



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO



DANIELLE MELO DE SOUZA

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO OU NÃO À
ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO DE COCO (*Cocos nucifera* L.) SOBRE O EIXO
ENTERO-HEPÁTICO DE RATOS INDUZIDOS À OBESIDADE**

JOÃO PESSOA

2023

DANIELLE MELO DE SOUZA

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO OU NÃO À
ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO DE COCO (*Cocos nucifera* L.) SOBRE O EIXO
ENTERO-HEPÁTICO DE RATOS INDUZIDOS À OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Jailane de Souza Aquino

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kamila Sabino Batista

JOÃO PESSOA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729e Souza, Danielle Melo de.

Efeitos do jejum intermitente associado ou não à administração de óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) sobre o eixo entero-hepático de ratos induzidos à obesidade / Danielle Melo de Souza. - João Pessoa, 2023.
90 f. : il.

Orientação: Jailane de Souza Aquino.
Coorientação: Kamila Sabino Batista.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Jejum - Nutrição. 2. Saúde intestinal. 3. Ácidos orgânicos. 4. Colesterol. 5. Fígado. I. Aquino, Jailane de Souza. II. Batista, Kamila Sabino. III. Título.

UFPB/BC

CDU 613.24(043)

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO OU NÃO À
ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO DE COCO (*Cocos nucifera* L.) SOBRE O EIXO
ENTERO-HEPÁTICO DE RATOS INDUZIDOS À OBESIDADE**

Dissertação Aprovada em 04 / 08 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Jailane de Souza Aquino
Prof.^a Dr.^a Jailane de Souza Aquino
Presidente da Banca Examinadora DN / CCS / UFPB

Kamila Sabino Batista
Prof.^a Dr.^a Kamila Sabino Batista
Co-orientadora INSA / MCTI

Estefânia Fernandes Garcia
Prof.^a Dr.^a Estefânia Fernandes Garcia
Examinador Interno DG / CTDR / UFPB

Nilcimelly Rodrigues Donato
Prof.^a Dr.^a Nilcimelly Rodrigues Donato
Examinador Externo DN / CES / UFCG

AGRADECIMENTOS

Com o coração imensamente agradecido a Deus pela Sua Infinita e Imensa Misericórdia na minha vida, sem Ele eu nada seria. Agradecida a todos os Anjos do Céu e da Terra, que Deus foi colocando a cada etapa desta linda e longa caminhada.

Eternamente agradecida pela linda e abençoada família que fui presenteada nesta vida, com todo o ensinamento e exemplo de vida através da Pessoa abençoada, incrível, destemida e guerreira, Minha Avó Ana Terdulino de Melo (*in memorian*).

À minha orientadora, professora Dr.^a Jailane de Souza Aquino, que é um verdadeiro anjo de Deus, orientando com tanta paciência e amor. Sempre acreditando na conclusão deste trabalho.

À minha Co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Kamila Sabino Batista exemplo de determinação e exercício constante de Amor ao Próximo.

Aos meus Pais, meus Verdadeiros Anjos da Guarda que sempre com muito Amor e Presença de Deus tiveram e tem a sabedoria para guiar-me e principalmente a ensinar o quanto é fundamental amarmos o próximo.

As minhas irmãs, Dalana e Taciana que foram destinadas a serem minhas companheiras de vida, que conseguimos superar e seguir nesta vida. Aos meus sobrinhos, Miguel e Ana Guilhermina lindos e abençoados anjos em nossas vidas.

Ao meu esposo, Rogério que sempre esteve ao meu lado ajudando-me com as partilhas e apoio incondicional. Aos nossos filhos tão amados e tão queridos, Ana Vitória e Rodrigo Luís presentes e luz divina em nossas vidas.

Professora Dr.^a Estefânia Fernandes Garcia avaliadora interna agradeço imensamente pela disponibilidade e por todas as contribuições tão importantes e sugeridas para o enriquecimento desta produção científica.

À Professora Nilcimelly Rodrigues Donato, tão feliz por você que representa uma parte da minha vida que foi tão importante e tão feliz. Muito obrigada por toda contribuição, tão importante nesse trabalho.

Aos professores parceiros, que contribuíram com minha pesquisa, Dr. Adriano Francisco Alves (DFP/CCS/UFPB) e Dr. Marcos dos Santos (IF-Sertão PE).

A meu parceiro de experimento Hassler Clementino que sem você não teria iniciado e muito menos concluído esse trabalho. Muito obrigada por todas as orientações e ajuda. Você foi fundamental!

À minha parceira de trabalho no Laboratório de Nutrição Experimental -

LANEX, Rosianne Tsujisaki muito obrigada por tudo e principalmente por tornar tudo sempre mais leve pela sua presença.

Aos meus parceiros e amigos de trabalho, técnicos dos laboratórios do Departamento de Nutrição, Guilherme Costa de Oliveira, Heloísa Maria Almeida do Nascimento e Sônia Paula Alexandrino de Oliveira, obrigada por todo apoio, orientação e ajuda na realização das análises.

À Aline Barbosa D'Oliveira e Maria Letícia da Veiga Dutra, na época discente da Iniciação Científica que foram tão importantes para a execução desta pesquisa, e pela amizade. A todos que fazem parte da equipe do LANEX que diretamente ou indiretamente colaboraram durante todo o processo deste experimento.

À Nais Lira Soares pela parceria nas execuções das análises, sempre tão companheira e muito competente.

Aos Laboratórios de Bromatologia (DN/CCS/UFPB) e de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (DN/CCS/UFPB), pelo suporte nas análises da composição proximal da ração, composição corporal e do perfil lipídico.

Ao Programa de Pós de Graduação em Ciências da Nutrição e a Universidade Federal da Paraíba, o meu muito obrigado pela oportunidade ímpar em fazer parte de um Programa de tão grande excelência. À BIOCLIN, que por meio do programa Bioclin Educar forneceu os kits para realização das análises bioquímicas do projeto como um todo.

RESUMO

A obesidade é uma doença caracterizada pelo excessivo acúmulo de gordura corporal que também pode acometer o sistema hepatobiliar e a saúde intestinal. Estratégias nutricionais como a restrição calórica são essenciais na terapêutica da obesidade. Contudo, outras intervenções nutricionais vêm sendo estudadas devido à difícil manutenção da restrição calórica em longo prazo. Dentre elas, estudos conduzidos isoladamente com o jejum intermitente ou a administração de óleo de coco na obesidade tem se popularizado devido aos seus efeitos benéficos na perda de peso e controle metabólico. No entanto, até o momento existe uma lacuna sobre os benefícios destas intervenções associadas. Assim, este estudo se propôs a avaliar o efeito do jejum intermitente (JI) associado ou não ao consumo de óleo de coco (OC) sobre o eixo entero-hepático de ratos Wistar obesos. Cinquenta machos com ± 80 dias de idade foram randomizados em cinco grupos: controle (GC); obeso (GO); e grupos obesos com jejum intermitente (OJI); com jejum intermitente e administração de óleo de coco (OJIOC) e com restrição calórica (ORC). Os ratos do GO, OJI, OJIOC e ORC foram induzidos à obesidade por meio de dieta rica em açúcares e os ratos do GC receberam ração comercial por 17 semanas. Durante as quatro últimas semanas, os grupos OJI e OJIOC foram submetidos ao jejum de 15 h e ORC a uma restrição de 30% do consumo calórico habitual. Os ratos GC e GO consumiram dieta *ad libitum*. O grupo OJIOC recebeu gavagem com óleo de coco (1000 mg/kg de peso corporal), enquanto todos os demais grupos (GC, GO, OJI e ORC) receberam gavagem com soro fisiológico (1mL/dia) também durante as quatro últimas semanas de experimento. Foram avaliados peso, consumo e parâmetros somáticos antes da eutanásia. Após a eutanásia foram analisados: triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e frações; ácidos orgânicos e ácidos biliares fecais, intestinais e hepáticos; análises histológicas do intestino e fígado e contagem de grupos bacterianos fecais. Os protocolos de JI reduziram as concentrações séricas de colesterol total (em média 54,31%), LDL (em média 53,39%) e triglicerídeos (em média 23,94%) em comparação ao GO; e o grupo OJIOC apresentou o maior HDL (em média 38,73%) em comparação a todos os grupos. Menor carga metabólica foi apresentada por OJIOC (em média 28,58 %) e por ORC (em média 48,63 %) em comparação aos demais grupos. OJIOC teve menor excreção fecal de ácidos orgânicos, seguido do grupo OJI, em comparação aos demais. O grupo OJIOC apresentou a maior excreção fecal de TG e CT, enquanto o grupo ORC apresentou maior excreção fecal de ácidos biliares totais. A excreção fecal de TG e CT teve correlação positiva com os TG hepáticos ($r = 0,83$) e CT hepático ($r = 0,79$), respectivamente. ORC mostrou maior excreção fecal de ácido propiônico e de ácido lático em comparação a OJIOC e OJI. A contagem de *Lactobacillus* foi similar entre os grupos, contudo a contagem de *Bifidobacterium* foi menor no grupo ORC em comparação ao OJI e OJIOC. O intestino e o fígado não apresentaram alterações histológicas em nenhum grupo. Os protocolos de jejum associado ao óleo de coco e de restrição calórica apresentaram os melhores efeitos sobre parâmetros do eixo entero-hepático de ratos obesos.

Palavras-chave: ácidos orgânicos; bactérias fecais; colesterol; dieta rica em açúcar; fígado; saúde intestinal.

ABSTRACT

Obesity is a disease characterized by the excessive accumulation of body fat, which can also affect the hepatobiliary system and intestinal health. Nutritional strategies, such as calorie restriction, are essential in the treatment of obesity. However, other nutritional interventions are being studied due to the challenging long-term maintenance of calorie restriction. Among them, studies conducted independently on intermittent fasting or the administration of coconut oil in obesity have become popular due to their beneficial effects on weight loss and metabolic control. However, there is currently a gap in understanding the benefits of these combined interventions. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of intermittent fasting (IF), with or without the consumption of coconut oil (CO), on the enterohepatic axis of obese Wistar rats. Fifty male rats, approximately 80 days old, were randomized into five groups: control (CG); obese (OG); and obese groups with intermittent fasting (OIF); with intermittent fasting and administration of coconut oil (OIFCO); and with calorie restriction (OCR). The OG, OIF, OIFCO, and OCR rats were induced to obesity through a high-sugar diet for 17 weeks, while the CG rats received commercial feed *ad libitum*. During the last four weeks, the OIF and OIFCO groups underwent a 15-hour fasting period, and the OCR group underwent a 30% restriction of habitual caloric intake. The CG and OG rats consumed the diet *ad libitum*. The OIFCO group received gavage with coconut oil (1000 mg/kg body weight), while all other groups (CG, OG, OIF, and OCR) received gavage with physiological saline (1 mL/day) also during the last four weeks of the experiment. Weight, consumption, and somatic parameters were evaluated before euthanasia. After euthanasia, triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and fractions; fecal, intestinal, and liver organic acids and bile acids; histological analyses of the intestine and liver; and counting of fecal bacterial groups were analyzed. The IF protocols reduced serum concentrations of total cholesterol (on average 54.31%), LDL (on average 53.39%), and triglycerides (on average 23.94%) compared to OG, and the OIFCO group showed the highest HDL (on average 38.73%) compared to all groups. OIFCO presented a lower metabolic load (on average 28.58%) and OCR a lower metabolic load (on average 48.63%) compared to other groups. OIFCO had lower fecal excretion of organic acids, followed by the OIF group, compared to the others. The OIFCO group showed the highest fecal excretion of TG and TC, while the OCR group showed higher fecal excretion of total bile acids. Fecal excretion of TG and TC had a positive correlation with hepatic TG ($r = 0.83$) and hepatic TC ($r = 0.79$), respectively. OCR showed higher fecal excretion of propionic acid and lactic acid compared to OIFCO and OIF. The count of *Lactobacillus* was similar between groups; however, the count of *Bifidobacterium* was lower in the OCR group compared to OIF and OIFCO. The intestine and liver showed no histological changes in any group. Intermittent fasting protocols associated with coconut oil and calorie restriction demonstrated the best effects on parameters of the enterohepatic axis in obese rats.

Keywords: cholesterol; fecal bacteria; high-sugar diet; intestinal health; liver; organic acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Registros georeferenciados da espécie <i>Cocos nucifera</i> L. no mundo (1855-2022).....	26
Figura 2 - Produção em toneladas da coco-da-baía (A) e valor da produção multiplicado por R\$1000,00 (B) no ano de 2017.....	27
Figura 3 - Gaiolas coletivas com grades no assoalho.....	35
Figura 4 - Descrição dos grupos e protocolo experimental.....	37

FIGURAS DO ARTIGO

Fig. 1. Serum lipids (A-D), glycaemia (E) and metabolic load index (F) of rats.....	66
Fig. 2. Triglycerides (A and B), total cholesterol (C and D) and total bile acids (E and F) in liver (A, C and E) and faeces (B, D and F) of rats.....	68
Fig. 3. Bacterial counts in faecal samples of rats.....	69
Fig. 4. Impact of organic acids and sugars on metabolic pathways in faeces (A), intestine (D) and liver (G) of rats.....	73
Fig. 5. Histological sections stained with H&E of the liver (A-E) and intestine (F-J) of rats....	74
Fig. S1. Flowchart of the study design.....	87
Fig. S2. Food (A) and energy intakes (B) before starting interventions; and food (C) and energy intakes (D) during the intervention period.....	88
Fig. S3. Hierarchical grouping based on Pearson's correlation matrix between biological parameters of rats.....	89

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Protocolos de jejum intermitente utilizados em estudos clínicos.....	23
Quadro 2 - Protocolos de jejum intermitente utilizados em estudos não-clínicos com roedores.....	24
Quadro 3 - Estudos em animais obesos com aplicação do óleo de coco.....	30
Quadro 4 - Estudos clínicos em indivíduos com sobrepeso e/ou obesidade com aplicação do óleo de coco.....	31

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 – Composição dos ingredientes e macronutrientes da dieta controle e da dieta rica em monossacarídeos e dissacarídeos utilizados no experimento.....	37
Tabela 2 – Composição da dieta controle e da dieta rica em monossacarídeos utilizados no experimento.....	38
Tabela 3 – Composição de ácidos graxos do óleo de coco virgem usado no experimento.....	39

TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Organic acids and sugars in the faeces, intestine and liver of rats.....	71
Table S1. Ingredients and macronutrients of the control diet and diet rich in sugars which used in the experiment.....	83
Table S2. Organic acids and sugars quantified in the control diet and in the diet rich in sugars which used in the experiment.....	83
Table S3. Fatty acid composition of virgin coconut oil used in the experiment.....	83
Table S4. Somatic parameters of rats.....	84
Table S5. Pathway analysis for organic acids and carbohydrates from the faeces of rats.....	85
Table S6. Pathway analysis for organic acids and carbohydrates from the intestine of rats.....	85
Table S7. Pathway analysis for organic acids and carbohydrates from the liver of rats.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

AGCM – Ácidos graxos de cadeia média

ALT – Alanina aminotransferase

ASMBS – *American Society for Metabolic and Bariatric Surgery*

AST – Aspartato aminotransferase

CC – Circunferência da cintura

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CFN – Conselho Federal de Nutrição

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COVID – Doença do coronavírus

CQ – Circunferência do quadril

CT – Colesterol total

DCNT – Doença crônica não transmissível

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

DN – Departamento de Nutrição

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agropecuária

GC – Grupo controle

GO – Grupo obeso

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de massa corpórea

JI – Jejum intermitente

Kg – Quilogramas

LANEX – Laboratório de Nutrição Experimental

LCD – As dietas de baixa caloria

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

m² – Metros quadrado

NICE – *National Institute for Health and Care Excellence*

OC – Óleo de coco

OJI – Grupo obeso submetido a jejum intermitente

OJIOC – Grupo obeso, submetido a jejum intermitente e administração com óleo de coco

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORC – Grupo obeso com restrição calórica

RC – Restrição calórica

RCQ – Relação cintura quadril

SBEM – Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

SBM – Sociedade Brasileira de Metabologia

TG – Triglicerídeos

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 OBESIDADE	15
2.2 IMPLICAÇÕES DA OBESIDADE NA FUNÇÃO ENTERO-HEPÁTICA	16
2.2.1 Função hepática e intestinal no contexto saúde	16
2.2.2 Implicações da obesidade na função hepática e intestinal	18
2.2 TRATAMENTO DA OBESIDADE	19
2.2.1 Restrição calórica.....	20
2.2.2 Jejum intermitente: protocolos e repercussões fisiológicas	21
2.2.3 Aplicação do óleo de coco virgem no tratamento da obesidade	26
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	34
3.1 TIPO DE ESTUDO	34
3.2 LOCAL DA PESQUISA	34
3.3 ENSAIO BIOLÓGICO.....	34
3.3.1 Comissão de Ética.....	34
3.3.2 Animais.....	35
3.3.3 Dietas	36
3.3.4 Protocolo de jejum intermitente.....	38
3.3.5 Administração com óleo de coco virgem	39
3.3.6 Parâmetros somáticos.....	40
3.3.7 Eutanásia dos animais e coleta de materiais biológicos	40
3.3.8 Perfil lipídico sérico e cálculo da carga metabólica.....	41
3.3.9 Análises de colesterol, triglicerídeos e ácidos biliares hepáticos e fecais	41
3.3.10 Quantificação de ácidos orgânicos ao longo do eixo entero-hepático	42
3.3.11 Contagem de grupos bacterianos intestinais específicos.....	43
3.3.12 Análises histológicas de fígado e intestino	44
3.3.13 Análises estatísticas.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	59
ANEXO.....	90

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como uma doença caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo provocando prejuízo à saúde do indivíduo, como mortes prematuras, perdas na qualidade de vida e limitações funcionais (Bhaskaran *et al.*, 2018; OMS, 2021). A obesidade representa atualmente um dos mais preocupantes problemas de saúde enfrentado pela humanidade, sendo considerada uma epidemia mundial com estimativa de em 2025 atingir 700 milhões de indivíduos da população mundial (Krystoszer *et al.*, 2019). Além disto, no Brasil segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (IBGE, 2019), entre 2003 e 2019 mais que dobrou a incidência da obesidade na população adulta e brasileira passando de 12,2% para 26,8%.

