplementation promotes (i) lower adiposity gain; (ii) improvement in glucose and lipid metabolism; (iii) decreased hepatic steatosis and (iv) lower inflammatory response in adipose tissue and systemically.

In accordance with previous data described by other studies^{35,42-44}, we showed that a high-refined carbohydrate-containing diet induced fat tissue expansion, despite of no change in body weight, associated with metabolic dysfunction and adipose tissue inflammation. In terms of adiposity gain, dietary composition might be as important as the caloric value, since diet components alter gene expression promoting higher lipogenic rates, triggering fatty accumulation and metabolic dysfunction^{12,45}. Thereby, VCO supplementation may provide health beneficial effects despite their energetic value.

The VCO is rich in saturated fat (SF), mainly MCFA, which differs from long chain fatty acid (LCFA) since they are rapidly absorbed in the intestines without catalyzation by the pancreatic lipase enzyme. They are carried by the portal vein to the liver, where they are rapidly oxidized to energy, independently of the carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) transport system¹⁴. Furthermore, MCFA are known to induce thermogenesis^{19,22}, promotes fat oxidation^{17,20,21}, reduce de novo lipogenesis^{15,16,18}, as well as to reduce food intake^{23,24}. In this study, although VCO intake was not associated with satiety increase or higher energy expenditure, its supplementation to diet promoted low mRNA expression of acetyl CoA carboxylase (ACC), a key enzyme involved in lipogenesis which may have explained the lower adiposity gain in mice fed with HC diet supplemented with VCO. Other studies^{31,33,43,44} showed that VCO consumption is associated with a decrease of body fat, especially of abdominal fat depots. Herein, we have showed the putative mechanism associated with lower adiposity induced by VCO intake.

Lower adiposity in VCO fed groups was associated with smaller adipocyte which is very advantageous in terms of metabolic homeostasis, since smaller adipocytes are more sensitive to insulin than hypertrophic cells¹⁻³. VCO intake might have a beneficial effect in glycemic homeostasis due to their MCFA high content, which may promotes increase of insulin sensitivity and glucose tolerance^{14,15} and also by the presence of polyphenols²⁵⁻²⁷, which are known to have high antidiabetic and insulin sensitizing effects^{11,12}. These effects could explain the lower metabolic alterations in HC-fed mice supplemented with VCO, showed by the improvement of glucose tolerance and hepatic steatosis, lower glucose serum concentration and reversal of undesirable alterations in serum levels of adiponectin and leptin compared with mice without supplementation.

The good effect of VCO in metabolic parameters is showed not only in relation to glycemic homeostasis but also in lipid serum levels. Traditionally, coconut oil has been considered able to increase the cholesterol level and their consumption has been associated with cardiovascular disease (CVD) increase risk due to its high saturated fat concentration⁴⁶. Nonetheless, evidence from prospective studies^{47,48} and meta-analysis of randomized controlled trials^{48,49} have not supported a strong link between total saturated fat intake and CVD events. Furthermore, association of SF with undesirable effects on lipid serum and on cardiovascular health depends on specific saturated fatty acids present in foods, once each one promotes different effects on blood lipids and lipoproteins⁴⁹⁻⁵². The complexity of food constituents also determines the effects on cardiovascular homeostasis, as SF from meat would be positively associated with CVD, whereas SF from dairy and vegetables would be unassociated or inversely associated with CVD^{50,51}. The “bad reputation” of coconut oil related with detrimental effects on cardiovascular system is questioned since epidemiologic studies showed that high and regular consumption of VCO by specific populations in Asia and Oceania is associated with lower incidence of hypercholesterolemia and cardiovascular diseases, compared with western populations⁵³⁻⁵⁵. The present study showed that VCO intake promotes lower serum concentrations of cholesterol and triglycerides, which corroborates with other experimental⁵⁵⁻⁵⁷ and clinical^{31,33,44} studies. Authors attribute this effect to the presence of MCFA in VCO and molecules with antioxidant and anti-inflammatory properties, such as polyphenols, vitamin E, provitamin A and phytosterols^{25,31,33}.

Since HC diet consumption triggers hyperglycemia, hyperinsulinemia and induction of transcription factors involved in lipogenesis, such as sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and carbohydrate responsive element

binding protein (ChREBP), it promotes not only high lipid accumulation in adipose tissue and serum³⁵, but also in liver. VCO supplementation is effective to reduce fat and total cholesterol in liver and its effect may be explained by high presence of MCFA in this product, which could reduce genes and transcriptional factors involved in lipogenesis^{15,16,59}. Sun et al (2013)¹⁶ showed that MCFA decreased liver X receptor- α (LXR α), ChREBP and long-chain fatty acid elongase 6 (Elovl6) expression in liver and adipose tissue. In other study¹⁷, the consumption of MCFA promotes downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase (LPL) activity and lower expression of adipogenic transcription factors, such as CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ . In a hepatocyte cellular model, MCFA was found to down-regulate expression of LXRA, SREBP-1c, acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS)⁵⁹. In addition, the MCFAs are associated with lower lipid fat accumulation, as this fat is largely oxidized in the liver, hence reducing the substrate availability for TG synthesis in this organ¹⁴. Low serum NEFA concentration in VCO fed groups, compared with the HC group, may be associated with a greater ability to oxidize this energetic substrate, since other studies showed that MCFA present in VCO may promote such effect^{14,17,18,21}.

The improvement in metabolic homeostasis induced by VCO supplementation could be a result of an amelioration of chronic low grade inflammation induced by the HC diet in adipose tissue. In fact, VCO fed groups showed a lower number of leukocytes rolling in adipose tissue vessels, a drop in pro-inflammatory cytokines production (IL-6 and TNF $-\alpha$) and a reduction in the number of total macrophages in epididymal adipose tissue. Besides that, the MVCO group showed a decreased number of phase-resolution macrophages that could be related with a lower

requirement to resolve the adipose tissue inflammation³⁹. VCO intake also decreased systemic inflammation, once it reduced the number of leukocytes, including both mononuclear and polymorphonuclear circulating cells. The lower local and systemic inflammation in mice fed with VCO may be partially explained by the lower adiposity, since the expansion of visceral fat tissue produces an increase in leukocytes recruitment and a wide range of inflammatory mediators¹⁻⁵. Thus, it is still unknown whether metabolic improvement is related with an anti-inflammatory profile from mice fed VCO or whether the lower adiposity induced by this oil triggers low inflammatory response. The presence of antioxidant in VCO may also be associated with the lower inflammatory status in mice^{11,12,25-30,32}. In an animal model of arthritis, polyphenolic fraction from VCO showed high antioxidant and anti-inflammatory effects, since it promoted paw edema inhibition, decreased the expression of inflammatory genes, such as COX-2, iNOS, TNF and IL-6, in paw tissues and reduced the TBARS concentration in paw tissue and serum³⁹.

The VCO dosages utilized in this study were chosen in accordance with previous studies²⁸⁻³⁰. Generally, the effects were not dose-dependent, since all the dosages promoted beneficial outcomes and there were no significant differences between the VCO fed groups in relation to the effects, with the exception of fasting glucose and total cholesterol, which were higher, and adiponectin serum levels, which was lower, in mice fed with the high dosage of VCO (HVCO group). The excess of LCFA as a result of a high dosage of VCO may have caused a detrimental metabolic effect to likely overlay the beneficial of MCFA.

Taken together, our findings showed that VCO supplementation can modulate metabolic and inflammatory dysfunction associated with obesity induced by a HC diet in mice probably due to the high content of MCFA and the presence of bioactive

compounds in VCO ^{25,31,33,44,55-57}. Thus, the present study showed that VCO can be considered as an interesting and useful dietary approach to treat obesity and its comorbidities.

REFERENCES

- [1] Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine* 2012; 18: 363–74.
- [2] Hill AA, Bolus WR, Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunological Reviews* 2014; 262: 2014.
- [3] Mcardle MA, Finucane OM, Connaughton RM, et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in Endocrinology* 2013; 4: 1–23.
- [4] Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 1111–19.
- [5] Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology* 2015; 12: 15–28.
- [6] WHO (World Health Organization). Fact sheet: obesity and overweight. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> Accessed: in: april 21, 2016.
- [7] Ncd Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1377–96.
- [8] Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: A systematic review of the direct costs of obesity. *Obesity Reviews* 2011; 12: 131–41
- [9] Kang JG, Park CY. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes & metabolism journal* 2012; 36: 13–25.

- [10] Koehnlein EA, Salado GA, Yamada AN. Adesão à reeducação alimentar para perda de peso: determinantes, resultados e a percepção do paciente. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* 2008; 23: 56-65.
- [11] Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013, 613–23.
- [12] Bakker GC, Van Erk MJ, Pellis L, et al. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2010; 91: 1044–59.
- [13] Dulloo, A. G. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: From pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obesity Reviews* 2011; 12: 866–83.
- [14] Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal* 2006; 16, 1374–82.
- [15] Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, et al. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obesity research* 2003; 11: 734–744.
- [16] Sun H, Jiang T, Wang S, et al. The effect of LXR *alfa*, ChREBP and Elovl6 in liver and white adipose tissue on medium- and long-chain fatty acid diet-induced insulin resistance. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2013; 102: 183–92
- [17] Clegg ME. Medium-chain triglycerides are advantageous in promoting weight loss although not beneficial to exercise performance. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2010; 61: 653–79.