A obesidade é uma doença determinada por variados fatores etiológicos, como inatividade física, aumento da ingestão calórica (Blüher *et al.*, 2019), influências genéticas, psicológicas, culturais e comportamentais (Cockerham, 2022; Hemmingsson *et al.*, 2023). Especialmente estratégias associadas a modificações no estilo de vida e comportamento, alterações nos hábitos alimentares e atividade física compõem um tratamento mais eficiente e eficaz no combate à obesidade e suas comorbidades (Paccosi *et al.*, 2020).

Estudos anteriores indicam que o consumo de dietas com alto teor de açúcares, como mono e dissacarídeos, favorece aumento da absorção e fermentação colônica de polissacarídeos normalmente pouco digeríveis (por exemplo, grandes polissacarídeos, açúcares não absorvidos e álcoois), que resultam em diferentes tipos e concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e, por sua vez, diferentes efeitos locais e sistêmicos (Bruel *et al.*, 2011; Vajro *et al.*, 2013). Em condições fisiológicas e patológicas, como na obesidade, há uma forte inter-relação do sistema hepatobiliar e o intestino (Luoto *et al.*, 2013; Maroni *et al.*, 2020). O fígado é responsável pela secreção biliar com os ácidos biliares e bilirrubinas sendo indispensáveis no processo digestivo de lipídios e vitaminas lipossolúveis e envolvidos na modulação da composição da microbiota intestinal, especialmente no intestino grosso (Hofmann *et al.*, 2007). A microbiota intestinal também pode ser um fator influenciador no desenvolvimento da obesidade, uma vez que uma microbiota intestinal desequilibrada pode resultar no aumento da permeabilidade intestinal e lipogênese. Assim, a comunicação entre sistema hepático, trato gastrointestinal e microbiota intestinal é um sistema complexo, bidirecional e de suma importância para o entendimento da obesidade e seus tratamentos (Moreira *et al.*, 2012).

Na tentativa de minimizar os problemas de saúde relacionados à obesidade é imperativo o desenvolvimento de abordagens cujas ações incluem mudanças no estilo de vida, como dietas

equilibradas, de baixo teor calórico (hipocalóricas) e atividade física regular que também podem influenciar no processo de emagrecimento (ABESO, 2016; OMS, 2021; ABESO, 2022). Sendo a restrição calórica reconhecida como tratamento nutricional padrão ouro que apresenta uma ação efetiva no controle de peso e promoção da saúde em indivíduos obesos (Langeveld, 2015; ABESO, 2022).

Outras estratégias nutricionais vêm sendo aplicadas no tratamento da obesidade, como o jejum intermitente que pode ser uma alternativa para alcançar a perda de peso progressiva em pessoas obesas (Welton *et al.*, 2020). O jejum intermitente é um padrão alimentar compreendido em períodos alternados de alimentação e jejum prolongado (Rynders *et al.*, 2019). Dentre os protocolos de jejum mais utilizados, encontra-se o com alimentação com restrição de tempo, que consiste na prática do jejum por algumas horas alternadas com a ingestão alimentar (Manoogian; Panda, 2017; Jamshed *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016).

Estudos com modelos animais apontam efeito do jejum intermitente na manutenção da saúde ao longo da vida e no tratamento de doenças, como a obesidade (Cabo *et al.*, 2019; Marinho *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Marinho *et al.* (2019) comprovou que o jejum intermitente de 24 h e 24 h de alimentação por 4 semanas influenciou benéficamente o metabolismo e inflamação hepática de camundongos machos que foram alimentados por uma dieta hiperlipídica, tornando-o um fator coadjuvante no tratamento de distúrbios metabólicos a nível hepático como a esteatose. Li *et al.* (2020) observaram que o jejum intermitente diário de 12 h e de 16 h por 30 dias, modulou a composição da microbiota intestinal em camundongos saudáveis. Contudo, até o momento existe uma lacuna em relação aos efeitos do jejum com alimentação com restrição de tempo sobre o eixo entero-hepático.

Em paralelo, observa-se na prática clínica que muitos adeptos do jejum associam este protocolo com o consumo de alguma fonte lipídica. Nesse contexto, o óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) também tem sido alvo de estudo como adjuvante no tratamento da obesidade (Wallace *et al.*, 2019). Estudo prévio mostra que o óleo de coco foi capaz de reduzir o índice de massa corpórea (IMC) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) em adultos obesos que consumiram 12 mL/dia por 45 dias (Vogel *et al.*, 2020). Ademais, apresentou efeito anti-obesidade e melhorou o metabolismo hepático de lipídios e a saúde intestinal de ratos induzidos à obesidade via dieta hipercalórica. Tais efeitos estão associados ao perfil de compostos fenólicos e a alta concentração de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) presentes no óleo de coco que estão envolvidos na redução do tecido adiposo e modulação do perfil lipídico e glicídico, impactando positivamente na perda de peso (Vasconcelos *et al.*, 2022; Vasconcelos *et al.*, 2023).

Entretanto, embora o jejum intermitente seja uma prática comum entre a população, não se tem evidências científicas sobre o impacto do jejum intermitente associado ao consumo óleo de coco frente à obesidade. Dessa forma, a execução desta dissertação teve como objetivo geral, investigar os efeitos do jejum intermitente associado ou não à suplementação com óleo de coco sobre o eixo entero-hepático de ratos *Wistar* induzidos à obesidade em comparação à restrição calórica. E como objetivos específicos: analisar a resposta do tratamento com o jejum intermitente associado ou não ao consumo de óleo de coco sobre: a) a concentração de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade (HDL) e índice de carga metabólica; b) ácidos biliares hepáticos e fecais dos ratos; c) concentração de ácidos orgânicos fecais, hepáticos e intestinais; d) contagem de bactérias fecais e parâmetros histológicos do intestino e fígado dos ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença caracterizada por distúrbio nutricional com acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo sendo um dos mais preocupantes problemas de saúde no mundo devido aos riscos à saúde (OMS, 2021). A obesidade danifica órgãos e sistemas do organismo, como o coração, fígado, rins, articulações e sistema reprodutivo causando uma série de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular cerebral, algumas neoplasias e alterações mentais (Ryu *et al.*, 2019).

Ressalta-se que mais de 2,5 milhões de pessoas morrem a cada ano por causa do sobrepeso e obesidade, assim essa condição toma proporções epidêmicas (OMS, 2021). Nos últimos treze anos, houve aumento de 72% de casos de obesidade em brasileiros de todas as faixas etárias, dos quais 19,8% da população adulta em estado nutricional de obesidade e 55,4% com sobrepeso (VIGETEL, 2018; ABESO 2022).

O grau da obesidade é amplamente medido pelo índice de massa corporal (IMC), desenvolvido por Adophe Quetelet (Machann *et al.*, 2013). Mctigue *et al.* (2006) constataram que o diagnóstico da obesidade em adultos pode ocorrer através das medidas antropométricas, como o IMC, uma vez que tem forte relação com o estado de saúde. Parâmetros adicionais como as medidas de circunferência da cintura (CC) e de quadril (CQ) e cálculo da relação cintura quadril (RCQ) que são aplicados como coadjuvantes na antropometria, sendo úteis na avaliação de risco cardiometabólico e distribuição da gordura (Al-Domi *et al.*, 2019).

O IMC é obtido ao dividir o peso em quilogramas (kg) pelo quadrado da altura em metros (m²). De acordo com a classificação estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) e por Vecchié *et al.* (2018), um resultado entre 25 e 29,9 kg/m² indica sobrepeso, de 30 a 34,9 kg/m² corresponde à obesidade grau I, de 35 a 39,9 kg/m² indica obesidade grau II e um valor acima de 39,9 kg/m² representa obesidade grau III.

O desequilíbrio energético ocasionado pelo aumento da ingestão de alimentos e bebidas ultra processados, hipercalóricos, ricos em gorduras, açúcares refinados e pobres em nutrientes como as fibras; e ainda, a redução da atividade física levando ao sedentarismo, resultam num balanço energético positivo crônico (Ladabaum *et al.*, 2014; Heymsfield *et al.*, 2017). Além desses fatores ambientais, a obesidade sofre influências de fatores socioeconômicos e genéticos (Chooi *et al.*, 2019). Diante dos altos custos de saúde envolvidos no tratamento da obesidade

(Biener Gadde *et al.*, 2018) e pela forte relação com o elevado risco para desenvolvimento de outras DCNT, tem-se buscado inúmeras estratégias preventivas e curativas para a doença (Inoue *et al.*, 2018).

O balanço energético positivo é ocasionado pelo maior consumo de alimentos e menor gasto energético, sendo o excesso de energia estocado sob a forma de triglicerídeos no tecido adiposo (Wang *et al.*, 2016). O aumento do tecido adiposo é estimulado pelos processos de hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (Pellegrinelli *et al.*, 2016). O tecido adiposo durante a fase pós-prandial com auxílio da insulina capta e oxida a glicose e capta ácidos graxos circulantes para produção de triglicerídeos (lipogênese) com consequente desativação da lipólise nos adipócitos (Kahn *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2021). Neste sentido, é fundamental entender as implicações que a obesidade acarreta no organismo, principalmente na função entero-hepática.

2.2 IMPLICAÇÕES DA OBESIDADE NA FUNÇÃO ENTERO-HEPÁTICA

2.2.1 Função hepática e intestinal no contexto saúde

A função hepática e intestinal desempenha um papel importante na manutenção da saúde global do organismo humano. Exercendo papel essencial em diversas funções vitais, incluindo: metabolização de nutrientes, síntese de proteínas, desintoxicação de substâncias prejudiciais e gliconeogênese, responsável por manter a glicemia durante o estado de jejum (Dufour, 2009; Liu *et al.*, 2014).

O fígado desempenha uma função importante no metabolismo lipídico, processando os lipídios provenientes da dieta e sintetizando colesterol, triglicerídeos e lipoproteínas (Liu *et al.*, 2014). Também responsável pela produção de ácidos biliares a partir do colesterol, que são secretados na bile, facilitando a absorção de gorduras dietéticas e das vitaminas lipossolúveis (Yip *et al.*, 2021). As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são importantes marcadores da avaliação da saúde hepática e quando apresentam concentrações elevada, acima dos valores de referência, podem indicar danos teciduais e doença no fígado (Lippi *et al.*, 2019).

Juntamente com a função hepática, o papel do intestino na homeostase corporal é essencial à manutenção de uma microbiota intestinal equilibrada desempenha um papel fundamental na saúde sistêmica (Lynch; Pedersen, 2016). A microbiota intestinal é constituída em cerca de 80 trilhões de bactérias, formando um sistema complexo que exerce funções vitais,

incluindo a regulação do metabolismo do hospedeiro, o funcionamento adequado da barreira intestinal e a modulação do sistema imunológico (Wang; Wang, 2016). Existem mais de 100 espécies de bactérias diferentes presentes no intestino, e a quantidade de células bacterianas supera em cerca de dez vezes o número de células humanas do corpo (Lozupone, 2012).

Em uma situação de normalidade, os *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, dois grupos bacterianos predominantes no intestino humano, desempenham funções específicas. Sendo os *Firmicutes* responsáveis pela fermentação das fibras dietéticas, com a produção dos ácidos graxos de cadeia curta e regulação do metabolismo energético. Por outro lado, os *Bacteroidetes* estão envolvidos na degradação dos polissacarídeos complexos auxiliando na regulação do sistema imunológico e da inflamação. O equilíbrio e a diversidade adequados entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são essenciais para garantir uma função intestinal normal (Jandhyala *et al.*, 2015; Ndeh; Gilbert, 2018).

No trabalho desenvolvido por Rosenbaum (2015) foi visto que a microbiota intestinal participa diretamente no processo de metabolização da energia proveniente da dieta, especialmente no que diz respeito às fibras dietéticas não indigeríveis, compostas por polissacarídeos e oligossacarídeos. Esses componentes são convertidos pelas bactérias intestinais em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, propionato e butirato. Os AGCC podem ser absorvidos pelo intestino ou excretados nas fezes. E após a sua absorção, eles podem induzir a lipogênese, estimulando a produção de gordura, e aumentar o armazenamento de triglicerídeos por meio das vias moleculares específicas. Neste sentido, a microbiota intestinal tem um papel destacado na regulação do metabolismo energético e na manutenção do equilíbrio energético do organismo.

O intestino e o fígado estabelecem uma comunicação bidirecional extensiva por meio dos ductos biliares, da veia porta e do organismo, configurando o eixo intestino-fígado ou entero-hepático (Tripathi; Debelius; Brenner, 2018; Chopyk; Grakoui, 2020). O fígado, além de sua função como glândula digestiva, desempenha um papel crucial como tecido, recebendo uma dupla infusão das artérias hepáticas e da veia porta hepática. Aproximadamente 80% do fornecimento sanguíneo do intestino passa pelo sistema portal hepático, caracterizado pela presença significativa de produtos bacterianos. O fígado possui grande quantidade de células imunes inatas que respondem a processos de infecção por patógenos que ingressam no organismo pelo trato gastrointestinal. Em condições normais, a manutenção do equilíbrio no eixo entero-hepático é imprescindível na preservação da adequada função hepática e intestinal, uma vez que alterações na homeostase intestinal pode acarretar alterações no estado imunológico e favorecendo o desenvolvimento das doenças hepáticas (Berg, 1999; Oda;

Yokomori; Han, 2003). Essas informações ressaltam a importância do entendimento quanto ao papel do eixo intestino-fígado no contexto da aplicação do jejum intermitente associado à administração de óleo de coco virgem.

2.2.2 Implicações da obesidade na função hepática e intestinal

Estudos mostram que doenças hepáticas como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e intestinais como a doença inflamatória intestinal são comorbidades associadas à obesidade (Seminario *et al.*, 2015; Polyzos *et al.*, 2019). A doença hepática gordurosa não alcoólica apresenta elevado percentual de morbimortalidade, sendo caracterizada como a progressão da esteatose hepática que é o acúmulo exacerbado de triglicerídeos nos hepatócitos advindos da alimentação e corrente sanguínea. Na DHGNA ocorre maior lipólise e menor absorção dos ácidos graxos livres pelo tecido adiposo subcutâneo.

Por sua vez, a doença inflamatória intestinal, a exemplo da colite ulcerativa e da doença de Crohn, é caracterizada pela presença de inflamação crônica na mucosa do intestino, cuja origem ainda não é completamente compreendida, mas que pode estar associada à obesidade (Actis *et al.*, 2019; Malekzadeh *et al.*, 2016). A doença inflamatória intestinal tem um efeito pró-inflamatório abrangente e diversos estudos epidemiológicos apontam que uma proporção considerável, variando de 15% a 40%, dos pacientes com doença inflamatória intestinal também são obesos (Seminario *et al.*, 2015).

A obesidade desempenha um papel no desenvolvimento ou agravamento das doenças hepáticas e intestinais. Desta forma, é crucial manter a investigação contínua dessa relação para obter uma compreensão completa de sua natureza e suas implicações clínicas (Kim; Oh; Yoo, 2023).

O trato gastrointestinal é fundamental e responsável na digestão e absorção dos nutrientes dos alimentos exercendo papel importante no processo de eliminação dos resíduos e patógenos, como também na manutenção da diversificação da microbiota intestinal (Prochera; Rao, 2023). Uma alimentação desequilibrada como uma dieta hiperlipídica e/ou rica em açúcares, em consonância a fatores genéticos, idade, sexo e IMC, podem repercutir negativamente na composição da microbiota intestinal (Stephens *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2023).

A microbiota intestinal desempenha um papel essencial no desenvolvimento e no controle da obesidade, além de influenciar a perda de peso. A disbiose, que se caracteriza pelo desequilíbrio da composição microbiana, tem sido associada à patogênese da obesidade (Polliti *et al.*, 2023), tanto em estudos clínicos quanto em modelos animais (Polliti *et al.*, 2023; Li *et*

al., 2022). Esse desequilíbrio interfere nos mecanismos envolvidos na homeostase energética, absorção de nutrientes, regulação do apetite, vias inflamatórias e até mesmo na produção de pequenas moléculas que afetam o metabolismo (Stanislawski *et al.*, 2021).

A disbiose intestinal acarreta danos à barreira intestinal com translocação de bactérias patogênicas e/ou seus componentes como o lipopolissacarídeo bacteriano, que causam processo inflamatório e oxidativo em nível sistêmico e, danos nos metabolismos lipídico, glicídico e de ácidos biliares (Liu *et al.*, 2017)).

Considerando a disbiose entérica como um biomarcador bem estabelecido para doenças crônicas, incluindo o excesso de adiposidade e outras síndromes metabólicas (Bohan *et al.*, 2019), fica claro que as alterações nas comunidades microbianas, resultantes da dieta, desempenham um papel crucial como fatores regulatórios. A microbiota intestinal é altamente sensível às escolhas alimentares e aos hábitos do hospedeiro (Wu *et al.*, 2011; Barton *et al.*, 2018; Bowyer *et al.*, 2018), podendo influenciar significativamente o controle energético do hospedeiro durante o jejum intermitente (Rong *et al.*, 2021). Um estudo realizado por Crawford *et al.* (2009) revelou que o jejum intermitente estimula a expressão da cetogênese hepática, uma via metabólica dependente da comunidade microbiana intestinal.

Diante do crescente aumento da obesidade na população mundial, afetando 650 milhões dos adultos, torna-se indispensável à investigação de alternativas eficientes na prevenção e tratamento da obesidade e sobrepeso (OMS, 2021), uma vez que são fatores desencadeantes de DCNT, como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e neoplasias (Sowah *et al.*, 2022) e para o agravamento de infecções virais, como a COVID-19 (OPAS, 2022).

2.2 TRATAMENTO DA OBESIDADE

Diante do reconhecimento da obesidade como problema de saúde pública e suas implicações (Curry *et al.*, 2018), se faz necessário elencar alternativas, como exemplo uma intervenção dietética associada a uma atividade física, que colaborem no seu tratamento e/ou otimizem novas terapias (Flegal *et al.*, 2019) que por sua vez, contribuam com a redução da mortalidade em adultos obesos e a perda de peso (Polyzos *et al.*, 2019).

O tratamento da obesidade é de alta complexidade e um grande desafio devido à gravidade da doença (Matías-Pérez *et al.*, 2022). Mesmo as primeiras opções de tratamento sendo as intervenções na dieta com um plano alimentar saudável e no estilo de vida caracterizado pela: diminuição da ingestão calórica, aumento da atividade física, realização de

terapia comportamental, ainda assim, pode ser ineficazes na obesidade em longo prazo (Alberti, 2019; Hemmingsson *et al.*, 2023). A restrição calórica é o protocolo tradicionalmente adotado na prática clínica do tratamento da obesidade. Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO, 2016) a restrição calórica consiste na oferta de uma dieta com 1000 a 1200 kcal/dia com perda de 7 a 13 kg e uma redução de 10 cm na gordura abdominal. Tendo também a recomendação da Sociedade Brasileira de Metabologia (SBM, 2010) que consiste numa redução de 500 a 1000 kcal por dia, com 15 a 20% correspondendo às proteínas, 50 a 55% de carboidratos e até 30% para as gorduras.

Uma das alternativas dietéticas que se tem visto um considerável aumento na sua prática entre a população e a prescrição por profissionais visando a redução do peso é o jejum intermitente (JI) (Spezani *et al.*, 2020). O JI é uma estratégia alimentar que consiste na prática do jejum de alimentos com revezamento de períodos com a ingestão de calorias, sendo utilizado no controle do peso em pessoas obesas (Patterson; Sears, 2017).

Outra prática não farmacológica é a inserção de alimentos na dieta que apresentem bioatividade frente à obesidade. Dentre eles, o óleo de coco que vem ganhando destaque em estudos clínicos (Oliveira-de-Lira *et al.*, 2018; Vogel *et al.*, 2020; Nikooei *et al.*, 2021) e não clínicos (Zicker *et al.*, 2019; Stroher *et al.*, 2020; Shetty *et al.*, 2022; Vasconcelos *et al.*, 2023) no combate e controle da obesidade.

2.2.1 Restrição calórica

A restrição calórica é amplamente reconhecida como uma intervenção nutricional eficaz no controle de peso e na promoção da saúde. Consiste em reduzir a ingestão de energia abaixo do nível *ad libitum*, o que significa consumir menos calorias do que o necessário para manter o peso corporal atual, com uma diminuição de pelo menos 10% de calorias em estudos clínicos e geralmente acima de 20% em estudos com roedores (Le Bourg, 2010).

As dietas de baixa caloria (LCD - low calorie diet), de acordo com a *Academy of Nutrition and Dietetics* (ADA), são geralmente caracterizadas por uma proporção equilibrada de proteínas, carboidratos e gorduras em quantidades reduzidas, visando uma ingestão de energia geralmente acima de 800 kcal/dia. Para mulheres, é comum que essa faixa de calorias varie de 1.200 a 1.500 kcal/dia, enquanto para homens varia de 1.500 a 1.800 kcal/dia (Raynor, Champagner, 2016; ADA, 2021).

Essas dietas buscam um déficit energético diário de aproximadamente 500 a 750 kcal, o que representa uma redução de 20% a 30% das necessidades energéticas. Além da restrição

calórica, é recomendada a adoção de uma abordagem abrangente que inclua mudanças no estilo de vida, conforme sugerido pela ABESO (2016) e o *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE, 2020).

A ABESO (2022) destaca a importância das dietas de baixa caloria no tratamento da obesidade, recomendando sua implementação em conjunto com mudanças no estilo de vida. Essa abordagem é classificada como Classe de Recomendação I, com Nível de Evidência A, ressaltando a robustez e a confiabilidade das evidências que a apoiam.

Portanto, a restrição calórica é amplamente reconhecida como uma recomendação chave para o combate à obesidade e a promoção de um estilo de vida saudável. Seus efeitos benéficos na perda de peso e saúde metabólica fazem dela uma estratégia importante para melhorar a qualidade de vida e prevenir doenças relacionadas ao excesso de peso. Contudo, alguns indivíduos têm dificuldades na manutenção desta estratégia em longo prazo e por este motivo, outras estratégias dietéticas vêm sendo estudadas como tratamento da obesidade (Welton *et al.*, 2020).

2.2.2 Jejum intermitente: protocolos e repercussões fisiológicas

O jejum intermitente (JI) é considerado uma alternativa de estratégia alimentar que intercala períodos de abstinência alimentar com períodos de consumo alimentar por um determinado tempo (Anton *et al.*, 2018; Marinho *et al.*, 2019).

Dentre os variados protocolos de jejum intermitente, têm-se aquele praticado em dias alternados com jejuns de 24 h e seguidos com consumo alimentar nas outras 24 h. Também é praticada a estratégia 5:2 com a prática da ingestão alimentar ocorrendo nos 5 dias da semana intercalando 2 dias de jejum alimentar. Quanto à modalidade de restrição de duração tem-se praticado jejuns de 20 h com 4 h de alimentação; jejum de 16 h com 8 h ou jejum de 15 h com 9 h de alimentação (Green; Bishop, 2019). O JI pode ser praticado com diferentes protocolos, como visto em estudos de modelos clínicos e animais. Os protocolos mais utilizados atualmente tanto em estudos clínicos e em pré-clínicos são exemplificados nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

O JI tem sido associado a uma ampla gama de benefícios para a saúde. Estudos indicam que este protocolo contribui para a redução da inflamação, desempenhando um papel fundamental na prevenção de doenças neurodegenerativas e metabólicas (González *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2021).

Recentes estudos têm demonstrado uma relação significativa entre o JI e a microbiota intestinal. Em pesquisa conduzida por Sun (2018) revelou que o JI teve efeitos benéficos na obesidade em camundongos com disbiose intestinal. Esses resultados sugerem que o jejum pode promover a saúde por meio do microbioma intestinal (Li *et al.*, 2017), influenciando a produção de proteínas antimicrobianas, o pH intestinal e a produção de muco, fatores que impactam o crescimento dos microrganismos (Ward; Coates, 1987; Martens; Chiang; Gordon, 2008; Salzman *et al.*, 2010; Marcobal *et al.*, 2013).

Quadro 1 – Protocolos de jejum intermitente utilizados em estudos não-clínicos com roedores

Referência	População	Tipo de Protocolo	Duração	Resultados
Marinho <i>et al.</i> (2019)	Camundongos	24 horas de jejum alternado com 24 horas de consumo	4 semanas	Redução do índice de adiposidade; Redução dos triglicerídeos e colesterol total e melhora no grau da esteatose hepática.
Li <i>et al.</i> (2020)	Camundongos	Jejum de 12, 16 e 20 horas	30 dias	Alteração na composição microbiota intestinal com aumento de <i>Akkermansia</i> e redução de <i>Alistipes</i>
Spezani <i>et al.</i> (2020)	Camundongos	24 horas de jejum alternado com 24 horas de consumo	4 semanas	Redução da massa corporal; Redução da glicemia, leptina e aumento da adiponectina
Soares <i>et al.</i> (2021)	Ratos Wistar	15 horas de jejum com 9 horas de consumo	4 semanas	Modulação dos parâmetros comportamentais ansiedade e depressão; lesões cerebrais e intestinais.

Quadro 2 – Protocolos de jejum intermitente utilizados em estudos clínicos

Referência	População	Tipo de Protocolo	Duração	Resultados
Zouhal <i>et al.</i> (2020)	Homens obesos N=28	Jejum de 15 a 16 h por dia durante o Ramadã	30 dias	Redução de IL-6 e TNF- α ; Melhora na composição corporal
Arciero <i>et al.</i> (2022)	Homens e mulheres obesos N= 20	Jejum 1 dia por semana e jejum de 3 dias por semana	4 semanas	Perda de peso; Redução da circunferência da cintura, da pressão arterial e os níveis lipídicos séricos.
Madkour <i>et al.</i> (2022)	Homens e mulheres obesos e diabéticos N= 25	Jejum diário de 15 h	23- 25 dias no período Ramadã	Redução do peso; Redução da circunferência da cintura, do colesterol LDL e aumento do HDL.
Hooshir, Yazdani e Jafarnejard (2023)	Mulheres obesos e sobrepesos N= 56	3 dias alternados de jejum de 16 horas com 8 horas de consumo	08semanas	Perda de peso, redução da circunferência do quadril, redução do percentual de gordura corporal

Legenda: IL-6 = interleucina 6; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa; LDL = Lipoproteína de baixa densidade; HDL = Lipoproteína de alta densidade.

Na fisiologia do jejum, após 12 a 36 h, há redução da glicose sanguínea que inicialmente promove a ativação da via da glicogenólise acarretando a redução do glicogênio hepático e há aumento da lipólise nos tecidos adiposos, com degradação dos triglicerídeos formando os ácidos graxos livres e glicerol. O fígado utiliza os ácidos graxos livres e os gliceróis para produção de acetil-CoA e piruvato mediante a respectiva ativação da via da beta-oxidação e glicólise (Green; Bishop, 2019; Westman *et al.*, 2018).

A acetil-CoA durante o período de jejum é direcionada ao processo de síntese dos corpos cetônicos (acetoacetato, beta-hidroxibutirato e acetona) (Lorenzo *et al.*, 2013) que são utilizados pelo cérebro como fonte de energia (Westman *et al.*, 2018). Sendo praticado continuamente, o JI também pode influenciar no processo inflamatório reduzindo marcadores pró-inflamatórios, como as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-6 (Madkour *et al.*, 2022).

Com a crescente popularidade do JI na prática do controle alimentar, muitos estudos clínicos publicados demonstraram seus benefícios, a exemplo da redução do peso corporal; diminuição da glicemia, insulina e pressão arterial; melhora nos perfis lipídicos; redução dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo (Ahmed *et al.*, 2021)

No estudo conduzido por Llewellyn-Waters e Abdullah (2021), o JI foi responsável por alterações na composição e diversidade da microbiota intestinal de homens e mulheres com obesidade, destacando-se o aumento de bactérias benéficas à saúde intestinal, como as pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Além disso, o trabalho realizado por Zouhal *et al.* (2020) demonstrou que o jejum praticado durante o Ramadã, ao longo de 30 dias, também pode resultar em melhorias na redução da composição corporal em homens obesos.

Além disso, no trabalho desenvolvido por Bowen *et al.* (2018), foi observado que o JI em dias alternados realizado por 16 semanas em indivíduos com sobrepeso e obesidade não resultou em melhorias no peso. Em um estudo realizado por Li (2019), foi observado que o jejum intermitente prolongado, com 5 dias consecutivos de jejum seguidos por 5 dias de alimentação livre ao longo de um período de 60 dias, pode resultar em prejuízo na função imunológica do hospedeiro e redução da resistência à invasão bacteriana.

Por outro lado, também foram observados efeitos negativos do JI no organismo, conforme constatado no estudo realizado por Soares *et al.* (2021). Nesse estudo, verificou-se que o JI resultou em lesões no cérebro e no intestino de ratos saudáveis, com alterações histológicas evidentes, incluindo morte neuronal e atrofia das vilosidades intestinais em ratos Wistar submetidos ao jejum com alimentação com restrição de tempo (15 h de jejum e alimentação

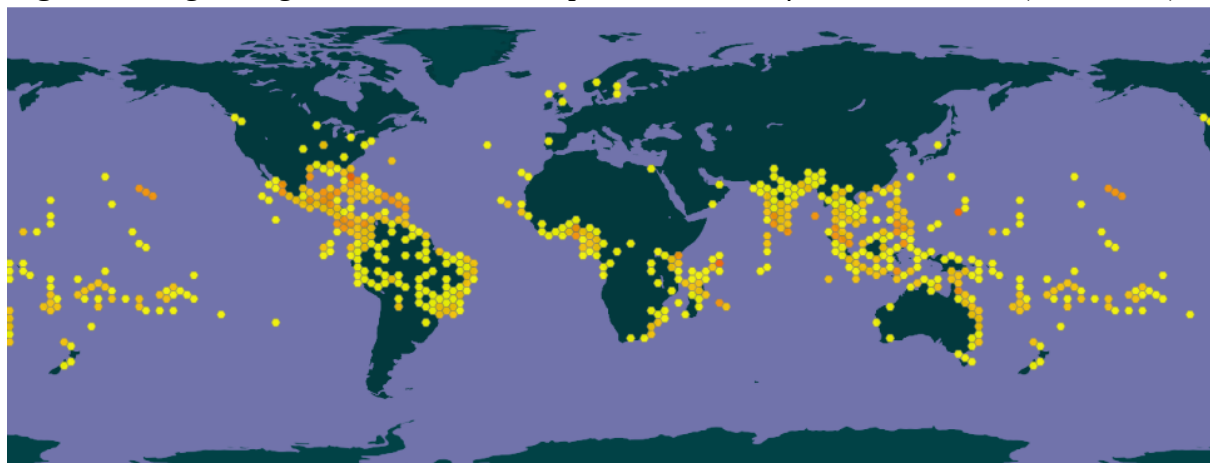
por 9 h), ao longo de um período de 4 semanas. Assim como Dorand *et al.*, (2023) que demonstrou o jejum intermitente aumentou os valores de leptina e reduziu a massa magra, capacidade antioxidante dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos também em ratos saudáveis.

Ainda não está claro se o JI proporciona os mesmos benefícios para a microbiota intestinal e indicadores de saúde comparados à restrição calórica, como mencionado no estudo de Angoorani *et al.* (2021). Muito desta discussão ocorre devido à diversidade de protocolos de JI existentes. Portanto, é essencial realizar mais pesquisas para definir protocolos mais eficazes de JI no contexto da prevenção e controle da obesidade e suas comorbidades. Além disso, existe uma preocupação sobre a segurança dos diversos protocolos de JI em longo prazo (a partir de 12 semanas), pois pode potencialmente ter efeitos prejudiciais e não cumprir o princípio da beneficência, conforme apontado por Munhoz *et al.* (2020) e Abdellatif e Sedej (2020).