- [18] Mumme K, Stonehouse W. Effects of medium-chain triglycerides on weight loss and body composition: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2015; 115: 249–63.
- [19] Baba N, Bracco EF, Hashim SA. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *American Journal of Clinical Nutrition* 1982; 35: 678–82.
- [20] St-onge MP, Ross R, Parsons WD, Jones PJH. Medium-Chain Triglycerides Increase Energy Expenditure and Decrease Adiposity in Overweight Men. *Obesity Research* 2003; 11: 395–402.
- [21] Turner N, Hariharan K, Tidang J, et al. Enhancement of Muscle Mitochondrial Oxidative Capacity and Alterations in Insulin Action Are Lipid Species Dependent. *Diabetes* 2009; 58: 2547–54.
- [22] Zhang Y, Xu Q, Liu YH, et al. Medium-Chain Triglyceride Activated Brown Adipose Tissue and Induced Reduction of Fat Mass in C57BL/6J Mice Fed High-fat Diet. *Biomedical and environmental sciences : BES* 2015; 28: 97–104.
- [23] Douglas B, Jansen JB, De Jong AJ, et al. Effect of various triglycerides on plasma cholecystinin levels in rats. *Journal of Nutrition* 1990; 120: 686–90.
- [24] Krotkiewski M. Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2001; 25: 1393–1400.
- [25] Marina AM, Che Man YB, Amin I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. *Trends in Food Science and Technology* 2009; 20: 481–87.
- [26] Seneviratne KN, Dissanayake DMS. Variation of phenolic content in coconut oil extracted by two conventional methods. *International Journal of Food Science and Technology* 2008; 43: 597-602.

- [27] Seneviratne KN, Hapuarachchi CD, Ekanayake S. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry* 2009; 114: 1444–49.
- [28] Zakaria ZA, Ahmad Z, Somchit MN, et al. Antihypercholesterolemia property and fatty acid composition of madi-produced virgin coconut oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 4: 636-44.
- [29] Nevin KG, Rajamohan T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague-Dawley rats. *The European Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2008; 3: 1-8.
- [30] Dosumu O, Duru F, Osinubi AA, et al. Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion. *Agriculture and biology Journal of North America* 2010; 1; 1126–32.
- [31] Silva RSM, Fortes RC, Soares HF. Efeitos da suplementação dietética com óleo de coco no perfil lipídico e cardiovascular de indivíduos dislipidêmicos. *Nutrição Brasil* 2011;10: 364-69.
- [32] Vysakh A, Ratheesh M, Rajmohanan TP. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. *International Immunopharmacology* 2014; 20: 124–130.
- [33] Cardoso DA, Moreira ASB, Oliveira GMM, et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. *Nutrición Hospitalaria* 2015; 32: 2144–52.

- [34] Narayanankutty A, Mukesh RK, Ayoob SK, et al. Virgin coconut oil maintains redox status and improves glycemic conditions in high fructose fed rats. *Journal of Food Science and Technology* 2016; 53: 895–901.
- [35] Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques MCC, et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity* 2013; 21: 396–406.
- [36] Freire RH, Fernandes LR, Silva RB, et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *International Journal of Obesity* 2015; 40; 1–8.
- [37] Folch J, Lees M, Sloane SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 1957; 226: 497- 509.
- [38] Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 1964; 239: 375-380.
- [39] Ariel A, Serhan CN. New lives given by cell death: Macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. *Frontiers in Immunology* 2012; 3: 1–6.
- [40] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [41] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25:192–205.

- [42] Zicker MC, Ramiro DO, Emídio MNL et al.. Composição de ácidos graxos, caracterização físico-química e determinação da estabilidade oxidativa de óleos de coco extravirgem comercializados no Brasil. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos 2016. No prelo.
- [43] Liao KM, Lee YY, Chen CK, Rasool AHG. An Open-Label Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Virgin Coconut Oil in Reducing Visceral Adiposity. ISRN Pharmacology 2011; 2011: 1–7.
- [44] Assunção ML, Ferreira HS, Dos Santos AF, Cabral CR, Florêncio TMMT. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. Lipids 2009; 44: 593–601.
- [45] Müller M, Kersten S. Nutrigenomics : goals and strategies. Nature Publishing Group 2003; 4: 316-322.
- [46] Asian And Pacific Coconut Community (APCC). Internet: Standard for Virgin Coconut Oil (2003). Downloaded From from <http://www.apccsec.org/standards.htm/on 02/10/2016>.
- [47] Micha R, Mozaffarian D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: A fresh look at the evidence. Lipids 2010; 45: 893–905.
- [48] Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, et al. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: Where does the evidence stand in 2010? American Journal of Clinical Nutrition 2011; 93: 684–688.
- [49] Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease 1 – 5. American Journal of Clinical Nutrition 2010; 91: 535–546.

- [50] De Oliveira Otto MC, Mozaffarian D, Kromhout D, et al. Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease : the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis 1 – 4. *American Journal of Clinical Nutrition* 2012; 07: 397–404.
- [51] Lawrence GD. Dietary Fats and Health : Dietary Recommendations in the Context of Scientific Evidence. *Advances in Nutrition* 2013; 4: 294–302.
- [52] Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1146–55.
- [53] Feranil AB, Duazo PL, Kuzawa CW, et al. Coconut oil is associated with a beneficial lipid profile in pre-menopausal women in the Philippines. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2011; 20: 190–195.
- [54] Lipoeto NI, Agus Z, Oenzil F, et al. Dietary intake and the risk of coronary heart disease among the coconut-consuming Minangkabau in West Sumatra, Indonesia. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004;13:377–384.
- [55] Prior IA, Davidson F, Salmond CE, et al. Cholesterol, coconuts, and diet on Polynesian atolls: a natural experiment: the Pukapuka and Tokelau island studies. *Am J Clin Nutr.* 1981;34:1552–1561.
- [56] Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry* 2004; 37(9): 830-5.
- [57] Zakaria Z, Ahmad Z, Somchit M, et al. Antihypercholesterolemia property and fatty acid composition of maldi-produced virgin coconut oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 4: 636–644.

- [58] Nevin KG, Rajamohan T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague-Dawley rats. *e-SPEN* 2008; 3: 1–8.
- [59] Wang B, FU Jing, LI Lumin, et al. Medium-chain fatty acid reduces lipid accumulation by regulating expression of lipid-sensing genes in human liver cells with steatosis. *International journal of food sciences and nutrition* 2016; 67: 288–97.

CAPÍTULO 4 – PROTECTIVE EFFECT OF VIRGIN COCONUT OIL ON BONE DYSFUNCTION-INDUCED BY HIGH REFINED CARBOHYDRATE-CONTAINING-DIET IN MICE

Protective effect of virgin coconut oil on bone dysfunction-induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice

Marina Campos Zicker^a, Carina Cristina Montalvany-Antonucci^b, Débora Romualdo Lacerda^a, Tarcília Aparecida da Silva^b, Mila Fernandes Moreira Madeira^c, Adaliene Versiani Matos Ferreira^{d*}.

^a*Department of Food Science, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

^b*Department of Cell Biology, Institute of Biological Science, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

^c*Department of Microbiology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

^d*Department of Nutrition, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.*

*Corresponding author. Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130–100, Brasil. Tel.: +55 313409 9858; fax: +55 313409-9853. E-mail address: adaliene@gmail.com (A.V.M. Ferreira).

**This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ABSTRACT

Obesity leads to chronic low-grade inflammation and oxidative stress which may promotes detrimental effects in bone. Taking into account that the consumption of virgin coconut oil (VCO) is associated with beneficial actions on meta-inflammation, the aim of this study is to evaluate whether the VCO supplementation could ameliorate osteopenic effects promoted by a diet-induced-obesity in mice. Male BALB/c mice were divided into two groups and were fed with control (C) or high-refined carbohydrate-containing (HC) diet during eight weeks to induce obesity and metabolic dysfunction. Then, mice fed with HC diet were randomly regrouped into four groups: (i) HC diet alone, HC diet supplemented with three different concentrations of VCO (ii) 1000 mg/kg, (iii) 3000 mg/kg and (iv) 9000 mg/kg of body weight (BW). After four more weeks, mice were euthanized and the percentage of trabecular bone in sections of vertebrae and long bones (i.e. tibia and femur) was determined by histomorphometry, the alveolar bone and femur were analyzed using micro-computed tomography and RANK, RANKL, and OPG mRNA in maxillary bone were analyzed by quantitative polymerase chain reaction. HC diet induced detrimental effects on different bone sites, since it promoted lower percentage of trabecular bone in tibia, lumbar vertebrae, distal and proximal femur and lower BMD of femur and alveolar bone. VCO supplementation reverted those osteopenic effects. It promoted higher percentage of trabecular bone in multiple bone sites, improvement of femur microarchitecture and greater alveolar bone mass associated with a lower RANKL/OPG ratio. VCO supplementation was effective to prevent bone loss induced by HC diet. Thereby, VCO can be considered as an interesting potential dietary approach to attenuate bone detrimental effects associated with obesity.