2.2.3 Aplicação do óleo de coco virgem no tratamento da obesidade

O coqueiro é uma planta que pertence à família *Arecaceae* e gênero *Cocos* L., palmeira típica dos países tropicais e subtropicais, com origem nas ilhas localizadas nos oceanos Pacíficos e Índico e nos países do sudeste da Ásia (Malásia, Filipinas e Indonésia) (Figura 1) (Lima *et al.*, 2015). No Brasil, país tropical que destina 280 mil hectares do território nacional no plantio do coqueiro sendo destes 80% localizados com predominância na região nordeste (Figura 2), principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Sergipe e Pernambuco representando a mais da metade da produção nacional de coco (EMBRAPA, 2021).

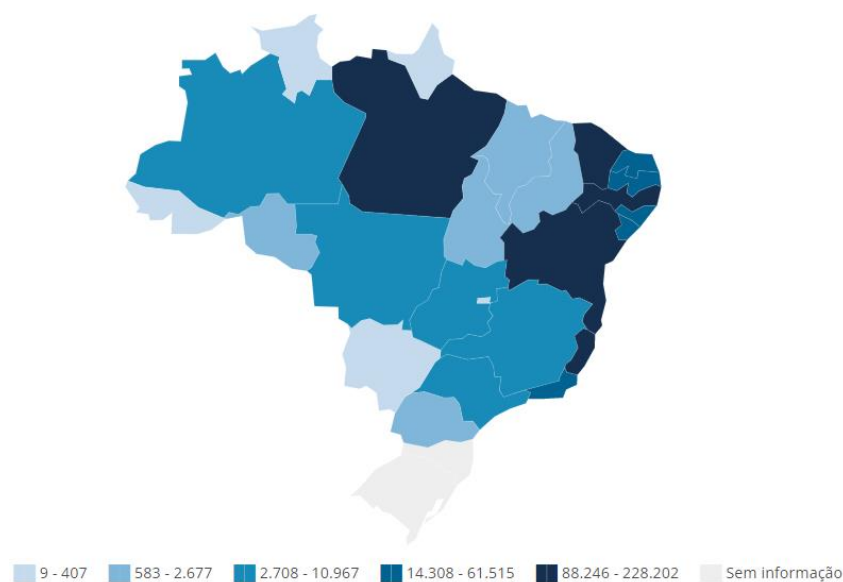
Figura 1– Registros georeferenciados da espécie *Cocos nucifera* L. no mundo (1855-2022).



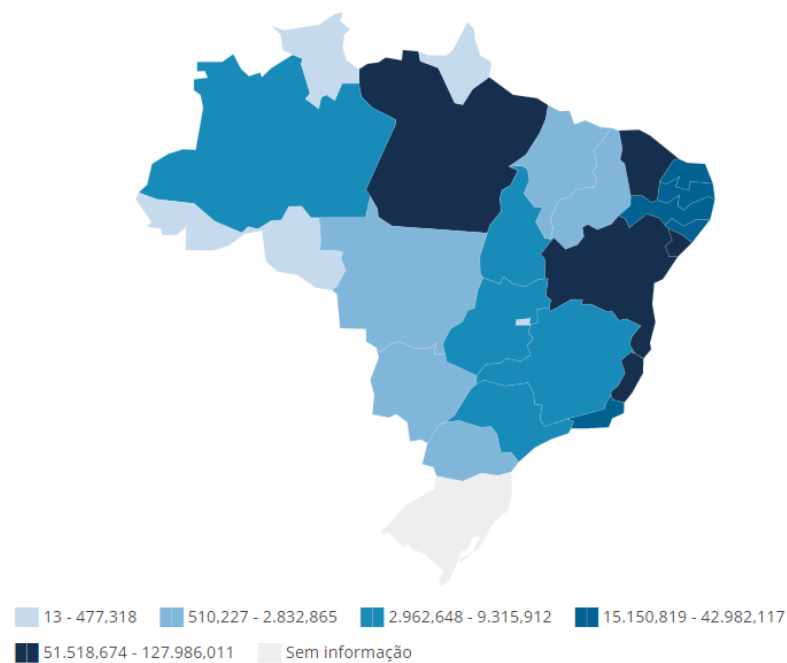
Fonte: GIBF - Global Biodiversity Information Facility (2022).

Figura 2 – Produção em toneladas da coco-da-baía (A) e valor da produção multiplicado por R\$1000,00 (B) no ano de 2017.

(A)



(B)



Fonte: IBGE, 2017.

Do fruto do coco é possível obter a semente chamada de copra (parte seca) que possibilita a elaboração de vários subprodutos, como leite, coco seco e óleo; e a extração do

óleo é feita na copra seca (polpa seca) (Basiron; Yusof; Shahidi, 2005). Sendo assim, dependendo do processo de obtenção aplicado, o óleo de coco virgem é confeccionado a partir da semente do coco seco com extração por meios da prensagem mecânica ou natural com utilização amena ou não do calor, sem ocorrer tratamento químico (refino), branqueamento e desodorização; porém, tendo como alternativa, a extração úmida que mantém uma maior e melhor qualidade do óleo. O óleo de coco extravirgem é o produto adquirido sem o uso de aquecimento, a partir da primeira prensagem da polpa do coco (Villarino *et al.*, 2007; Niki; Noguchi, 2002; Nevin; Rajamohan, 2009).

A composição do óleo de coco virgem é formada por 94,14% de ácidos graxos saturados, 5,5% de ácidos graxos monoinsaturados, 0,83% de ácidos graxos poli-insaturados (Vasconcelos, 2015), e presença de substâncias com ação de antioxidantes como a vitamina E, e polifenóis (Nevin; Rajamohan, 2004).

Entre os ácidos graxos saturados presentes no óleo de coco virgem (compostos por 94,14% do total), os principais componentes são 50,78% de ácido láurico (C12:0), 8,03% de ácido palmítico (C16:0), 18,32% de ácido mirístico (C14:0) e 6,43% de ácido cáprico (C18:0). Quanto aos ácidos graxos monoinsaturados, o destaque é para o ácido oleico (C18:1), que corresponde a 4,99% do total. No grupo dos ácidos graxos poli-insaturados, o ácido linoleico (C18:2) está presente em 0,83% (Vasconcelos *et al.*, 2015).

O óleo de coco apresenta concentrações elevadas dos ácidos graxos de cadeia média láurico (C12:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C18:0) e ácido capróico (C6:0) é visto que esses ácidos podem atuar diretamente na prevenção de doenças inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares e neoplasias (Pant *et al.*, 2023). O ácido láurico tem ação antimicrobiana e antiviral, como também é uma substância de alta digestibilidade (Mansor *et al.*, 2012). Além disso, os ácidos graxos de cadeia média, os quais contêm de 6 a 12 carbonos em sua estrutura química, apresentam ação benéfica sobre a saúde do intestino, uma vez que rapidamente são absorvidos e assim participam diretamente do aumento celular no cólon (Pant *et al.*, 2023).

Mulyadi *et al.* (2018) demonstraram que o óleo de coco virgem exibe compostos bioativos, como os tocoferóis e fenólicos (Marina *et al.*, 2009), os quais têm efeitos benéficos à saúde como ação anti-inflamatória, antioxidantes, quimioprotetoras e anti-hepatoesteatóticas (Illam *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Arsang e colaboradores (2020) com doses de 8 e 10% de óleo de coco virgem adicionado à dieta foram administradas em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica, durante um período de oito semanas foi observada redução nos níveis séricos de

triglicerídeos e colesterol total. Nevin e Rajamohan (2009) observaram que 10 g/kg de peso de óleo de coco virgem por 45 dias preveniu a formação de peróxidos lipídicos, com redução nos níveis de triglicerídeos e LDL em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica.

Recentemente, no trabalho desenvolvido por Vasconcelos *et al.* (2022) constatou-se que ratos Wistar obesos que consumiram óleo de coco extra virgem na dose de 3000 mg/kg de peso num período de oito semanas, apresentaram redução dos triglicerídeos, colesterol total e ácidos biliares hepáticos; aumento da excreção fecal do colesterol total e diminuição da excreção fecal dos triglicerídeos; redução no grau de esteatose hepática e nas concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), TG e LDL.

Contudo, há evidências que o consumo do óleo de coco virgem deve ser feito com cautela, uma vez que também pode prejudicar a saúde, como visto na pesquisa desenvolvida por Ströher e colaboradores (2020) quando ratos Wistar receberam dieta hiperlipídica com ingestão via gavagem de 2 mL/kg de peso corporal de óleo de coco virgem por 28 dias e apresentaram aumento significativo do peso corporal, aumento no parâmetro bioquímico de LDL, AST e ALT, hipertrofia dos adipócitos e acúmulo da gordura hepática. Corroborando com esse estudo, Santos e colaboradores (2019) identificaram que o consumo do óleo de coco deve corresponder dentro do limite dos 10% da ingestão calórica total em humanos, uma vez que não foi visto sua influência direta na termogênese e ou na saciedade, além de aumentar o perfil lipídico do LDL e o CT similar a outros alimentos ricos em ácidos graxos saturados sendo importante a cautela devido a esses efeitos sobre os lipídeos e doenças cardiovasculares.

Estudo prévio do grupo de pesquisa do LANEX/UFPB identificou que o jejum intermitente com o protocolo de alimentação com restrição de tempo (15 h de jejum) associado ao óleo de coco virgem (1000 mg/kg) foi capaz de reduzir o índice de adiposidade, a massa gorda e a hipertrofia dos adipócitos, como também foram percebidas uma melhora no metabolismo da glicose e na sensibilidade à insulina em relação ao grupo de ratos obesos sem tratamento (Cavalcante, 2020).

É possível visualizar estudos que investigaram a relação do efeito do consumo do óleo de coco em modelos animais (Quadro 3). No quadro 4 são apresentados alguns estudos clínicos que analisaram o efeito do consumo do óleo de coco em seres humanos com sobrepeso e ou obesidade.

Quadro 3 – Estudos em roedores obesos com aplicação do óleo de coco

Referência	Animal	Tratamento	Resultados
Adeyemi <i>et al.</i> (2020)	Ratos Wistar obesos com dieta rica em gordura	Com dose de 200 mg/kg de peso corporal de óleo de coco virgem por 4 semanas	Redução de CT, LDL-C, TG e Índice de Lee; Restauração do tecido hepático.
Ströfer <i>et al.</i> (2020)	Ratos Wistar com dieta rica em gordura	Com dose de 2 mL/kg de peso corporal de óleo de coco virgem por 28 dias	Aumento do peso corporal, LDL-C, AST e ALT; Acúmulo da gordura hepática e hipertrofia dos adipócitos; Redução do CT e glicose.
Arsang <i>et al.</i> (2020)	Ratos Wistar com dieta hiperlipídica	Com dose de 8 e 10% de óleo de coco extravirgem misturada diariamente à dieta por 8 semanas	Redução de triglicerídeos e colesterol total
Alatawi <i>et al.</i> (2021)	Ratos Wistar com dieta rica em gordura	Com dose de 10 mg/kg de peso de óleo de coco virgem por 28 dias	Melhora no perfil lipídico e redução dos níveis séricos de glicose
Vasconcelos <i>et al.</i> (2022)	Ratos Wistar com dieta de cafeteria (obesos)	Com dose de 3000 mg/kg de peso de óleo de coco extravirgem por 8 semanas	Efeito antiobesidade; Melhora do metabolismo lipídico (redução colesterol e triglicerídeos), função hepática (redução dos níveis hepáticos de gordura) e controle glicêmico; Não houve melhora no perfil oxidativos dos ratos obesos e nem saudáveis.

Continua

Continuação do **Quadro 3** – Estudos em roedores obesos com aplicação do óleo de coco

Referência	Animal	Tratamento	Resultados
Shetty <i>et al.</i> (2022)	Ratos Wistar albinos com dieta rica em gordura	Com dose de 2 mL/kg de peso corporal de óleo de coco virgem por 49 dias	Redução do VLDL-C e LDL-C; Redução da hipertrofia hepática; Melhora nas anormalidades hepáticas associadas à DHGNA.

Legenda: AST = aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; CT=colesterol total; DHGNA= doença hepática gordurosa não alcoólica; LDL-c= lipoproteína de alta densidade; TG= triglicerídeos; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa

Quadro 4 – Estudos clínicos em indivíduos com sobrepeso e/ou obesidade com aplicação do óleo de coco

Referência	População	Tratamento	Resultados
Valente <i>et al.</i> (2018)	Mulheres com excesso de peso	Com dose de 25 mL de óleo de coco virgem por uma semana	Não alterou: TG, CT, HDL-C, LDL-C.
Oliveira-de-Lira <i>et al.</i> (2018)	Mulheres com obesidade	Com dose de 2g de óleo de coco virgem por 8 semanas	Redução do peso corporal, cintura circunferência, CT, LDL-C e TG; Melhora do HDL-C.

Continua

Continuação do **Quadro 4** – Estudos clínicos em indivíduos com sobrepeso e/ou obesidade com aplicação do óleo de coco

Referência	População	Tratamento	Resultados
Vogel <i>et al.</i> (2020)	Homens adultos obesos	Com dose de 12 mL de óleo de coco extravirgem por 45 dias	Aumento do HDL-C; Redução do IMC e a razão TG/HDL-C.
Nikooei <i>et al.</i> (2021)	Homens e mulheres adultos sobrepeso e obesos	Com dose de 30 mL de óleo de coco virgem por 4 semanas	Aumento do HDL-C, CT e LDL-C; Redução de VLDL, TG.
Meral Koc e Yelmaz (2022)	Homens e mulheres sobrepesos e obesidade	Com dose de 20 mL de óleo de coco por 4 semanas	Redução de CT e LDL-C; Não apresentou efeito nas medidas antropométricas.

Legenda: CT=colesterol total; DHGNA= doença hepática gordurosa não alcoólica; IMC = índice de massa corporal; LDL-c= lipoproteína de alta densidade; TG= triglicerídeos; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa

A popularização do consumo do óleo de coco tem sido baseada nos efeitos dos ácidos graxos de cadeia média com 6 a 12 carbonos em sua estrutura química, que estão mais envolvidos na produção da energia e emagrecimento, o que incentivou a adoção do consumo deste óleo associado ao JI. Refletindo também na prática clínica pela adoção de alguns profissionais da saúde incorporando na sua prescrição o uso do óleo de coco na expectativa de melhoria na perda de peso, melhoria na composição e diversidade da microbiota intestinal e de fatores pró-inflamatórios.

Os resultados apresentados nos Quadros 3 e 4 demonstraram que este o óleo de coco tem efeito na restauração do tecido hepático, na melhoria dos níveis séricos de CT e suas frações, na redução dos TG, nos marcadores antropométricos e na diminuição da inflamação do tecido adiposo, o que fomenta a discussão sobre sua utilização como coadjuvante no tratamento da obesidade. No entanto, é importante destacar a necessidade de cautela em relação à dose e ao tempo de administração, uma vez que há evidências que associam o consumo do óleo de coco ao aumento do perfil lipídico e ganho de peso. Portanto, é essencial considerar cuidadosamente esses aspectos ao utilizar o óleo de coco como parte do tratamento da obesidade.

Sabe-se que o consumo de óleo de coco como estratégia para perda de peso não é recomendado pelas Sociedades e Associações Médicas, incluindo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (2015), a ABESO (2019) e o Conselho Federal de Nutrição (CFN, 2015), uma vez que não há evidências que corroborem a indicação para tal finalidade.

A *American Heart Association* (Associação Americana do Coração) limita o consumo de óleo de coco em até 10% do total de calorias assemelhando-se ao que se refere à ingestão dos ácidos graxos saturados definidos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Diante do número insuficiente de estudos que assegurem a eficiência com segurança à saúde do consumidor e pela forte possibilidade do óleo de coco ser um fator de risco na formação de ateromas nas artérias, e ainda sem ter efeito emagrecedor comprovado, entidades como a Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO, 2016) e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo (SBEM, 2015) também não recomendam a adoção do óleo de coco em prática terapêutica.

É importante ressaltar que o consumo do óleo de coco deve seguir a recomendação N° 2 do Conselho Federal de Nutrição de 21/08/2015, a qual não permite seu uso como tratamento para hipercolesterolemia. Portanto, o consumo desse óleo deve ser realizado em pequenas quantidades, aderindo aos princípios da variedade, equilíbrio, prazer e moderação (CFN, 2015). Com isso, é fundamental ter cautela em relação à dose e à duração do consumo, devendo ser realizada sob orientação profissional para obtenção de melhores resultados na saúde.