Keywords: virgin coconut oil, obesity, bone detrimental effects, alveolar bone.

INTRODUCTION

Obesity is a systemic disease characterized by body fat accumulation, associated with increased production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin - 6 (IL-6), IL-1 β and higher production of reactive oxygen species (ROS)¹⁻³. The low-grade inflammation and oxidative stress in obesity leads to others metabolic dysfunction including insulin resistance, dyslipidemia, cardiovascular disease and even bone remodeling-related disorders^{2,3}.

There are substantial evidences correlating excessive body fat storage and disturbances in bone remodeling process^{4,5}. The inflammation, oxidative stress and metabolic disarrangements, such as hyperlipidemia and hyperglycemia, resulted from obesity, are associated with overexpression of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) and M-CSF (macrophage colony stimulation factor), molecules that promote osteoclast differentiation and consequently, greater bone reabsorption^{6,7}. Adipose tissue accumulation is also associated with suppression of bone formation by inhibiting osteoblast maturation and by reducing the survival of these cells⁶⁻⁸. Previous experimental and clinical studies have shown that obesity results in a deficient organic matrix mineralization, leading to bone fragility that in turn prompt to higher risks to bone fractures^{4,5,9}.

Bone detrimental effects caused by obesity are observed not only in long bones (i.e. femur and tibia)⁴⁻⁹, but also in alveolar bone¹⁰⁻¹⁷. Therefore, obesity is proved to increase alveolar bone loss¹⁰⁻¹³ and known to have an important role on the predisposition or exacerbation of periodontitis^{11,14-17}, an infectious disease characterized by inflammation and destruction of the teeth supporting structures¹⁶.

Current knowledge demonstrates that bioactive dietary substances could promote an improvement of oxidative stress and inflammation, seen in a number of

undesirable health conditions, including obesity¹⁸, osteoporosis^{19,20} and alveolar bone loss²¹⁻²³. Hence, dietary strategies may be helpful to promote beneficial effects and to attenuate even bone dysfunctions.

Recently, virgin coconut oil (VCO) has become a food of interest as a therapeutic natural product due to its antioxidants compounds^{24-27,29} and medium-chain fatty acids (MCFA) (fatty acids with 6–12 carbons) content²⁴. VCO is obtained from fresh, mature coconut kernel without heat or refining process²⁴, which avoids fat degradation and promotes higher retention of phenolic compounds and antioxidant vitamins^{24-26,28,29}, important biologically active components.

VCO supplementation has been shown to promote a series of body health benefits, such as: improvement of serum lipids³⁰⁻³³, glycemic homeostasis³⁴ and antioxidant status^{27,29,32}. These effects seems to be due to its anti-inflammatory properties³⁵ and body fat reduction^{32,33}. Previous studies have shown that VCO supplementation maintained long bone microarchitecture in a model of estrogen-deficient rats³⁷ and improved the antioxidant defense system in tibia. Altogether, it seems that VCO intake could be correlated to beneficial bone effects³⁷ and long bones remodeling. However, to the best of our knowledge, studies evaluating the influence of VCO supplementation on alveolar bone metabolism are absent.

In mouse models, the consumption of a high-carbohydrate diet (HC) cause obesity and correlated comorbidities, such as inflammation, metabolic disturbance³⁸ and, also detrimental effects on long³⁹ and maxillary bones^{40,41,54}. Thereby, the purpose of the present study was to evaluate the effects of VCO supplementation in the long bones, lumbar vertebrae and especially in alveolar bone detrimental effects induced by the HC diet intake in mice.

MATERIALS AND METHODS

Mice and diet

Forty, 6-8 weeks male BALB/c mice were obtained from animal care center of Universidade Federal de Minas Gerais (Bioscience unit-CEBIO-UFMG). The experimental protocol has been approved by the local Ethics Committee in Animal Experimentation (protocol no. 174/2012). Mice were housed under standard conditions ($25.4\pm 3.4^{\circ}\text{C}$, with light–dark cycle of 12 h–12 h), in separated and appropriated cages with free access to commercial chow and tap water. The control diet consisted exclusively of a chow diet (PURINA-LABINA, São Paulo, SP, Brazil), and the HC diet was composed of 45% condensed milk, 10% refined sugar and 45% chow diet³⁸. The macronutrient composition of the chow diet (4.0 kcal/g) was 65.8% carbohydrate, 3.1% fat, and 31.1% protein; the HC diet (4.4 kcal/g) was composed of 74.2% carbohydrate, 5.8% fat, and 20% protein³⁸. It is important to highlight that the HC diet contains at least 30% refined sugars, mostly sucrose³⁸.

Virgin coconut oil

A sample of an organic virgin coconut oil from Conde, Bahia (Brazil) was identified and properly stored under refrigeration ($4\text{-}10^{\circ}\text{C}$), protected from light until it use.

Experimental design

During the first 8 weeks of the experiment, mice were divided in two groups: the first group (n = 8) received a control diet (C group) and the second (n = 32) received the HC diet. After 8 weeks, the animals fed with the HC diet were

redistributed equally into four groups. One group received the HC diet (HC group, n = 8), whereas the other three groups received HC diet supplemented with VCO in amounts calculated to provide 1000 mg/Kg (low dose of VCO – LVCO group, n = 8), 3000 mg/Kg (medium dose of VCO – MVCO group, n = 8) and 9000 mg/Kg of body weight (high dose of VCO – HVCO group, n = 8). The supplementation of VCO was adjusted every week, based upon the food intake and body weight changes. This dietary treatment was performed during four weeks.

Throughout the experiment, the weight of the mice was measured once a week and food consumption was assessed twice a week. At the end of the dietary treatment, animals were anesthetized with ketamine (130 mg/kg BW) and xylazine (0.3 mg/kg BW) and euthanized by exsanguination. Blood was collected to obtain serum. Samples of bones (maxilla, femur, lumbar vertebrae, and tibia) were obtained and stored in 10% buffered formalin.

Histomorphometry of bone tissues

Histomorphometry analysis of bone tissues were determined as previously described³⁹. Lumbar vertebrae (L1–L6) and long bones (femur and tibia) samples (n = 8 per group) were fixed in 10% buffered formalin, decalcified in 14% ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.4) for 21 days, washed and embedded in paraffin. The proximal femur was sectioned in the middle diaphysis, and all of the vertebral segments, femur and tibia were sectioned longitudinally. Thick sections (4- to 5- μ m) were stained with Haematoxylin and Eosin and examined using a light microscope. The percentage of trabecular bone was determined at 40X magnification using an ocular micrometer containing a 121-point grid. In each bone, four fields were chosen right below epiphyseal plate.

Micro CT analysis

Micro CT analysis of maxillae and femur were determined as previously described by Lima et al. (2015)⁴².

Maxillae and femur samples (n = 5 per group) were fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 h and scanned using a microCT system (Skyscan 1172 X-Ray microtomograph; Skyscan, Aartselaar, Belgium). The calibration was carried out with known density calcium hydroxyapatite phantoms (Skyscan). High-resolution images with an isotropic voxel size of 8.62 were acquired (50 kV, 0.5-mm aluminum filter) and the trabecular bone in the furcation area of upper first molars and the metaphyseal region of femurs with a uniformly shaped region of interest, were delineated. The tissue was analyzed to determine bone mineral density (BMD), bone volume (BV), percent bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and trabecular bone pattern factor (Tb.Pf). Alveolar bone crest (ABC) loss was measured as previously described⁴³ by determining the area between the cemento-enamel junction (CEJ) and the ABC (CEJ-ACB) in three dimension images (Fiji – National Institute of Health, USA) of the first, second and third molars.

Mechanical analysis

Mechanical analysis of femur were determined as previously described by Yanagihara et al (2016)⁴⁴. Maximum load (Lmax) and stiffness (St) were determined by testing right femurs to fracture in a universal testing machine (EMICs, DL 10000, Ribeirão Preto, Brazil) equipped with a load cell of 500 N, and TESC software, version 13.4 (EMIC). Femurs were tested by the three-point bending flexural test,

with force applied at a speed of 1.0 mm/min in the anterior-posterior direction. The gap between the two points was 8 mm and a 2N preload was used for 30 s.

mRNA extraction and qPCR in maxilla

For qPCR analysis, the periodontal ligament and surrounding alveolar bone were used. Total RNA was extracted using Trizol reagent followed by column purification (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA, USA). The integrity of RNA samples was checked by analyzing 1 µg total RNA on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µL RNA using Quanti TectRT kit (Qiagen). The targets analyzed were receptor activator of nuclear factor κ B (RANK, *Tnfrsf11a*), RANKL (*Tnfsf11*) and OPG (*Tnfrsf11b*).

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM and were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). All data were analyzed for normality of distribution using Kolmogorov-Smirnov test and were found to be normal. Comparison between two groups was performed using Student's t test and multiple comparisons were performed using one-way ANOVA with Student-Newman-Keuls post-hoc analysis. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

VCO supplementation promotes a higher percentage of trabecular bone in distal and proximal femur, tibia and lumbar vertebrae

HC diet-fed mice (HC) showed a lower percentage of trabecular bone in proximal femur (Fig. 1A, B) and in tibia (Fig. 2A, B) when comparing with control group (C). On the other hand, VCO supplementation at low (LVCO) and medium (MVCO) dosages, leads to an increase of trabecular bone in these bone sites (Fig. 1A, 1B, 2A, 2B).

All the groups fed with VCO showed a higher percentage of trabecular bone in distal femur (Fig. 1C, D) and lumbar vertebrae (Fig. 2C, D) in relation to HC group.

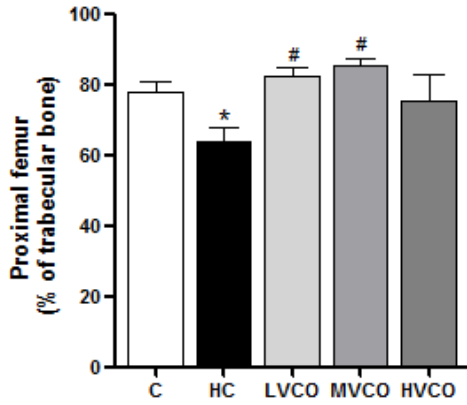
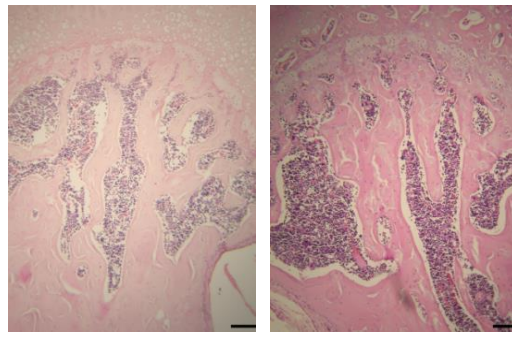
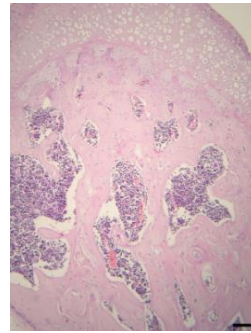
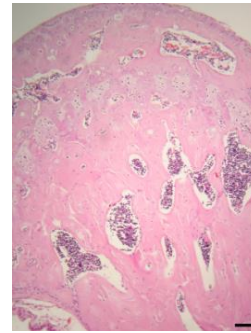
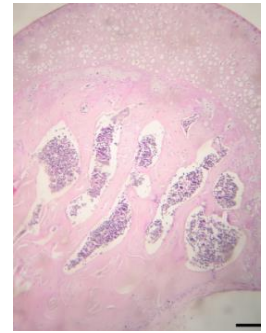
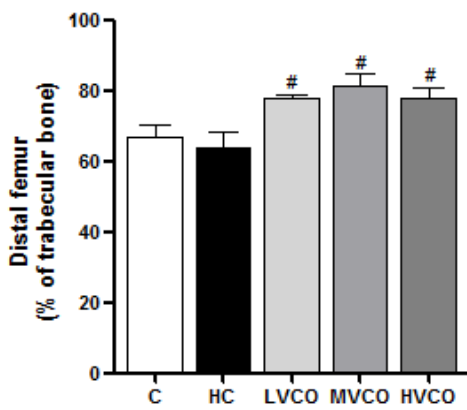
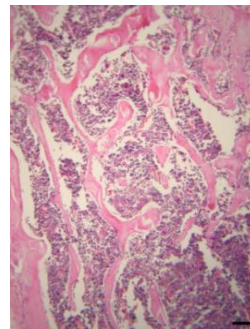
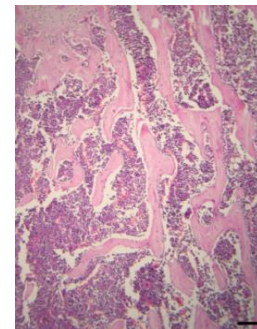
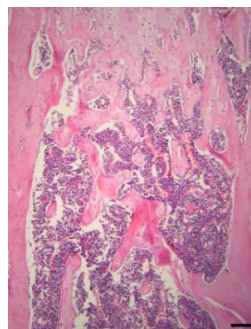
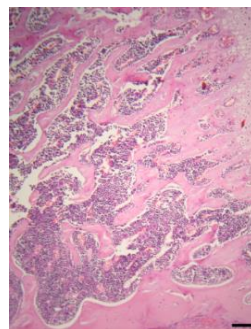
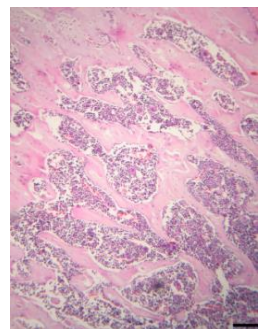
A**B****C****HC****LVCO****MVCO****HVCO****C****D****C****HC****LVCO****MVCO****HVCO**

Figure 1. Effect of HC diet and VCO supplementation on percentage of trabecular bone in proximal and distal femur. (A) Percentage of trabecular bone and (B) histological sections of proximal femur (scale bars represent 100 μ m). (C) Percentage of trabecular bone and (D) histological sections of distal femur (scale bars represent 100 μ m). Analysis were performed in mice fed normal diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. Values are means \pm SEM of eight animals per group. *versus control group; #versus HC group. (P<0.05).

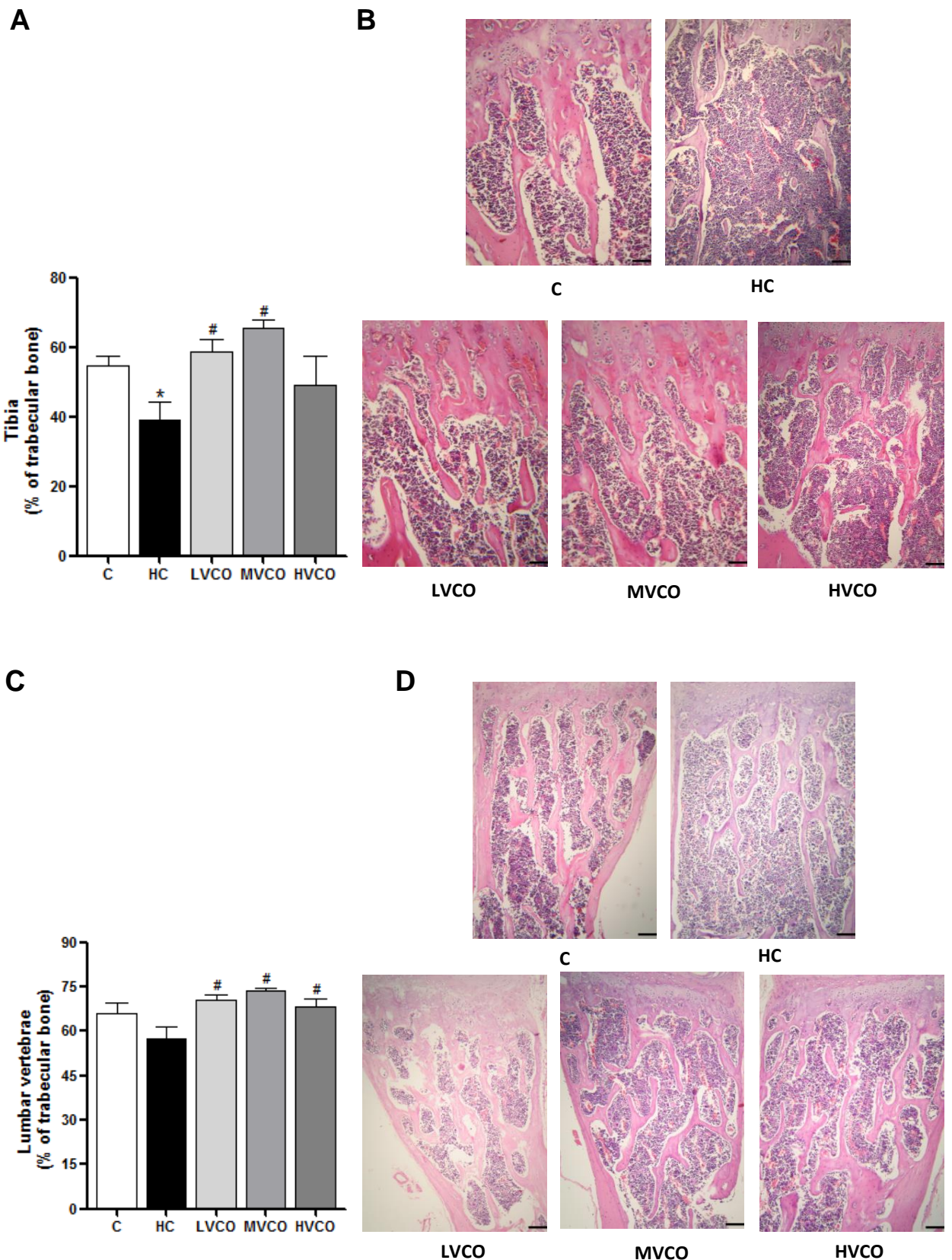


Figure 2. Effect of HC diet and VCO supplementation on percentage of trabecular bone in tibia and in lumbar vertebrae. (A) Percentage of trabecular bone and (B) histological sections of proximal tibia (scale bars represent 100µm). (C) Percentage of trabecular bone and (D) histological sections of lumbar vertebrae (scale bars represent 100µm). Analysis were performed in mice fed normal diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 1000 (LVCO), 3000 (MVCO) or 9000 (HVCO) mg/kg BW of VCO. Values are means \pm SEM of eight animals per group. *versus control group ; #versus HC group. ($P < 0.05$).