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Tratou-se de uma pesquisa de caráter experimental, ensaio pré-clínico ou não-clínico, com ratos Wistar induzidos a obesidade mediante administração de uma dieta rica em mono e dissacarídeos. Posteriormente, os roedores foram tratados com jejum intermitente (JI) associado ou não ao óleo de coco (OC) em comparação à restrição calórica.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

Os ratos Wistar foram provenientes da colônia do Biotério José Paulino localizado no Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (DN/CCS/UFPE). Os ensaios biológicos ocorreram no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde os ratos foram aclimatados previamente antes do início do experimento. As análises da ração e dos materiais biológicos provenientes dos ratos foram realizadas nos seguintes laboratórios:

- Quantificação de ácidos biliares: Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/DN/UFPB, João Pessoa – PB) e Laboratórios de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (DN/CCS/UFPB);
- Quantificação de ácidos orgânicos ao longo do eixo entero-hepático: Laboratório de Análises de Alimentos e Bebidas (Instituto Federal do Sertão de Pernambuco-IF Sertão-PE, Petrolina-PE);
- Microbiota fecal: Laboratórios de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (DN/CCS/UFPB)
- Avaliação histológica do fígado e do intestino: Laboratório de Patologia (DFP/CCS/UFPB).

3.3 ENSAIO BIOLÓGICO

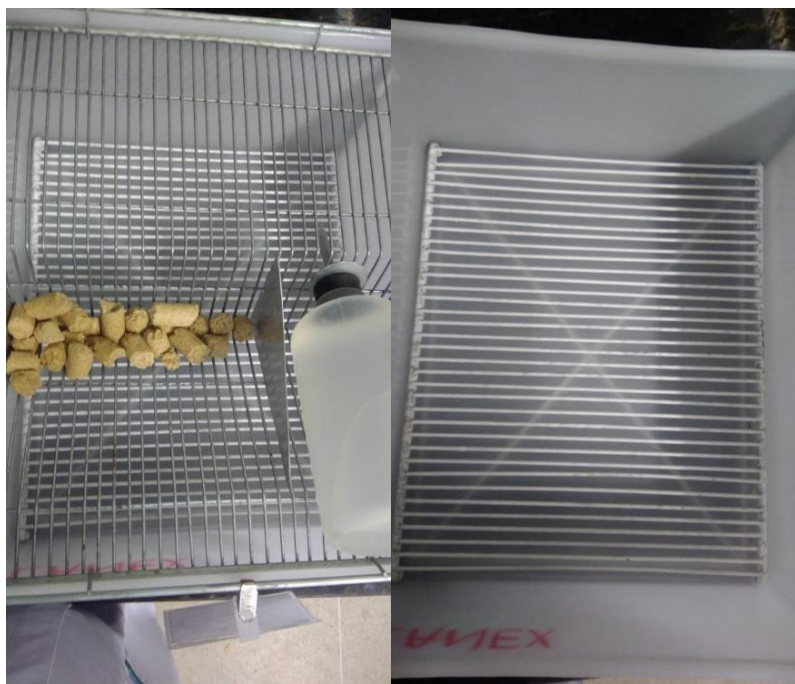
3.3.1 Comissão de Ética

O protocolo experimental com ratos Wistar foi aprovado sob o número nº 5752150319/2019 (Anexo I) pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPB e todos os experimentos seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3.2 Animais

Foram utilizados 50 ratos Wistar adultos com ± 80 dias de idade mantidos em temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa entre 50 e 55% e ciclos alternados de claro e escuro de 12 h cada (início do ciclo claro: 07:00 h). Os ratos estavam com água e dieta comercial Labina® (Paulínia, São Paulo, Brasil) *ad libitum* no período de 4 semanas de adaptação que antecedeu o experimento. Os ratos foram acomodados em gaiolas coletivas de polipropileno (5 ratos/gaiola) modificadas com a colocação de grades (Figura 3) em seu assoalho (medindo 36 cm x 31 cm, 2,5 cm de profundidade, com espaço de 1 cm entre cada barra) evitando que durante execução do protocolo do jejum intermitente, os ratos consumissem maravalha e fezes (Soares *et al.*, 2021)

Figura 3 - Gaiolas coletivas com grades no assoalho



Fonte: Acervo Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ UFPB).

Posteriormente, os ratos foram randomizados em 5 grupos (n = 10), assim descritos e conforme a Figura 4.

- ✓ Grupo controle (GC): ratos saudáveis alimentados com a dieta comercial padrão que receberam gavagem com soro fisiológico em dose única diária de 1 mL/ dia;
- ✓ Grupo obeso (GO): ratos alimentados com dieta rica em monossacarídeos e dissacarídeos que receberam gavagem com soro fisiológico em dose única diária de 1 mL/ dia;
- ✓ Grupo obeso submetido a jejum intermitente (OJI): ratos alimentados com dieta rica em monossacarídeos e dissacarídeos, submetidos a protocolo de jejum de 15 h e que receberam gavagem com soro fisiológico em dose única diária de 1 mL/ dia;
- ✓ Grupo obeso, submetido a jejum intermitente e administração com óleo de coco (OJIOC): ratos alimentados com dieta rica em mono e dissacarídeos, submetidos a protocolo de jejum de 15 h e que receberam gavagem com óleo de coco virgem na dose única diária de 1000 mg/kg de peso corporal;
- ✓ Grupo obeso com restrição calórica (ORC): ratos deste grupo foram alimentados com dieta rica em mono e dissacarídeos limitada a 70% do consumo calórico dietético do grupo GO, caracterizando, portanto, uma restrição calórica de 30%. Estes ratos receberam gavagem com soro fisiológico (1 mL/dia, dose única diária).

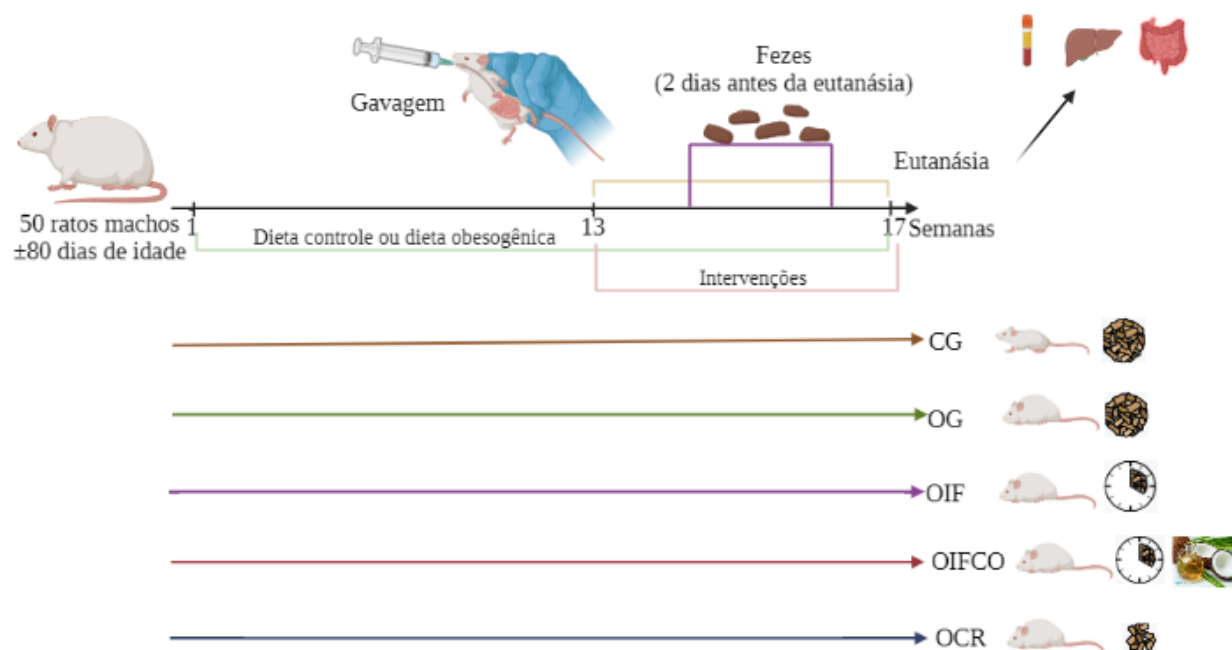
3.3.3 Dietas

O grupo controle (GC) consumiu a dieta comercial Labina® (Paulínia, São Paulo, Brasil) durante todo o experimento. Enquanto os animais dos grupos GO, OJI e OJIOC e ORC receberam a dieta rica em mono e dissacarídeos adaptada da dieta proposta por Luz *et al.* (2018). Os ingredientes da dieta rica em mono e dissacarídeos (Tabela 1) foram manualmente homogeneizados, em seguida a dieta foi peletizada em tamanhos adequados ao consumo dos animais e assim submetido à secagem em estufa com circulação de ar por 24 h a 55 °C. Durante um período de 17 semanas, as dietas foram ofertadas de forma *ad libitum* ou mediante o protocolo empregado no jejum intermitente e/ou restrição calórica.

As dietas foram previamente caracterizadas quanto à composição proximal (AOAC, 2019), mono e dissacarídeos e ácidos orgânicos (Batista *et al.*, 2023) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, sistema 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

O peso corporal e o consumo da ração aferido semanalmente (entre 14h e 15h) em balança eletrônica previamente tarada (Modelo: Prix 3/1, Marca: Toledo, São Bernardo do Campo, Brasil).

Figura 4 – Descrição dos grupos e protocolo experimental



Legenda: CG = grupo controle; OG= grupo obeso; OIF = grupo obeso e jejum intermitente; OIFCO = grupo obeso, com jejum intermitente e administração do óleo de coco virgem; OCR= grupo restrição calórica.

Tabela 1 – Composição dos ingredientes e macronutrientes da dieta controle e da dieta rica em monossacarídeos e dissacarídeos utilizados no experimento

Composição e teor energético	Dieta Controle	Dieta rica em monossacarídeo e dissacarídeo
Ingredientes		
Ração Labina® triturada (g)	100	45,2
Açúcar refinado (g)	-	9,6
Leite condensado (mL)	-	45,2
Macronutrientes (%)		
Carboidrato	75,57±0,14	72,71±0,16*
Proteína	22±0,10	23±0,10*
Lipídeos	2,43±0,01	4,29±0,01*
Valor energético (kcal)	412,15	421,45

*Diferença significativa entre as dietas (teste t de Student, ≤0,05)

Tabela 2- Composição da dieta controle e da dieta rica em monossacarídeos utilizados no experimento

Composição	Dieta Controle	Dieta rica em monossacarídeo e dissacarídeo
Mono e dissacarídeos (mg/g)		
Glicose	1,89 ± 0,09	37,64 ± 0,93*
Frutose	0,83 ± 0,15	28,82 ± 0,24*
Maltose	0,13 ± 0,02	11,30 ± 1,64*
Açúcares totais (mg/g)	2,85	77,76
Ácidos Orgânicos (mg/g)		
Ácido acético	0,08±0,00	ND
Ácido butírico	ND	ND
Ácido fórmico	1,87±0,78	0,52±0,15
Ácido propiônico	2,44 <0,01	0,22±0,03*
Ácido Cítrico	3,37±0,84	2,48±0,40
Ácido Malico	5,04<0,01	ND
Ácido Succínico	1,34±0,05	2,61±0,19*
Ácido Taráarico	ND	ND
Total ácidos orgânicos (mg/g)	14,82	9.02

3.3.4 Protocolo de jejum intermitente

O protocolo de JI adotado neste estudo seguiu a metodologia proposta por Belkacemi *et al.* (2010) e Soares *et al.* (2021). Durante um período de 4 semanas, os ratos dos grupos OJI e OJIOC foram submetidos a uma restrição de ração por 15 h diárias. Esse período de restrição alimentar ocorreu das 17 h do ciclo escuro até às 8 h do ciclo claro. Durante as outras 9 h do dia (das 8 h às 17 h), foi permitido o consumo *ad libitum* de ração. Essa rotina foi repetida diariamente ao longo das 4 semanas de estudo.

O protocolo de alimentação com restrição de tempo (*time-restricted feeding*) tem sido amplamente utilizado em estudos anteriores com roedores (Belkacemi *et al.*, 2010; Van Der Merwe *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2021; Dorand *et al.*, 2023) e ensaios clínicos (Jamshed *et al.*, 2019; Domaszewski *et al.*, 2020). Este protocolo de JI envolve restringir o período de alimentação a um intervalo específico do dia, permitindo um período de jejum prolongado.

3.3.5 Administração com óleo de coco virgem

O óleo de coco virgem (marca Copra®, Maceió, Brasil) utilizado no experimento é composto principalmente por ácido láurico (50,78%), ácido mirístico (18,32%), ácido palmítico (8,03%) e ácido caprílico (6,43%), além de conter 4,99% de ácido oleico e 0,83% de ácido linoleico (Vasconcelos *et al.*, 2015), conforme analisado por cromatografia gasosa (Tabela 3). O óleo foi obtido comercialmente de um mesmo lote na cidade de João Pessoa/PB.

O grupo OIFCO recebeu uma administração de óleo de coco (1000 mg/kg de peso corporal) ao final das 15 h de jejum (08:00 da manhã) durante as semanas 14, 15, 16 e 17 do experimento, em conjunto com o protocolo de jejum. A dose foi escolhida com base na quantidade de 13 mL (equivalente a 1 colher de sopa) consumida por humanos (Vogel *et al.*, 2020). A equação da dose equivalente humana (DEH) proposta por Nair e Jacob (2016) foi utilizada para converter essa dose correspondente a ser administrada aos ratos Wistar, levando em consideração a superfície corporal de cada animal:

$$DEH = dose\ animal * \left(\frac{animal\ Km}{Humano\ Km} \right) \text{ (Eq. 1)}$$

Sendo DEH e dose animal expressos em mg/kg e Km é uma constante.

Tabela 3. Composição de ácidos graxos do óleo de coco virgem usado no experimento

Ácidos graxos (%)	Óleo de coco
Ácido caprílico C 6:0	1,82 ± 0,32
Ácido caprílico C 8:0	5,87 ± 0,35
Ácido cáprico C 10:0	6,43 ± 0,05
Ácido láurico C12:0	50,78 ± 0,1
Ácido mirístico C 14:0	18,32 ± 0,05
Ácido palmítico C16:0	8,03 ± 0,03
Ácido esteárico C18:0	2,81 ± 0,02
Ácido araquídico C20:0	0,08 ± 0,01
Total ácidos graxos saturados (SFA%)	94,14 ± 0,93

Continua

Continuação da **Tabela 3**. Composição de ácidos graxos do óleo de coco virgem usado no experimento

Ácidos graxos (%)	Óleo de coco
Ácido miristoleico C14:1 n5c	n.d.
Ácido palmitoleico C16:1 n7	n.d.
Ácido oleico C18:1 n9c	4,99 ± 0,02
Ácido vacénico C18:1 n11	0,05 ± <0,01
Ácido gadoleico C20:1 n9	0,01 ± <0,01
Total ácidos graxos monoinsaturados(MUFA%)	5,05 ± 0,02
Ácido linoleico C18:2 n6 c (ω 6)	0,83 ± 0,01
Total ácidos graxos polinsaturados (PUFA%)	0,83 ± 0,01
Total de ácidos graxos de cadeia média (C₆-C₁₂)	64,90
Total de ácidos graxos de cadeia longa (C₁₄-C₂₄)	35,12

Legenda: n.d= não detectado. Fonte: Vasconcelos *et al.* (2015).

3.3.6 Parâmetros somáticos

Os parâmetros somáticos foram medidos com uma fita métrica minutos antes da eutanásia, com os ratos já anestesiados. As medidas incluíram a circunferência torácica (posterior à pata dianteira) e a circunferência abdominal (imediatamente anterior à pata traseira), bem como o peso corporal e o comprimento corporal (medido do nariz à base da cauda). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo o peso corporal (g) pelo comprimento nasoanal ao quadrado (cm²) (Novelli *et al.*, 2007).

O índice de adiposidade foi calculado usando a fórmula (TF/TW x 100), em que TF corresponde à gordura total (tecido adiposo visceral, subcutâneo e gonadal) e TW corresponde ao peso total do rato no dia da eutanásia (Nascimento *et al.*, 2011).

3.3.7 Eutanásia dos animais e coleta de materiais biológicos

A coleta das fezes foi realizada em três dias consecutivos, antes da eutanásia dos animais. Após o período de 17 semanas de experimento, os animais foram submetidos a um jejum de 8 h. Em seguida, foram eutanasiados através de decapitação por guilhotina (EB271, Insights, Ribeirão Preto, Brasil), em conformidade com a resolução normativa nº 13 de 2013 do CONCEA e as Diretrizes de Pesquisa Animal: Relatos de Experimentos In Vivo: Diretrizes do ARRIVE (Percie Du Sert *et al.*, 2020).