VCO supplementation improves femur bone parameters analyzed by Micro CT

Aimed to understand the way by which VCO supplementation affects systemic bone integrity, we choose one bone site (metaphyseal region of femur) to investigate several bone parameters. Since there were no significant differences among groups supplemented with low or medium dosages of VCO, in terms of percentage of trabecular bone in long bones (tibia and femur) and lumbar vertebrae, we choose only one experimental group (MVCO: 3000 mg/kg BW dosage of VCO), to perform such analysis.

HC diet induced osteopenic effects on femur as demonstrated by a decrease in multiple bone parameters: BMD (Fig. 3A), BV/TV (Fig. 3B), Tb.Th (Fig. 3D) and a increase of Tb.Pf (Fig. 3F). There was no statistically significant difference in BV parameter (Fig. 3B), between the groups. VCO supplementation induced an improvement of femur microarchitecture, compared with HC group, since it leads to a higher BMD (Fig. 3A), BV/TV (Fig. 3C) and Tb.Th (Fig. 3D). There were no changes in BV parameter (Fig. 3B) between the groups.

In order to understand whether the HC diet-induced femur damage impacted mechanical resistance, a three-point bending flexural test was performed. The maximum load to fracture (Fig. 3G) and the femoral stiffness (Fig 3H) were reduced in mice fed with HC diet. VCO consumption did not prevent these alterations (Fig 3G, H).

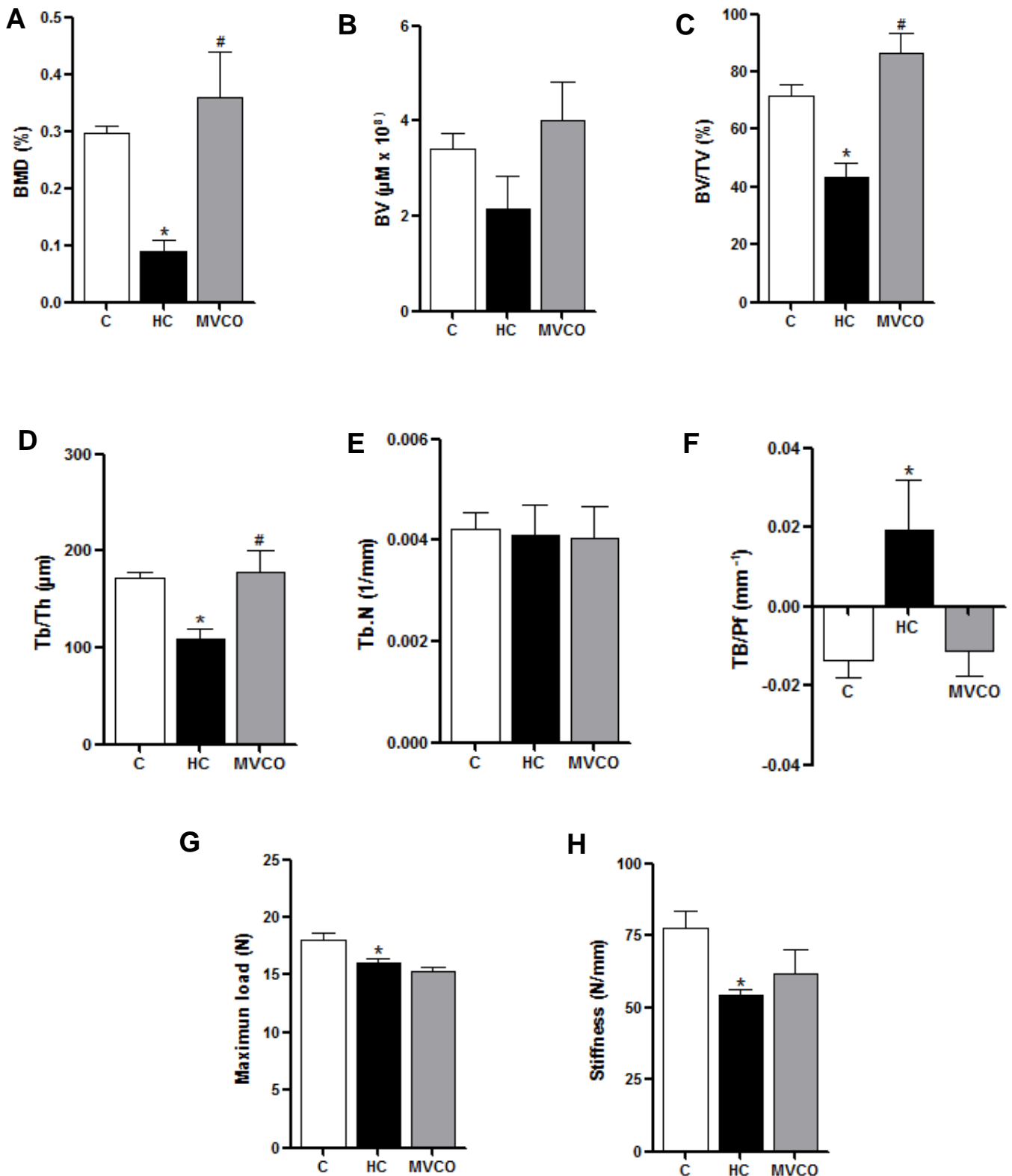


Figure 3 – Micro-CT analysis of trabecular bone in the femur. (A) Bone mineral density (BMD), (B) bone volume (BV), (C) trabecular bone volume fraction (BV/TV), (D) trabecular thickness (Tb.Th), (E) trabecular number (Tb.N), (F) trabecular pattern factor (Tb.Pf), (G) bone maximum load and (I) stiffness in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 3000 mg/kg BW of VCO (MVCO). Values are means \pm SEM of five animals per group. *versus control group; #versus HC group. $P < 0.05$.

Since VCO supplementation ameliorated the bone mass and structure of femur, we decided to evaluate whether this effect also happened on alveolar bone.

Indeed, HC diet induced detrimental effects on alveolar bone in maxillae, as demonstrated by a decrease in: BMD (Fig. 4A, 5B), Tb.Th (Fig. 4G), and Tb.N (Fig. 4H). Furthermore, it was also observed an increased alveolar bone loss (Fig. 4C, 4D), and TB.Pf (Fig.4I) in HC diet-fed mice. The addition of VCO in HC diet reversed the osteopenic effects on alveolar bone, since it promoted an increase in bone parameters, such as BMD (Fig. 4A, 5B) and Tb.Th (Fig. 4G). It was also observed lower alveolar bone loss (Fig. 4C) and TB.Pf (Fig.4I) in MVCO group, in comparison with HC group.

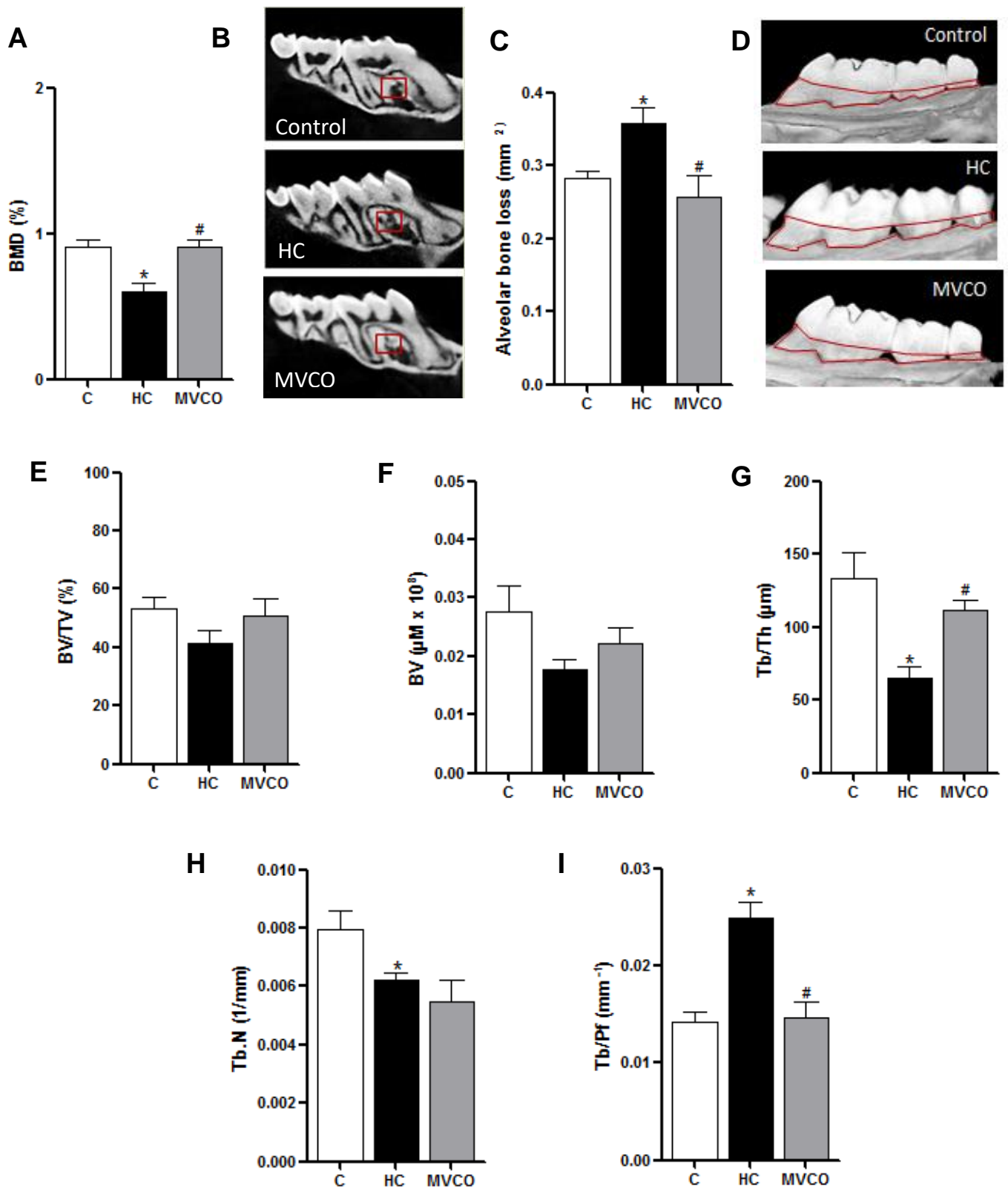


Figure 4 – Micro-CT analysis of maxillary bone. (A) Bone mineral density (BMD), (B) representative images of maxillary (small red squares represents the analyzed region on micro CT), (C) alveolar bone loss, (D) representative images of maxillary (the area outlined between CEJ-ABC represents the area of alveolar bone resorption), (E) trabecular bone volume fraction (BV/TV), (F) bone volume (BV), (G) trabecular thickness (Tb.Th), (H) trabecular number (Tb.N), (I) trabecular pattern factor (Tb.Pf), in mice fed control diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC), HC diet supplemented with 3000 mg/kg BW of VCO (MVCO). Values are means \pm SEM of five animals per group. *versus control group; #versus HC group. P < 0.05.

Aimed to understand the mechanisms involved in beneficial bone effects of VCO supplementation, analysis of molecules involved in bone remodeling were performed.

Although no significant differences in expression of OPG (Fig. 5A), RANK (Fig. 6B), and RANKL (Fig. 5C), among groups, it was observed a higher RANKL/OPG ratio (Fig. 5D) in HC group, when compared with C group. Interestingly, VCO supplementation was sufficient to significantly decrease this ratio (Fig. 5D).

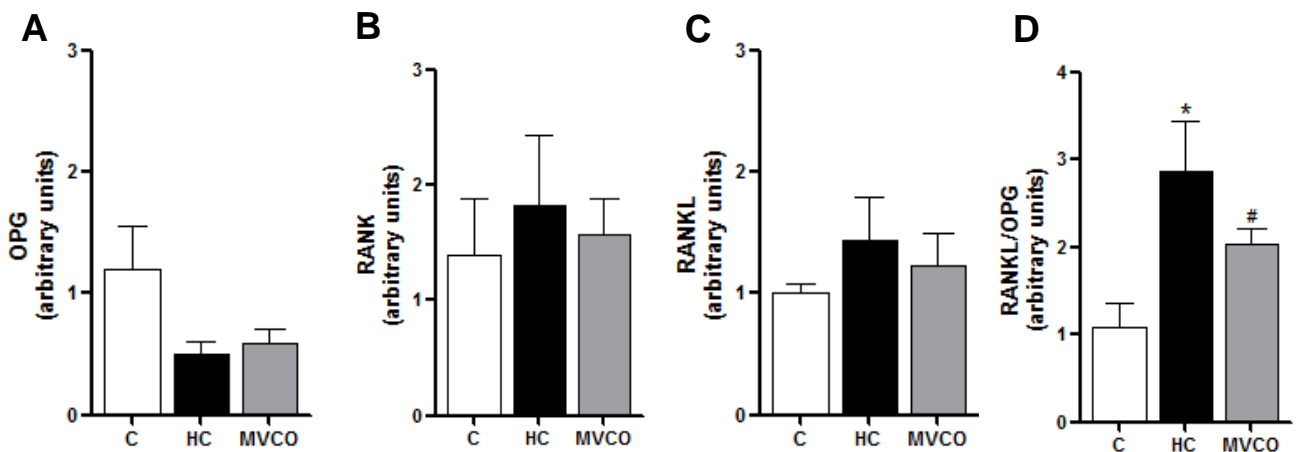


Figure 5. Effect of dietary VCO supplementation in the mRNA expression in the maxilla. (A) mRNA expression of osteoprotegerin, (B) receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) and (C) receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL). (D) RANKL/OPG ratio. Analysis were performed in mice fed normal diet (C), high refined carbohydrate-containing diet (HC) and HC diet supplemented with 3000 mg/kg BW of VCO (MVCO). Values are means \pm SEM of five animals per group. *versus control group ; #versus HC group. $P < 0.05$.

DISCUSSION

Traditionally, obesity has been correlated with greater bone mass. It has been postulated that a higher body weight could impose a high mechanical stress on the bone and, consequently, bone mass increase³⁹. However, many recent experimental and clinical studies⁴⁻¹⁰ have shown that in obesity, there is also an increase in the factors that promote bone catabolism, such as pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β). Therefore, the negative effect of obesity in bone remodeling appears to outweigh the good mechanical effect, which is evidenced by high incidence of deficient organic matrix mineralization, increase of bone fragility and higher risks to bone fractures in obese individuals^{4,5}. The higher production of inflammatory cytokines in obesity could also negatively affect the alveolar bone remodeling¹⁰⁻¹⁷. Therefore, pharmacological and dietary strategies are wanted to treat both obesity and bone dysfunction.

Specific dietary compounds are associated with beneficial effects in obesity and related comorbidities, as well as possible positive effects on bone health. Considering that VCO intake has been associated with body health benefits, due to its antioxidants compounds^{24-27,29} and MCFA, in the present study we evaluated whether VCO intake could be useful to reduce the bone detrimental effects induced by a high-refined carbohydrate (HC) diet in mice. Our results clearly showed that VCO supplementation promotes (i) higher percentage of trabecular bone in tibia, lumbar vertebrae, distal and proximal femur; (ii) improvement of femur microarchitecture and (iii) greater alveolar bone mass and integrity associated with (iv) a lower RANKL/OPG ratio in this bone site.

Our research group has previously showed that HC diet promoted important osteopenic effects in femur and alveolar bone⁵⁴. The most plausible explanation for those bone detrimental effects are metabolic and inflammatory disturbances associated with HC diet consumption^{38,39}. Herein, we have once again confirmed the bone dysfunction induced by HC diet. In fact, the increased leukocytes rolling and levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in adipose tissues, as well as an imbalance of serum concentrations of adipokines (leptin and adiponectin), are outcomes of HC diet consumption^{38,39}, that could be related with detrimental bone effects. The association between obesity and osteopenic effects is partially explained by the existence of a common stem cell precursor that leads to the differentiation of both adipocytes and osteoblasts. The balance of such differentiation is regulated by several interacting pathways^{6,7,8}. Halade et al. (2011)⁷ showed that an increased production of inflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α) as a result of obesity, in mice, promotes higher adipogenesis and lower osteoblasts differentiation in femur. These effects were demonstrated by up-regulation of cathepsin k (an osteoclast gene marker) and RANKL expression, and down-regulation of RUNX2/Cbfa1, a transcription factor for osteoblasts differentiation. Detrimental effects of obesity on bone metabolism also affect alveolar bone. Fujita et al. (2015)²¹ showed that obesity triggers mandibular osteoporosis and also increases the risk of spontaneous periodontal disease in mice. Enhancement of neutrophil recruitment and oxidative stress, as well as decrease in antioxidant enzymes in gingival tissue, as a result of adiposity gain, promote harmful effect on periodontal health²⁸.