Durante a eutanásia foi coletado o sangue e logo após, foram coletados o fígado e o intestino. As amostras de intestino e fígado foram rapidamente removidas, lavadas em solução

salina (NaCl a 0,9%), secas em papel de filtro e pesadas. Os materiais biológicos foram destinados as seguintes análises:

- Colesterol e Triglicerídeos e ácidos biliares em fígado e fezes;
- Perfil lipídico sérico e cálculo da carga metabólica;
- Índice de adiposidade (descrito no tópico 3.3.6);
- Histologia de fígado e intestino;
- Ácidos orgânicos nas fezes, fígado e intestino;
- Contagem bacteriana em amostras fecais.

3.3.8 Perfil lipídico sérico e cálculo da carga metabólica

O sangue foi coletado em tubos estéreis e centrifugado para obtenção do soro ($1040 \times g/10$ min), que foi mantido sob congelamento (-20°C) para as análises bioquímicas. As concentrações séricas do perfil lipídico foram determinadas utilizando kits Bioclin® (Belo Horizonte, Brasil), seguindo as instruções do fabricante e posterior leitura nas absorvâncias de 5050 (TG), 500 nm (CT), 546 nm (LDL) e 550 nm (HDL) em espectrofotômetro de microplaca Eon™ (BioTek™, Vermont, EUA) auxiliado pelo programa Gen5™ 2.0 (BioTek™, Vermont, EUA). O índice de carga metabólica (ICM) foi calculado a partir de TG (mg/dL) + glicemia pós-prandial (mg/dL) (Emerson *et al.*, 2016).

3.3.9 Análises de colesterol, triglicerídeos e ácidos biliares hepáticos e fecais

Para extração dos lipídios fecais e hepáticos foi realizada de acordo com o método descrito por Folch, Less e Stanley (1957) para a quantificação da gordura total nestas amostras. Parte dos extratos lipídicos foram usados para análise de triglicerídeos (TG) e o colesterol total (CT) (WU *et al.*, 2017), mediante a utilização de kits comerciais da marca Labtest® (Minas Gerais, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. A medida das absorvâncias em 505 nm (TG) e 500 nm (CT) foi realizada em analisador bioquímico automático Labmax Premium 240 (Labtest, Minas Gerais, Brasil).

A partir de amostras hepáticas e fecais em triplicata, os ácidos biliares totais foram quantificados com a finalidade de verificar a síntese e excreção de ácidos biliares neste modelo de doença e tratamento.

Para quantificação dos ácidos biliares foi utilizado o método adaptado a partir do descrito por Hong *et al.* (1983), em que 0,1 g ou 0,1 mL de amostra adicionada de 1,75 mL de etanol absoluto, 0,1 mL de hidróxido de bário a 5%, 0,05 mL de sulfato de zinco a 10%. Então, a mistura agitada e centrifugada a $2.500 \times g$ durante 10 min com produção de um precipitado objetivando o descarte das proteínas e pigmentos biliares. Em seguida, 0,2 mL do sobrenadante foram pipetados para um tubo de ensaio e deixado para evaporar até secar. Foram adicionados 0,1 mL de água destilada, 3,9 mL de clorofórmio: metanol (2:1) e 0,88 mL de solução Folch (100 mL de solução aquosa contendo 0,04 g de cloreto de cálcio, 0,034 g de cloreto de magnésio e 0,58 g de cloreto de sódio) sendo misturados e deixados repousar para estratificação. A solução da camada superior contendo ácidos biliares totais e a solução da camada inferior colesterol e fosfolipídios.

O sobrenadante foi retirado e colocado em um tubo colorimétrico graduado de 5 mL. A camada inferior foi então extraída três vezes (cerca de 1 mL de cada vez) com solução de clorofórmio, metanol e solução Folch (8:4:3 v/v/v). Depois os extratos foram combinados e adicionados de 0,2 mL de metanol completando um volume total de 5 mL. Foi pipetado 0,5 mL e deixado evaporar até secar num recipiente de 5 mL. Adicionou 2 mL de revelador de ácido fosfomolibdico (contendo 100 mL de ácido acético glacial, 2,5 de ácido fosfomolibdico, 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado) e incubado durante 60 min em banho-maria a 80 °C. Imediatamente após a remoção, a mistura foi arrefecida em água gelada durante 5 min para terminar a reação.

Posteriormente, adicionou 2 mL de diluente (10 mL de ácido acético glacial, 100 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado), e após homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda 690 nm. Os valores do branco foram medidos pelo mesmo método, e o conteúdo de ácido biliar da amostra foi determinado de acordo com a curva padrão com glicocolato de sódio. Os resultados de ácidos biliares totais foram expressos em mmol/L (soro) e grama do material biológico (fígado, digesta colônica e fezes).

3.3.10 Quantificação de ácidos orgânicos ao longo do eixo entero-hepático

Com o objetivo de estabelecer, neste modelo de doença e tratamento, como funcionam as rotas metabólicas foram quantificados os ácidos orgânicos, em triplicata e com o uso de 1g ou 1 mL das amostras de soro, fígado, intestinos e fezes.

Com a extração de cada amostra seguidas em diluição por 5 mL de ácido sulfúrico e 4,0 mM/L, dar-se início ao processo de quantificação dos ácidos orgânicos (acético, butírico,

cítrico, fórmico, láctico, málico, propiônico e succínico), com a solubilização através do agitador de tubos seguida pela centrifugação a $5.800 \times g$ por 10 min. Diretamente no microtubo de 1,5 mL com uma agulha acoplada a seringa foi coletado o sobrenadante que em seguida com auxílio de um filtro de seringa de $0,45 \mu\text{m}$

Os ácidos orgânicos foram quantificados a partir da extração com 1 g ou 1 mL de cada amostra que diluída em 5 mL de ácido sulfúrico a 4,0 mM/L, que em seguida foi solubilizada com auxílio de agitador de tubos e centrifugada a $5.800 \times g$ por 10 min. Então, o sobrenadante foi coletado utilizando agulha acoplada a seringa e filtrado com filtro de seringa de $0,45 \mu\text{m}$ diretamente em microtubo de 1,5 mL para injeção em sistema de cromatografia líquida de alta performance (CLAE), com um sistema LC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) equipado com uma bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento de coluna termostato (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B) acoplado a um detector de matriz de diodo (modelo G1315D) e detector de índice de refração (modelo G1362A).

Foram mantidas a 50°C , com volume de injeção de $10 \mu\text{L}$, vazão de $0,5 \text{ mL/min}$, fase móvel $4,0 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$ em água ultrapura e corrida de 20 min durante a análise da coluna Agilent Hi-Plex H ($300 \times 7,7 \text{ mm}$) com tamanho de partícula de $8,0 \mu\text{m}$ e coluna guarda PL Hi-Plex H ($5 \times 3 \text{ mm}$) (Agilent Technologies). Com uso do OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies) foram processados os dados obtidos (Coelho *et al.*, 2018 adaptada por Batista *et al.*, 2018).

3.3.11 Contagem de grupos bacterianos intestinais específicos

Grupos bacterianos específicos foram avaliados nas fezes (coletadas por dois dias consecutivos antes da eutanásia) utilizando a técnica de microgota (Miles; Misra; Irwin, 1938). As amostras foram diluídas em séries e semeadas em placas de Petri estéreis contendo ágar para crescimento de *Lactobacillus* spp. (ágar de Man, Rogosa and Sharpe – MRS, Acumedia, EUA), *Bifidobacterium* spp. (ágar *Bifidobacterium*, HiMedia, Índia), *Escherichia coli* (ágar Eosina Azul de Metileno, Acumedia, EUA), *Enterobacteriaceae* (ágar MacConkey, HiMedia, Índia) e *Enterococcus* (ágar *Bile Esculin*, HiMedia, Índia). As placas de Petri com ágar para crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram incubadas em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) por 48 h; e as placas de Petri com ágar para crescimento dos demais micro-organismos foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 24 h. Após a incubação, as colônias bacterianas características nas placas de Petri com ágar seletivo

foram contadas e os números de células viáveis (unidades formadoras de colônias - UFC) foram expressos em Log_{10} UFC/g de fezes (Batista *et al.*, 2023).

3.3.12 Análises histológicas de fígado e intestino

Na amostra do fígado (fragmentos do lobo maior do fígado) e do intestino (fragmentos da porção do cólon do intestino) dos ratos foram removidos, lavados em solução salina (0,9 % NaCl) e com formol tamponado a 10 % foram fixados por 24 h. Sendo a partir dos tecidos produzidos blocos cortados a 4 μm posteriormente submetidos ao procedimento histológico com o processo de hidratação, corado com hematoxilina-eosina (HE), desidratação, diafanização com xilol e montagem com ‘entellan’ com uso da análise microscópica óptica (Motic BA 200, Santa Monica, EUA). Procedimento morfológico para análise da existência de processos degenerativos como migração de leucócitos, hiperemia, necrose, edema, hemorragia, esteatose hepática, presença de micro trombos e de parâmetros inflamatórios, e com preservação do parênquima hepático. Também foi avaliada à presença de processos inflamatórios, como estase, migração de leucócitos, hemorragia, vasodilatação e necrose, bem como para preservação epitelial, hipertrofia e hiperplasia da camada muscular externa no cólon intestinal (Erben *et al.*, 2014; 2013; Batista *et al.*, 2018).

3.3.13 Análises estatísticas

O tamanho amostral (50 ratos divididos em cinco grupos, $n = 10$ ratos por grupo) foi calculado para atender um poder estatístico mínimo de 80%, com tamanho de efeito minimamente detectável de 1,0 e nível significância 0,05 ($\alpha = 0,05$). O número de animais utilizado também atende aos Princípios dos 3R's (“redução, substituição e refinamento”) no uso de animais (Russell; Burch, 1959), que foram seguidos em toda a realização do experimento.

Os dados obtidos ao final do experimento foram submetidos ao teste de Kolmogorov Smirnov para avaliação da normalidade da distribuição. Os dados paramétricos para duas amostras foram analisados pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). Os dados paramétricos para três ou mais amostras foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para comparações múltiplas. Quando na presença da diferença entre os grupos foi realizado o pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado como

medida da força da associação entre duas variáveis. Os dados foram analisados mediante o pacote estatístico GraphPad Prism 8® (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo original apresentado no Apêndice 1, no qual investigamos o efeito do jejum intermitente (JI) associado ou não à ingestão de óleo de coco (CO) sobre o eixo entero-hepático de ratos obesos. Neste artigo foi demonstrado que os protocolos de JI reduziram em média 54,31% do colesterol total, em média 53,39% do LDL e em média 23,94% de triglicerídeos quando comparado ao grupo obeso sem tratamento. Por outro lado, o grupo submetido ao JI e CO apresentou o maior HDL em relação a todos os demais grupos. O grupo submetido ao JI e CO e à restrição calórica apresentaram menor carga metabólica em relação aos demais grupos. O grupo submetido ao JI e CO apresentou menor excreção fecal de ácidos orgânicos, seguido do grupo submetido ao jejum isoladamente, em relação aos demais grupos. As contagens de *Lactobacillus* foram semelhantes entre os grupos, porém as contagens de *Escherichia coli* foram menores no grupo submetido ao JI e CO. Não foram observadas alterações histológicas no intestino e no fígado de nenhum rato. Os resultados em conjunto permitem identificar que o jejum intermitente associado ao óleo de coco e o protocolo de restrição calórica tiveram os melhores efeitos na modulação dos parâmetros do eixo entero-hepático.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, M.; SEDEJ, S. Cardiovascular benefits of intermittent fasting. **Cardiovascular research**, v. 116, n. 3, p. e36-e38, 2020.
- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade**. 4. ed. São Paulo, SP: ABESO, 2016.
- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 2019. Óleo de Coco. Disponível: <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2019/12/56.pdf> . Acesso em 14 de junho de 2023
- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 2022. Posicionamento sobre o tratamento nutricional do sobrepeso e da obesidade. Disponível: [https //abeso.org.br](https://abeso.org.br). Acesso em 14 de junho de 2023.
- ACTIS, Giovanni Clemente *et al.* História de doenças inflamatórias intestinais. **Revista de medicina clínica**, v. 8, n. 11, pág. 1970, 2019.
- ADEYEMI, W. J. *et al.* Investigation of the effects of dietary modification in experimental obesity: low dose of virgin coconut oil has a potent therapeutic value. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 126, p. 110110, 2020.
- AHMED, N. *et al.* Impact of intermittent fasting on lipid profile—A quasi-randomized clinical trial. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 596787, 2021.
- AL-ASSAL, K. *et al.* Microbiota intestinal e obesidade. **Clinical Nutrition. Experimental**, 20 , 60–64, 2018
- ALATAWI, K. A.; ALSHUBAILY, F. A. Coconut products alleviate hyperglycaemic, hyperlipidemic and nephropathy indices in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 4224-4231, 2021.
- ALBERTI, A. *et al.* Dermatoglyphical impressions are different between children and adolescents with normal weight, overweight and obesity: a cross-sectional study. **F1000Research**, v. 8, 2019.
- AL-DOMI, H.; AL-SHORMAN, A. Increased waist circumference is associated with subclinical atherosclerosis in schoolchildren. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 264-269, 2019.
- ALVARES-DA-SILVA MR *et al.* Conventional and novel cardiovascular risk factors in liver transplant recipients. **Jornaul Hepatology**, 56:S75-6, 2012.
- ADA.AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Obesity management for the treatment of type 2 diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 44(Suppl. 1):S100–S110, 2021.

ANGOORANI, P. *et al.* Gut microbiota modulation as a possible mediating mechanism for fasting-induced alleviation of metabolic complications: a systematic review. **Nutrition & Metabolism**, 18(1), 1-17, 2021.

ANTON, S. D. *et al.* Flipping the metabolic switch: understanding and applying the health benefits of fasting. **Obesity**, v. 26, n. 2, p. 254-268, 2018.

ANTON, S. D. *et al.* The effects of time restricted feeding on overweight, older adults: a pilot study. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1500, 2019.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21th Ed., USA, 2019. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.6.127A>

ARCIERO, P. J. *et al.* Intermittent fasting two days versus one day per week, matched for total energy intake and expenditure, increases weight loss in overweight/obese men and women. **Nutrition Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2022.

ARSANG, M. *et al.* The protective effects of virgin coconut oil on high-fat diet induced rat liver. **Journal of Babol University of Medical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 245-252, 2020.

BARTON, W. *et al.* The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary individuals in composition and particularly at the functional metabolic level. **BMJ Journal**, v. 67, n. 4, pág. 625-633, 2018.

BASIRON, Y.; SHAHIDI, F. Bailey's industrial oil and fat products. **Edible Oil and Fat Products: Edible Oils**, p. 333-429, 2005.

BATISTA, K. S. *et al.* Acerola fruit by-product alleviates lipid, glucose, and inflammatory changes in the enterohepatic axis of rats fed a high-fat diet. **Food Chemistry**, v. 403, p. 134322, 2023.

BATISTA, K. S. *et al.* Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 30-41, 2018.

BELKACEMI, L. *et al.* Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. **International journal of endocrinology**, v. 2012, 2012.

BERG, Rodney D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases 2**, p. 11-30, 1999.

BHASKARAN, K *et al.*, Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3.6 million adults in the United Kingdom. **Lancet Diabetes Endocrinology**, 6.12, 944-953, 2018.

BIENER, A.; CAWLEY, J.; MEYERHOEFER, C. The impact of obesity on medical care costs and labor market outcomes in the US. **Clinical chemistry**, v. 64, n. 1, p. 108-117, 2018.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 2019.

BOHAN, R. *et al.* Gut microbiota: a potential manipulator for host adipose tissue and energy metabolism. **The journal of nutritional biochemistry**, v. 64, p. 206-217, 2019.

BOWEN, J. *et al.* Randomized trial of a high protein, partial meal replacement program with or without alternate day fasting: similar effects on weight loss, retention status, nutritional, metabolic, and behavioral outcomes. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1145, 2018.

BOWYER, R. C. *et al.* Use of dietary indices to control for diet in human gut microbiota studies. **Microbiome**, v. 6, p. 1-11, 2018.

BOURG É.L. Predicting whether dietary restriction would increase longevity in species not tested so far. **Ageing Research reviews**, Jul 1;9(3):289-97, 2010.

CAVALCANTE, H.C. **Avaliação dos efeitos do jejum intermitente associado ou não à suplementação com óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) em ratos obesos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição), PPGCN, Centro de Ciências da Saúde, UFPB. João Pessoa, p. 93. 2020.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6-10, 2019.