Herein, our main purpose was to investigate whether dietary VCO could also be an effective strategy to treat or attenuate some bone damage induced by obesity. Indeed VCO promotes an increase of trabecular bone in tibia, lumbar vertebrae and

proximal and distal femur, as well as an improvement of femur microarchitecture demonstrated by a higher BMD, and by an increased BV/TV and Tb.Th parameters.

VCO intake contributes not only to long bone maintenance but also to a greater alveolar bone mass. The maxilla integrity was also improved by VCO supplementation, once it induced increase of BMD and Tb.Th, lower alveolar bone loss and TB.Pf parameter. These effects on alveolar bone were associated with a lower RANKL/OPG ratio in this bone site.

One hypothesis to explain the improvement of bone mass induced by VCO can be its beneficial effect over the intermediary metabolism and inflammation. In fact, previous data from our group showed that VCO supplementation promoted lower adiposity gain and amelioration of related metabolic and inflammatory disorders⁵³. VCO fed mice presented lower levels of pro-inflammatory cytokines and leukocytes rolling in epididymal adipose tissue and lower systemic inflammation. Additionally, it also reduced the number of circulating leukocytes, including both mononuclear and polymorphonuclear circulating cells⁵³. The lower inflammatory response in VCO fed mice could be due to its effect over adiposity, since the expansion of visceral fat tissue produces higher recruitment of leukocytes and a wide range of inflammatory mediators^{1,2}. The significantly presence of phytochemicals (vitamin E, carotenoids and polyphenols) in VCO^{24-26,28,29} may have contributed to decreased lower inflammatory milieu in adipose tissue. These beneficial effects of VCO over obesity may be associated with the improvement of bone health in VCO fed mice showed herein.

Inflammation induces bone resorption and impairs osteoblastogenesis^{6,7,8}. Thus the control of the inflammatory response may be important to prevent bone detrimental effects. Accordingly, Sugiura et al. (2012)¹⁹ showed that serum levels of

antioxidant and anti-inflammatory carotenoids are inversely associated with lower radial BMD in post-menopausal female subjects. Muhammed et al. (2013)²⁰ demonstrated that tocotrienol supplementation, in postmenopausal women, prevented osteoporotic bone loss, and this effect was associated with lower levels of inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-6. Improvement of inflammation is also associated with greater alveolar bone integrity²¹⁻²³. Supplementation of Omega 3, a fatty acid known for its anti-inflammatory property, reduced alveolar bone loss in rats with periodontitis²¹. Tomofuji et al. (2009)²² demonstrated that, in rats with periodontitis induced by ligature placement, cocoa intake prevented alveolar bone loss, through reduction of polymorphonuclear leukocyte infiltration and increase of antioxidant defense in periodontal tissues.

Several studies associate VCO consumption with both antioxidant^{24-27,29} and anti-inflammatory³⁵ effects, which may explain the improvement of bone integrity showed in the present study. Vysakh et al. (2014)³⁵ demonstrated that orally supplementation of polyphenolics isolated from VCO in rats with inflammatory arthritis, inhibits the expression of inflammatory genes such as COX2, iNOS, TNF- α and IL-6 and the concentration of thiobarbituric acid. In a rat model of osteoporosis, the bone histomorphometry of the right femora showed that VCO supplementation prevented bone loss, increased bone volume and trabecular number, and reduced trabecular separation³⁶. Abujazia et al. (2012)³⁷ demonstrated that VCO supplementation prevented lipid peroxidation and increased the antioxidant enzymes in tibia of osteoporotic rats and these effects may be correlated with greater bone maintenance and integrity.

Herein, it was showed that, although VCO intake has increased bone mass and has promoted an improvement of femur bone parameters, their consumption was not sufficient to prevent the loss of femur stiffness induced by HC diet.

The doses that were chosen in this study are in accordance with previous studies²⁹⁻³¹ and only low and medium dosages promotes increased percentage of trabecular bone in all sites analyzed (tibia, distal and proximal femur and lumbar vertebrae). Long-chain fatty acid (LCFA) may enhances osteoclastogenesis by up-regulation RANKL⁵⁰, therefore, the overload of long-chain fatty acid (LCFA), such as miristic, palmitic and stearic (present in approximately 30% of VCO), as a result of a high dosage of VCO, may have contributed for bone detrimental effects.

Improvement of metabolic parameters in VCO fed mice⁵³ could also be positively correlated with the maintenance of bone integrity. The metabolic disarrangement, evidenced by lower glucose tolerance, higher glucose and lipids serum concentration, due to accumulation of adipose tissue contributed to impairment of bone mass in long bones, and also in alveolar bone. Hyperglycemia is known to induce bone disorders, since it is associated with protein glycation, a condensation of glucose with free amino groups, a process that generates the advanced glycation end products (AGE). The interaction of AGEs with their receptors (RAGE) induces oxidative stress and production of pro inflammatory cytokines, which leads to a bone disorders⁸.The detrimental bone effects of hyperglycemia is also observed in alveolar bone¹⁵⁻¹⁷. The higher serum cholesterol also may be associated with bone detrimental effects, especially in alveolar bone. Cavagni et al. (2014)¹⁰ and Tomofuji et al. (2007)¹² showed that hypercholesterolemia in rats was associated with greater alveolar bone loss. Thereby, lower lipids serum and the maintenance of the

glycemic homeostasis in VCO fed animals⁵³ may be correlated with higher integrity of long bones and alveolar bone.

Metabolic disorders, as a result of adipose tissue expansion, are also associated with an imbalance of adipokines (leptin and adiponectin) in serum. However, addition of VCO in HC diet promoted higher serum levels of adiponectin and lower levels of leptin⁵³. Since adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast function and activating osteoblast activity⁵⁰ and ameliorates alveolar bone loss in experimental periodontitis in diet-induced obesity mice⁵¹, the increased levels of this adipokine in animals fed with VCO⁵³ may be associated with greater bones maintenance. Leptin is known to trigger higher inflammatory response³⁹, thus, decreased serum levels of this adipokine in mice that were fed with VCO⁵³ could be associated with lower bone detrimental effects.

Altogether our data showed that VCO supplementation effectively improved bone structure and prevented bone loss in long bones, lumbar vertebrae and alveolar bone, in mice fed HC diet. The beneficial effects of VCO on bone microarchitecture may be associated with the promotion of lower adiposity and also improvement of related metabolic and inflammatory disorders⁵³. The significant content of polyphenols and vitamins in VCO, which exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties, may have contributed to greater bone integrity. Thereby, virgin coconut oil supplementation could be an interesting strategy to prevent bone detrimental effects induced by obesity and its related comorbidities.

REFERENCES

- [1] Mcardle MA, Finucane OM, Connaughton RM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in Endocrinology* 2013; 4: 1–23, 2013.
- [2] Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444: 881–887.
- [3] Furukawa S, Takuya F, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 114: 1752–1761.
- [4] Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research* 2011; 6:1-7.
- [5] Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ. Correlation of Obesity and Osteoporosis: Effect of Fat Mass on the Determination of Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2008; 23:17–29.
- [6] Halade GV, Rahman MM, Williams PJ, et al. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. *Experimental Gerontology* 2011; 46: 43–52.
- [7] Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nature clinical practice. Rheumatology* 2006; 2: 35–43.
- [8] Paula FJA, Rosen CJ. Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54:150–157.
- [9] De Laet C, Kanis JA, Oden A, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: A metaanalysis. *Osteoporos Int*, 2005. 16:1330–1338.

- [10] Cavagni J, Macedo IC, G EJ, et al. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Journal of periodontology* 2015; February: 1–15.
- [11] Fujita Y, Maki K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC obesity* 2015; 3:1-9
- [12] Tomofuji T, Yamamoto T, Tamaki N, et al. Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. *Journal of periodontology* 2009;80:1324–9.
- [13] Muluke M, Gold T, Kiefhaber K, et al. Diet-Induced Obesity and Its Differential Impact on Periodontal Bone Loss. *Journal of Dental Research* 2015; 95: 223 – 229.
- [14] Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares D, et al. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *Journal of Applied Oral Science* 2012; 20: 218–221.
- [15] Li Y, Lu Z, Zhang, X, et al. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *Journal of dental research* 2015; 94: 362–370.
- [16] Levine RS. Obesity, diabetes and periodontitis - a triangular relationship? *British dental journal* 2013; 215: 35–9.
- [17] Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & Metabolism* 2012; 9: 1-13.
- [18] Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013; 24: 613–623.
- [19] Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, et al. High Serum Carotenoids Associated with Lower Risk for Bone Loss and Osteoporosis in Post-

- Menopausal Japanese Female Subjects: Prospective Cohort Study. PLoS ONE 2012; 12: 1–10.
- [20] Muhammad N, Luke DA, Shuid, AN, et al. Tocotrienol supplementation in postmenopausal osteoporosis: evidence from a laboratory study. Clinics 2013; 68:1338–43.
- [21] Steffen MJ, Bhattacharya A, Fernandes G, et al. Omega-3 Fatty Acid Effect on Alveolar Bone Loss in Rats. Journal of Dental Research 2006; 85: 648–652.
- [22] Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, et al. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. The Journal of periodontology 2009; 80: 1799–1808.
- [23] Sanbe T, Tomofuji T, Ekuni D, al. Vitamin C intake inhibits serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone in rats fed on a high-cholesterol diet. Archives of Oral Biology 2009; 54: 235–240.
- [24] Marina A.M, Che Man YB, Nazimah S, Amin I. Chemical Properties of Virgin Coconut Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society 2009;86: 301–07.
- [25] Seneviratne KN, Dissanayake DMS. Variation of phenolic content in coconut oil extracted by two conventional methods. International Journal of Food Science and Technology 2008; 43: 597–602.
- [26] Marina AM, YB Che, Nazimah SAH, Amin I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. International journal of food sciences and nutrition 2009; 60: 914048297:114–123.
- [27] Kumar PKP, Krishna AGG. Physicochemical characteristics of commercial coconut oils produced in India. Grasas Y Aceites 2015; 66: 1–11.

- [28] Dayrit FM, Dimzon IKD, Valde MF, et al. Quality characteristics of virgin coconut oil: Comparisons with refined coconut oil. *Pure and Applied Chemistry* 2011; 83:1789–1799.
- [29] Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 830–835.
- [30] Zakaria ZA, Ahmad Z, Somchit MN, et al. Antihypercholesterolemia property and fatty acid composition of madi-produced virgin coconut oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 4: 636-644.
- [31] Nevin KG, Rajamohan T. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague-Dawley rats. *The European Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2008; 3: 1-8.
- [32] Cardoso DA, Moreira ASB, Oliveira GMM, et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. *Nutrición Hospitalaria* 2015; 32: 2144–2152.
- [33] Assunção ML, Ferreira HS, Santos AF, et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. *Lipids* 2009; 44: 593–601.
- [34] Narayanankutty A, Mukesh RK, Ayoob SK, et al. Virgin coconut oil maintains redox status and improves glycemic conditions in high fructose fed rats. *Journal of Food Science and Technology* 2016; 53: 895–901.
- [35] Vysakh A, Ratheesh M, Rajmohanan TP. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and

- anti-inflammatory action. *International Immunopharmacology* 2014; 20:124–130.
- [36] Hayatullina Z, Muhammad N, Mohamed N, et al. Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*; 2012: 1-8.
- [37] Abujazia MA, Muhammad N, Shuid AN, et al. The effects of virgin coconut oil on bone oxidative status in ovariectomised rat. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012; 2012: 1-6.
- [38] Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques, MCC, et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity* 2013; 21: 396–406.
- [39] Lacerda DR, Serakides RM, Ocarino N, et al. Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. *Experimental Physiology* 2015; 100: 44–56.
- [40] Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, et al. The Effect of High Sugar Intake on the Development of Periradicular Lesions in Rats with Type 2 Diabetes. *J Dent Res* 2003; 82:322-325.
- [41] Baró MA, Rocamundi MR, Viotto OJ, et al. Alveolar wound healing in rats fed on high sucrose diet. *Acta Odontol Latinoam* 2013; 26: 97-10.
- [42] Lima ILA, Macari S, Madeira MFM, Rodrigues LFD, et al. Osteoprotective Effects of IL-33/ST2 Link to Osteoclast Apoptosis. *The American Journal of Pathology* 2015; 185: 3338-3348.
- [43] Macari S, Ajay Sharma L, Wyatt, A, et al. Estrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. *Archives of oral biology* 2015; 60: 333-341.

- [44] Yanagihara GR, et al. High impact exercise in rats prior to and during suspension can prevent bone loss. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* 2016; 49: 5036-43.
- [45] Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, et al. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obesity research* 2003; 11: 734–744.
- [46] Sun H, Jiang T, Wang S, et al. The effect of LXR *alfa*, ChREBP and Elovl6 in liver and white adipose tissue on medium- and long-chain fatty acid diet-induced insulin resistance. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2013; 102: 183–92.
- [47] Clegg ME. Medium-chain triglycerides are advantageous in promoting weight loss although not beneficial to exercise performance. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2010; 61: 653–79.
- [48] Turner N, Hariharan K, Tidang J, et al. Enhancement of Muscle Mitochondrial Oxidative Capacity and Alterations in Insulin Action Are Lipid Species Dependent. *Diabetes* 2009; 58: 2547–54.
- [49] St-Onge MP, Ross R, Parsons WD, et al. Medium-Chain Triglycerides Increase Energy Expenditure and Decrease Adiposity in Overweight Men. *Obesity Research* 2003; 11: 395–402.
- [50] Drosatos-Tampakaki Z, Drosatos K, Siegelin Y, et al. Palmitic acid and DGAT1 deficiency enhance osteoclastogenesis, while oleic acid-induced triglyceride formation prevents it. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014; 29: 1183–1195.

- [51] Oshima K, Nampei A, Matsuda M, et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 331: 520–526.
- [52] Zhang L, Meng S, Tu Q, et al. Adiponectin ameliorates experimental periodontitis in diet-induced obesity mice. *PLoS ONE* 2014; 9: 1-9.
- [53] Zicker MC, Silveira ALM, Lacerda DR, et al. Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice. Manuscript in preparation. 2016.
- [54] Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, et al. The effects of high refined carbohydrate diet on alveolar bone. Manuscript in preparation. 2016.

5. CONCLUSOES INTEGRADAS

As três diferentes marcas de óleo de coco extravirgem comercializadas no Brasil, submetidas a análises bromatológicas, apresentaram, de maneira geral, características físico-químicas que lhes confere qualidade e identidade. Entretanto, é necessário ressaltar que as concentrações de ácidos graxos insaturados (oléico e linoléico) nos produtos analisados apresentaram-se abaixo do que é estabelecido como ideal por Padrões de Identidade e Qualidade internacionais.

O modelo desenvolvido para determinação do índice de acidez de OCEVs por meio da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e quimiometria apresentou elevada capacidade preditiva, o que permite concluir que uma importante característica de identidade e qualidade do OCEV (Índice de Acidez) pode ser determinada por meio de um método mais simples, barato, prático, seguro e rápido, em comparação com o método tradicional de análise (titulação ácido-base).

Em experimentos animais a administração de OCEV para camundongos obesos reduziu o ganho de peso, efeito associado a menor expressão no tecido adiposo epididimal de uma enzima chave na via de lipogênese (Acetil Coa Carboxilase). A suplementação de OCEV promoveu ainda uma redução na inflamação local (no tecido adiposo) e sistêmica e nas alterações metabólicas resultantes do excesso de adiposidade. Em decorrência da suplementação de OCEV ocorreu também um aumento do percentual de osso trabecular da tíbia, vértebras lombares, fêmur proximal e distal nos camundongos. Além disso, o consumo de OCEV promoveu melhora da integridade e aumento da densidade mineral óssea do fêmur e do osso alveolar, sendo que a menor perda óssea alveolar foi associada à redução na relação RANKL/OPG. Sendo assim, conclui-se que a suplementação de OCEV pode ser uma ferramenta em potencial para auxiliar no controle da obesidade e alterações inflamatórias, metabólicas e ósseas associadas.

ANEXO I: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEUA/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 174 / 2012, relativo ao projeto intitulado "AÇÃO ANTIOXIDANTE IN VIVO E IN VITRO DO ÓLEO DE COCO", que tem como responsável Renata Adriana Labanca de Almeida Santos, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 13/08/2012. Este certificado expira-se em 13/08/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 174 / 2012, related to the Project entitled "ANTIOXIDANT ACTION IN VIVO AND IN VITRO COCONUT", under the supervision of Renata Adriana Labanca de Almeida Santos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/08/2012. This certificate expires in 13/08/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 13/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Zicker, Marina Campos.

Z64a

Avaliação do óleo de coco extravirgem no controle da adiposidade e suas comorbidades / Marina Campos Zicker. – 2016.

168 f. : il.

Orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira.

Coorientadoras: Renata Adriana Labanca e

Mila Fernandes Moreira Madeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Óleo de coco extravirgem – Teses. 2. Oleos e gorduras – Metabolismo – Teses. 3. Obesidade – Teses. 4. Alterações metabólicas – Teses. 5. Metabolismo – Distúrbios – Teses. 6. Alimentos – Análise – Teses. I. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. II. Labanca, Renata Adriana. III. Madeira, Mila Fernandes Moreira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 664.07