CHOPYK, Daniel M.; GRAKOU, Arash. Contribution of the intestinal microbiome and gut barrier to hepatic disorders. **Gastroenterology**, v. 159, n. 3, p. 849-863, 2020.

COCKERHAM, W. C. Theoretical approaches to research on the social determinants of obesity. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 63, n. 1, p. S8-S17, 2022.

COELHO, E. M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

COMES, M. C. *et al.* Inflammatory bowel disease in married couples: 10 cases in Nord Pas de Calais region of France and Liège county of Belgium. **Gut**, v. 35, n. 9, p. 1316-1318, 1994.

CRAWFORD, P. A. *et al.* Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 27, p. 11276-11281, 2009.

CURRY, S. J. *et al.* Behavioral weight loss interventions to prevent obesity-related morbidity and mortality in adults: US Preventive Services Task Force recommendation statement. **Jama**, v. 320, n. 11, p. 1163-1171, 2018.

DE C.R.; MATTSON, M. P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 26, p. 2541-2551, 2019.

DE L.; ABELARDO G. *et al.* Metabolismo en el ayuno y la agresión. Su papel en el desarrollo de la desnutrición relacionada con la enfermedad. **Nutrición Hospitalaria**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2013.

DOMASZEWSKI, P. *et al.* Effect of a six-week intermittent fasting intervention program on the composition of the human body in women over 60 years of age. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.11, p. 1–9, 2020

DORAND, V. A. M. *et al.* Intermittent fasting associated with aerobic exercise improves oxidative parameters and causes muscle damage without compromising the performance of Wistar rats. **Nutrition**, 112159, 2023

DUFOUR D. R. Alanine aminotransferase: is it healthy to be “normal”? **Hepatology**. V.50. n.6. p. 1699-1701, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/coco/pre-producao/importancia-socioeconomica>. Acesso em 11 de agosto de 2022.

EMERSON, S. R. *et al.* Summation of blood glucose and TAG to characterise the ‘metabolic load index’. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 9, p. 1553-1563, 2016.

ERBEN, U. *et al.* A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 4557, 2014.

FLEGAL, K. M.; IOANNIDIS, J. P.; DOEHNER, W. Flawed methods and inappropriate conclusions for health policy on overweight and obesity: the Global BMI Mortality Collaboration meta-analysis. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 10, n. 1, p. 9-13, 2019.

FOLCH, J. *et al.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GADDE, K. M. *et al.* Obesity: pathophysiology and management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 1, p. 69-84, 2018.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **New England journal of medicine**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

GIBF . Global Biodiversity Information Facility. *Cocos nucifera* L. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/2735117>. Acesso em: 20 de dezembro de 2022.

GONZÁLEZ, O. A. *et al.* Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. **Oral diseases**, v. 18, n. 1, p. 16-31, 2012.

GREEN, A.; BISHOP, R. E. Ketoacidosis—where do the protons come from?. **Trends in biochemical sciences**, v. 44, n. 6, p. 484-489, 2019.

HEMMINGSSON, E. *et al.* The social origins of obesity within and across generations. **Obesity Reviews**, v. 24, n. 1, p. e13514, 2023.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 254-266, 2017.

HOFMANN, A. F. Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. **Annals of hepatology**, v. 6, n. 1, p. 15-27, 2007.

HONG, N. *et al.* Determination of total bile acids in bile by phosphomolybdate colorimetry. **Shanghai Medical Journal**, v. 1, p. 1-12, 1983.

HOOSHIAR, S. H.; YAZDANI, A.; JAFARNEJAD, S.. Comparison of the effect of modified intermittent fasting and daily calorie restriction on sleep quality, anthropometric data, and body composition in women with obesity or overweight: study protocol of a randomized controlled trial. **Springer**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agro 2017: Coco-da-baía | Brasil**. 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76278. Acesso em: 20 de dezembro de 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Um em cada quatro adultos no país estava obeso em 2019; Atenção primária foi bem avaliada, 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>. Acesso em 14 de junho de 2023.

ILLAM, S. P.; NARAYANANKUTTY, A.; RAGHAVAMENON, A. C. Polyphenols of virgin coconut oil prevent pro-oxidant mediated cell death. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 27, n. 6, p. 442-450, 2017.

INOUE, Y. *et al.* Epidemiology of obesity in adults: latest trends. **Current obesity reports**, v. 7, n. 4, p. 276-288, 2018.

JAMSHED, H. *et al.* Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 3–5, 2019.

JANDHYALA, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World journal of gastroenterology WJG**, 21.29: 8787, 2015.

KAHN, B. B. *et al.* Obesity and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000.

LADABAUM, U. *et al.* Obesity, abdominal obesity, physical activity, and caloric intake in US adults: 1988 to 2010. **The American journal of medicine**, v. 127, n. 8, p. 717-727. e12, 2014.

LANGEVELD M, D. JH. The long-term effect of energy restricted diets for treating obesity. **Research Journal Obesity**, 23(8):1529–1538, 2015.

Kim, J. H.; Oh, C. M.; Yoo, J. H. Obesity and novel management of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, 29(12), 1779, 2023.

- LI, J. *et al.* Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, v. 5, p. 1-19, 2017.
- LI, K.-P. *et al.* A high-fat, high-fructose diet dysregulates the homeostatic cross-talk between gut microbiome, metabolome and immunity in an experimental model of obesity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 66, n. 7, p. 2100950, 2022.
- LI, L. *et al.* The effects of daily fasting hours on shaping gut microbiota in mice. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2020.
- LI, T. *et al.* Adaptation to fasting in crucian carp (*carassius auratus*): gut microbiota and its correlative relationship with immune function. **Microbial ecology**, 78: 6-19, 2019.
- LIMA, E. B. C. *et al.* *Cocos nucifera* (L.)(Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 953-964, 2015.
- LIPPI, G. *et al.* Blood sample quality. **Diagnosis**, v. 6, n. 1, p. 25-31, 2019.
- LIU, R. *et al.* Dysbiosis of gut microbiota associated with clinical parameters in polycystic ovary syndrome. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 324, 2017.
- LIU, Z. *et al.* Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. **International journal of medical sciences**, v. 11, n. 9, p. 925, 2014.
- LLEWELLYN-WATERS, K.; ABDULLAH, M. M. Intermittent fasting-a potential approach to modulate the gut microbiota in humans? A systematic review. **Nutrition and Healthy Aging**, v. 6, n. 2, p. 87-94, 2021.
- LORENZO, O. *et al.* Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.
- LOZUPONE, C. A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.
- LUOTO, R. *et al.* Reshaping the gut microbiota at an early age: functional impact on obesity risk?. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 63, n. Suppl. 2, p. 17-26, 2013.
- LUZ, A. B. S. *et al.* Adipocytes and intestinal epithelium dysfunctions linking obesity to inflammation induced by high glycemic index pellet-diet in Wistar rats. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 3, 2018.
- LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The human intestinal microbiome in health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2369-2379, 2016.
- MACHANN, J. *et al.* Diagnostic imaging in obesity. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 27, n. 2, p. 261-277, 2013.
- MADKOUR, M. *et al.* Ramadan diurnal intermittent fasting is associated with significant plasma metabolomics changes in subjects with overweight and obesity: A prospective cohort study. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1008730, 2023.

MADKOUR, M. I. *et al.* Ramadan diurnal intermittent fasting is associated with attenuated FTO gene expression in subjects with overweight and obesity: a prospective cohort study. **Frontiers in Nutrition**, 8: 741811, 2022.

MANOOGIAN, E. N.; PANDA, S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. **Ageing research reviews**, V.39, 59-67, 2017.

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, 2012.

MARCOBAL, A. *et al.* A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. **Glycobiology**, v. 23, n. 9, p. 1038-1046, 2013.

MARINA, A. M. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 60, n. sup2, p. 114-123, 2009.

MARONI, L. *et al.* Gut–liver axis and inflammasome activation in cholangiocyte pathophysiology. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 736, 2020.

MARTENS, E. C.; CHIANG, H. C.; GORDON, J. I. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 5, p. 447-457, 2008.

MATÍAS-PÉREZ, D. ; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, E.; GARCÍA-MONTALVO, I. A. Intermittent fasting may optimize intestinal microbiota, adipocyte status and metabolic health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 16-23, 2022.

MCTIGUE, K. M.; HESS, R.; ZIOURAS, J. Obesity in older adults: a systematic review of the evidence for diagnosis and treatment. **Obesity**, v. 14, n. 9, p. 1485-1497, 2006.

MERAL KOC, B.; YILMAZ AKYUZ, E.; OZLU, T.. The effect of coconut oil on anthropometric measurements and irisin levels in overweight individuals. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 10, p. 1735-1741, 2022.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Epidemiology & Infection**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MOREIRA, AP B. *et al.* Gut microbiota and the development of obesity. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 5, p. 1408-1414, 2012.

MULYADI, A. F.; SCHREINER, M.; DEWI, I. A.. Phenolic and volatile compounds, antioxidant activity, and sensory properties of virgin coconut oil: occurrence and their relationship with quality. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, p. 070020. 2018.

MUNHOZ, A. C., *et al.* Intermittent fasting for twelve weeks leads to increases in fat mass and hyperinsulinemia in young female Wistar rats. **Nutrients**, 12.4: 1029, 2022.

NAIR, A. B.; JACOB, S.. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NASCIMENTO, A. F. *et al.* Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. **Life Sciences**, v. 6, n.88, p. 1031-8, 2011.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. Naltrexone–bupropion for managing overweight and obesity. 2020.

National Institutes of Health Causes, Obesity. 2020. <https://www.nhs.uk/conditions/obesity/causes/>. Disponível em 24 de março de 2023.

Ndeh, D. e G., HJ. Biochemistry of complex glycan depolymerisation by human gut microbiota. **FEMS microbiology reviews** , 42 (2), pp.146-164, 2018.

NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 830-835, 2004.

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.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.. Effects of antioxidants against atherosclerosis. **Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease**, p. 19-25, 2002.

NIKOOEI, P. *et al.* Effects of virgin coconut oil consumption on metabolic syndrome components and asymmetric dimethylarginine: A randomized controlled clinical trial. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 31, n. 3, p. 939-949, 2021

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.

ODA, Masaya; YOKOMORI, Hiroaki; HAN, Jing-Yan. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 29, n. 3-4, p. 167-182, 2003.

OLIVEIRA-DE-LIRA, L. *et al.* Supplementation-dependent effects of vegetable oils with varying fatty acid compositions on anthropometric and biochemical parameters in obese women. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 932, 2018.

OMS. Obesity and overweighth. Disponível: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acessado em 19/07/2023.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. Disponível: <https://www.paho.org/pt/noticias/4-3-2022-dia-mundial-da-obesidade-2022-acelerar-acao-para-acabar-com-obesidade>. Acessado em 16 de junho de 2023.

PACCOSI, S. *et al.* Obesity therapy: how and why?. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 174-186, 2020.

PANT, K. *et al.* The Role of Gut Microbiome-Derived Short-Chain Fatty Acid Butyrate in Hepatobiliary Diseases. **American Journal of Pathology**, 2023.

PATTERSON, R. E.; SEARS, D. D. Metabolic effects of intermittent fasting. **Annu Rev Nutr**, v. 37, n. 1, p. 371-93, 2017.

PELLEGRINELLI, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A.. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1075-1088, 2016.

PERCIE DU SERT, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 40, n. 9, p. 1769-1777, 2020.

POLITI, C. *et al.* Role of Gut Microbiota in Overweight Susceptibility in an Adult Population in Italy. **Nutrients**, v. 15, n. 13, p. 2834, 2023.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. **Metabolism**, v. 92, p. 82-97, 2019.

POLYZOS, S. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin in health and disease: facts and expectations at its twentieth anniversary. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 64, n. 1, p. 5-12, 2015.

PORRO, S. *et al.* Dysmetabolic adipose tissue in obesity: Morphological and functional characteristics of adipose stem cells and mature adipocytes in healthy and unhealthy obese subjects. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 44, n. 5, p. 921-941, 2021.

PROCHERA, Aleksandra; RAO, Meenakshi. Mini-Review: Enteric glial regulation of the gastrointestinal epithelium. **Neuroscience Letters**, p. 137215, 2023.

RAYNOR, H.A; CHAMPAGNE, C. M. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Interventions for the Treatment of Overweight and Obesity in Adults. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, 116(1):129–147, 2016.

RECOMENDAÇÃO CFN Nº 002 21 DE AGOSTO DE 2015. ÓLEO DE COCO E ÓLEO DE CANOLA. Disponível em https://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2015/07/Recomendacao_sobre_oleos-de-coco_e-de-canola-002.pdf. Acessado em 21 de junho de 2023

RIDAURA, V. K. *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**, v. 341, n. 6150, p. 1241214, 2013.

RONG, B. *et al.* Gut microbiota—a positive contributor in the process of intermittent fasting-mediated obesity control. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 1283-1295, 2021.

ROSENBAUM, M.; KNIGHT, R.; LEIBEL, R. L. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 9, p. 493-501, 2015.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.. The principles of humane experimental technique. **Methuen**, 1959.

RYNDERS, C. A. *et al.* Effectiveness of intermittent fasting and time-restricted feeding compared to continuous energy restriction for weight loss. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2442, 2019.

RYU, S. *et al.* Secular trends in the association between obesity and hypertension among adults in the United States, 1999–2014. **European Journal of Internal Medicine**, v. 62, p. 37-42, 2019.

SALZMAN, N. H. *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. **Nature immunology**, v. 11, n. 1, p. 76-82, 2010.

SANTOS, H. O. *et al.* Coconut oil intake and its effects on the cardiometabolic profile—A structured literature review. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 62, n. 5, p. 436-443, 2019.

SHETTY, S. S. *et al.* Virgin coconut oil (VCO) ameliorates high fat diet (HFD)-induced obesity, dyslipidemia and bestows cardiovascular protection in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 92, n. 2, p. 249-259, 2022.

SOARES, N. L. *et al.* Does intermittent fasting associated with aerobic training influence parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats?. **Journal of Affective Disorders**, v. 293, p. 176-185, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Disponível: <https://www.sbemsc.org.br/2015/09/01/a-polemica-do-oleo-de-coco/> Acessado em 21 de junho de 2023

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Disponível: <https://www.endocrino.org.br/tratamento-da-obesidade/>. 2010. Acessado em 21 de junho de 2023

SOUZA, M. T. *et al.* Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. **Nutrition**, v. 65, p. 103-112, 2019.

SOWAH, S. A. *et al.* Calorie restriction improves metabolic state independently of gut microbiome composition: a randomized dietary intervention trial. **Genome medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2022.

SPEZANI, R. *et al.* Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 83, p. 108419, 2020.

STANISLAWSKI, M. A. *et al.* The gut microbiota during a behavioral weight loss intervention. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3248, 2021.

STEPHENS, R. W.; ARHIRE, L.; COVASA, Mi. Gut microbiota: from microorganisms to metabolic organ influencing obesity. **Obesity**, v. 26, n. 5, p. 801-809, 2018.

STRÖHER, D. J. *et al.* Virgin coconut oil associated with high-fat diet induces metabolic dysfunctions, adipose inflammation, and hepatic lipid accumulation. **Journal of medicinal food**, v. 23, n. 7, p. 689-698, 2020.

SUN, L. *et al.* Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. **Protein & cell**, v. 9, n. 5, p. 397-403, 2018.

TAN, R. *et al.* High-sugar, high-fat, and high-protein diets promote antibiotic resistance gene spreading in the mouse intestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2022442, 2022.

TAVARES, R. L. *et al.* Mucuna pruriens treatment shows anti-obesity and intestinal health effects in obese rats. **Food & Function**, v. 12, n. 14, p. 6479-6489, 2021.

TRIPATHI, Anupriya *et al.* The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 15, n. 7, p. 397-411, 2018.

VALENTE, F. X. *et al.* Effects of coconut oil consumption on energy metabolism, cardiometabolic risk markers, and appetitive responses in women with excess body fat. **European Journal of Nutrition**, 57: 1627-1637, 2018.

VASCONCELOS, M. H.A. Avaliação da qualidade física e química de óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) e seus efeitos sobre os parâmetros lipídicos e oxidativos em ratos dislipidêmicos sedentários e exercitados. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos), PPGCTA, Centro de Tecnologia dos Alimentos, UFPB. João Pessoa, p.102. 2015.

VASCONCELOS, M. H. A. *et al.* Extra virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.) exerts anti-obesity effect by modulating adiposity and improves hepatic lipid metabolism, leptin and insulin resistance in diet-induced obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 94, p. 105122, 2022.

VASCONCELOS, M. H. A. *et al.* Extra virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.) intake shows neurobehavioural and intestinal health effects in obesity-induced rats. **Food & Function**, 2023.

VAN DER MERWE, M. *et al.* Time of feeding alters obesity-associated parameters and gut bacterial communities, but not fungal populations, in C57BL/6 male mice. **Current Developments in Nutrition**, v. 4, n. 2, p. nzz145, 2020.

VECCHIÉ, A. *et al.* Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *European Journal of Internal Medicine*, v. 48, n.1, p. 6-17, 2018.

VIGITEL BRASIL 2018 – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Disponível em:
<https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2020/01/vigitel-brasil-2018.pdf> . Acesso em: 14/junho/2023.

VILLARINO, B. J.; DY, L. M.; LIZADA, M. Concepción C. Descriptive sensory evaluation of virgin coconut oil and refined, bleached and deodorized coconut oil. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 193-199, 2007.

VOGEL, C. Érika *et al.* Effect of coconut oil on weight loss and metabolic parameters in men with obesity: a randomized controlled clinical trial. **Food & function**, v. 11, n. 7, p. 6588-6594, 2020.

WALLACE, T. C. Health effects of coconut oil—A narrative review of current evidence. **Journal of the american college of nutrition**, v. 38, n. 2, p. 97-107, 2019.

WANG, H.-X.; WANG, Yu-P. Gut microbiota-brain axis. **Chinese medical journal**, v. 129, n. 19, p. 2373-2380, 2016.

WANG, W.; SEALE, P.. Control of brown and beige fat development. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n. 11, p. 691-702, 2016.

WARD, F. W.; COATES, M. E. Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. **Laboratory Animals**, v. 21, n. 3, p. 216-222, 1987.

WELTON, S. *et al.* Intermittent fasting and weight loss: Systematic review. **Canadian Family Physician**, v. 66, n. 2, p. 117-125, 2020.

WESTMAN, E. C. *et al.* Use of a low-carbohydrate, ketogenic diet to treat obesity. **Primary Care Reports**, v. 24, n. 10, 2018.

WORLD HEALTH ORGANISATION (OMS). Obesity: prevention and control of the global epidemic. Geneva: World Health Organisation (WHO Technical Report Series, 894), 2017.

World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization; 1995. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37003>
Acessado em 21 julho 2023.

WU, G. D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

WU, Hua-Bo; XIAO, De-Sheng. Regulation of trace elements and redox status in striatum of adult rats by long-term aerobic exercise depends on iron uptakes. **Neuroscience Letters**, 642: 66-70, 2017.

YIP, T. Cheuk-F.; WONG, V.Wai-S.; WONG, G. Lai-H.. Alanine aminotransferase level: The road to normal in 2021. **Hepatology communications**, v. 5, n. 11, p. 1807-1809, 2021.

ZHANG, X. *et al.* Effects of alternate-day fasting, time-restricted fasting and intermittent energy restriction DSS-induced on colitis and behavioral disorders. **Redox biology**, v. 32, p. 101535, 2020.

ZHOU, H. *et al.* Diets Enriched in Sugar, Refined, or Whole Grain Differentially Influence Plasma Cholesterol Concentrations and Cholesterol Metabolism Pathways with Concurrent Changes in Bile Acid Profile and Gut Microbiota Composition in ApoE^{-/-}Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2023.

ZHOU, Rui-h. *et al.* The influence of fasting and caloric restriction on inflammation levels in humans: a protocol for systematic review and meta analysis. **Medicine**, v. 100, n. 15, 2021.

ZICKER, M. C. *et al.* Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 63, p. 117-128, 2019.

ZOUHAL, H. *et al.* Effects of Ramadan intermittent fasting on inflammatory and biochemical biomarkers in males with obesity. **Physiology & Behavior**, v. 225, p. 113090, 2020.

APÊNDICE

Intermittent fasting associated with coconut oil (*Cocos nucifera* L.) alter gut-liver axis parameters in diet-induced obese rats

Abstract

Purpose: to investigate the effect of intermittent fasting (IF) associated or not with coconut oil (CO) intake on the enterohepatic axis of obese rats. **Methods:** A total of 50 rats were divided into groups: control, obese, obese with IF, obese with IF plus CO, and obese with caloric restriction. The rats were induced to obesity with a diet rich in sugars for 17 weeks. The respective interventions were carried out in the last 4 weeks. **Results:** IF protocols reduced total cholesterol (on average 54,31%), LDL (on average 53,39%) and triglycerides (on average 23,94%) compared to OG; and the OIFCO group showed the highest HDL (on average 38,73%) compared to all groups. OIFCO (on average 28.58%) and OCR (on average 48.63%) had a lower metabolic load compared to the other groups. OIFCO had lower faecal excretion of organic acids, followed by the OIF group, compared to the other groups. *Lactobacillus* counts were similar among groups; however, *Escherichia coli* counts were lower in the OIFCO group. No histological changes were observed in the intestine and liver of the groups. **Conclusion:** intermittent fasting with coconut oil and calorie restriction protocols had the effects on modulating enterohepatic axis parameters.

Keywords: organic acids; faecal bacteria; caloric restriction; cholesterol; high-sugar diet.

Introduction

Obesity has been reaching pandemic status representing a serious health problem faced by humanity with over 2,8 million deaths per year (WHO, 2021). In obese individuals, an unbalanced population of intestinal bacteria is observed, characterizing the condition of intestinal dysbiosis that leads to systemic inflammatory and oxidative processes, in addition to changes in lipid and glucose metabolism (Liu *et al.*, 2017).

There is evidence to suggest intestinal dysbiosis and microbiota composition may be related to the pathogenesis of numerous chronic liver diseases, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its most severe form, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), both associated with obesity (Vajro *et al.*, 2013; Milosevic *et al.*, 2019). Such interactions occur bidirectionally through the gut-liver axis, encompassing endocrine and immunological mechanisms, resulting from interactions between signals generated by the diet, genetic and environmental factors (Albillos *et al.*, 2020). Moreover, in obesity, some intestinal bacteria appear to be responsible for more efficient intestinal absorption of calories, increased lipid deposition and increased absorption and colonic fermentation of normally poorly digestible polysaccharides (e.g., large polysaccharides, unabsorbed sugars and alcohols), which result in different types and concentrations of faecal short chain fatty acids (SCFAs), and in turn, different local and systemic effects. Previous studies indicate that the consumption of diets with a high amount of sugars such as mono and disaccharides favours such alterations in obesity (Vajro *et al.*, 2013).

On the other hand, caloric restriction is one of the main non-pharmacological treatments widely used in the fight against obesity, due to its proven effectiveness in weight control and health promotion in obese individuals (Langeveld, 2015). However, long-term adherence to calorie-restricted diets has been challenging (Patterson; Sears, 2017). For this reason, alternative dietary interventions have been sought, such as the intermittent fasting (IF) protocol, which has been shown to be effective in controlling body weight and modulating of gut-liver axis, in obese individuals (Matías-Pérez *et al.*, 2022). Among the various protocols, the IF with time-restricted feeding stands out for not causing compensatory consumption during the feeding window (Soares *et al.*, 2021; Dorand *et al.*, 2023).

In parallel, IF supporters have associated this practice with the consumption of coconut oil (*Cocos nucifera* L.), as it is a source of medium-chain fatty acids (MCFA). These compounds providing immediate energy, could prevent excessive calorie consumption in the post-fasting period through induction of ketogenesis (Chatterjee *et al.*, 2020). Additionally, coconut oil (CO) contains phenolic compounds and other antioxidants which could be associated with the anti-obesity effect and the improvement of hepatic lipid metabolism and intestinal health in obese rats (Vasconcelos *et al.*, 2023).

In face of this scenario, this study aims to evaluate the effects of intermittent fasting associated with or without the coconut oil intake on parameters of the gut-liver axis from obese rats fed a diet rich in sugars.

Materials and Methods

Study design

The study was conducted after the approval of the study design by the Committee for Ethics in the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Paraíba (UFPB) under protocol number 5752150319/2019. The experiment was carried out following the Animal Research guidelines: Reporting of *In vivo* Experiments: the ARRIVE Guidelines (Percie Du Sert *et al.*, 2020).

The Wistar rats were acquired from the colony of the Biotério José Paulino from the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco (UFPE), being transported and acclimatized for four weeks before the beginning of the biological experiment carried out at the Laboratory of Experimental Nutrition (LANEX) in the Federal University of Paraíba (UFPB). The *vivarium* had standardized environmental conditions: light/ dark cycle (12/12 h, light on at 6 a.m.), temperature of 21 ± 2 °C and relative air humidity (50±5%). The rats were kept in collective polypropylene cages (five rats per cage), with water *ad libitum* and diets conforming intervention protocols. The cages were equipped with crates on their floors to prevent shavings and faeces consumption during fasting protocols. This same microenvironment was standardized for the groups which were not submitted to the IF (Soares *et al.*, 2021).

Male Wistar rats (n=50), 80-day-old, with an initial weight of 353.8 ± 7.9 g were randomized into five groups: control group (CG), obese group (OG), obese group with intermittent fasting (OIF), obese group with intermittent fasting associated with coconut oil administration (OIFCO) and obese group with caloric restriction (OCR) (Figure S1).

The control group was fed commercial feed (Paulínia, São Paulo, Brazil) *ad libitum* and the obese groups (OG, OIF, OIFCO and OCR) were fed a diet rich in sugars (HS) adapted from Luz *et al.* (2018) for 17 weeks. Diets were previously analysed for proximate composition (AOAC, 2019) and sugar and organic acid profiles by high performance liquid chromatography (HPLC) (Coelho *et al.*, 2018) (Tables S1 and S2).

Body weight, and food intake were measured weekly using an electronic scale (Model: Prix 3/1, Brand: Toledo, São Bernardo do Campo, Brazil). Energy intake was calculated based on consumption (g) and diet composition.

Intermittent fasting and caloric restriction protocols

The time-restricted feeding protocol has been widely used in previous studies with rodents (Soares *et al.*, 2021; Dorand *et al.*, 2023), and clinical trials (Domaszewski *et al.*, 2020; Jamshed *et al.*, 2019). This IF protocol involves restricting the feeding period to a specific interval of the day, allowing for an extended fasting period.

The IF protocol consisted of food restriction for 15 h (5:00 p.m. – 8:00 a.m.) and *ad libitum* food supply for 9 h (8:00 a.m. – 5:00 p.m.) and was carried out in the OIF and OIFCO groups from the 14th to the 17th week. The OCR rats were subjected to caloric restriction of 30% on the total calories consumed per day during the same period (Pugh *et al.*, 1999).

Coconut oil (CO) administration

Virgin coconut oil (COPRA food Industry Ltda®, Maceió, Brazil) was characterized for fatty acids profile (Table S3) by gas chromatography (Vasconcelos *et al.*, 2023). The administration of CO (1,000 mg/kg of body weight) was offered to the OIFCO group at the end of the 15 h of fasting (08:00 a.m.) from the 14th to the 17th week of the experiment, along with an intermittent fasting protocol. The dose was selected based on the 13 mL portion (1 tablespoon) usually consumed by humans per day (Vogel *et al.*, 2020), which was converted to rats (Nair and Jacob, 2016).

Somatic parameters and euthanasia

Somatic parameters were measured with an inelastic tape minutes before euthanasia (Novelli *et al.* 2007). At the end of the 17 weeks of the experiment, the rats were fasted for 8 h, followed by euthanasia via guillotine decapitation (EB271, Insight, Ribeirão Preto, Brazil). Then, blood, intestine and liver were collected. Carcasses were obtained and analyzed for moisture, ash, protein (AOAC, 2019) which corresponding to lean mass, and lipids (Folch *et al.*, 1957) which corresponding to fat mass.

Biochemical analysis

Glycaemia, triglycerides (TG), total cholesterol (TC); high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) were evaluated using commercial colorimetric kits (Bioclin®, Belo Horizonte, Brazil) in Eon™ microplate spectrophotometer (BioTek™, Vermont, USA) and metabolic load index (MLI) was calculated (Emerson *et al.*, 2016).

Analysis of cholesterol, triglycerides, and bile acids contents in liver and faeces

The lipid extracts were prepared (Folch *et al.*, 1957) and then part of them was destined for TG and CT analyzes using commercial kits (Bioclin® (Belo Horizonte, Brazil) and the other part for the quantification of hepatic and faecal bile acids (Hong *et al.* 1983). Both analyzes were performed in Eon™ microplate spectrophotometer (BioTek™, Vermont, USA).

Bacterial counts in faeces

The count of bacteria in the faeces was evaluated using the micro drop technique. The faeces were collected for two consecutive days before euthanasia and homogenized in peptone water (100 mg/mL), serially diluted (1:9), and 20 µL aliquots of the respective dilutions were inoculated in sterile Petri dishes with agar for counting *Enterococcus* spp. (Bile Esculin agar, HiMedia, India), *Enterobacteriaceae* (MacConkey agar, HiMedia, India), *Lactobacillus* spp. (Man's agar, Rogosa and Sharp -MRS, HiMedia, India), *Bifidobacterium* spp. (Bifidobacterium agar, HiMedia, India) and *Escherichia coli* (Eosin Methylene Blue Agar, HiMedia, India). Culture plates of *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* spp. were incubated in aerobiosis at 37 °C for 24 h. Culture plates *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. were incubated at 37 °C for 48 h in anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK). The number of viable cells (colony forming units-CFU) was counted after incubation, and expressed in Log10 CFU/g of faeces (Batista *et al.*, 2023).

Analysis of organic acids and sugars in intestine, liver and faeces

Organic acids were quantified from the extraction of 1g of liver, intestine or feces sample, with dilution in 5 mL of sulfuric acid at 4.0 m/L and using a tube shaker and centrifugation (5,800 x g for 10 min). With the aid of a 0.45 µm syringe filter, the supernatant was collected and inserted directly into a 1.5 mL microtube. Then, 10 µL of each sample was injected into a high-performance liquid chromatography system (HPLC), with a 1260 Infinity LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) in a quaternary solvent pump (model G1311C) (Coelho *et al.*, 2018; Batista *et al.*, 2023)

Histological analysis in liver and intestine

For histological analysis, liver (larger lobe) and intestine (colon) samples (were fixed in 10% buffered formalin for 24 h, processed according to the routine histological technique and photographed in 40× in a standard optical microscope (Motic BA 200, Santa Monica, USA).

Statistical analysis

The data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov test to evaluate the normality of the distribution. Parametric data of two samples were submitted to analysis of Student's t-test ($p \leq 0.05$) and data of three or more samples were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test at a significance level of 5% ($p \leq 0.05$) for multiple comparisons. Values expressed as mean, with standard deviation from the mean. The free version of GraphPad Prism 8® statistical package (GraphPad Software Inc. La Jolla, USA) was used to analyse the data. Data pre-treatment with the auto scaling method, calculation of Pearson's correlation coefficient (r) and creation of pathway graphics for *Rattus norvegicus* using the KEGG pathways were realized on MetaboAnalyst v.5.0 program (Xia Lab, McGill University, Montreal, Canada).

Results

Effect of IF protocols on food and energy intake

Diet (Fig. S2A) and energy (Fig. S2B) intake were similar ($p > 0.05$) before starting interventions. However, diet (Fig. S2C) and energy intake (Fig. S2D) of rats subjected to a restriction (OCR) was lower compared to control and obese groups during the intervention period ($p \leq 0.05$).

Effect of different IF protocols on somatic parameters

HS diet induced obesity in OG, increasing weight, AC, CC, BMI and fat mass compared to CG ($p \leq 0.05$). All interventions (OIF, OIFCO, OCR) improved the somatic parameters of the rats compared to the OG (Table S4). OIFCO had higher BMI and lower fat mass compared to OIF ($p \leq 0.05$). However, OCR stood out among the interventions performed,

including in comparison to the CG ($p \leq 0.5$), especially regarding the maintenance of lean mass and reduction of fat mass (Table S4).

Effects of IF protocols on serum biochemical parameters

HS diet intake increased total cholesterol (Fig. 1A) and LDL (Fig. 1B) in OG rats. On the other hand, all interventions reduced triglycerides (Fig. 1D) and LDL (Fig. 1B), highlighting the effect of fasting associated with coconut oil consumption (OIFCO) which showed higher HDL (Fig. 1C) and lower LDL (Fig. 1C) among groups ($p \leq 0.05$). Furthermore, the LDL ($r = 0.74$) and post-prandial glucose ($r = 0.68$) were positively correlated ($p \leq 0.001$) to the fat mass (Fig. S3).

The OIFCO and OCR groups showed greater reductions in the triglycerides (Fig. 1D), glycaemia (Fig. 1E), and consequently metabolic load index (Fig. 1F) among the intervention groups (Fig. 1E). Metabolic load index was positively correlated ($p \leq 0.001$) to post-prandial glucose ($r = 0.74$) and mainly to TG ($r = 0.95$) (Fig. S3).

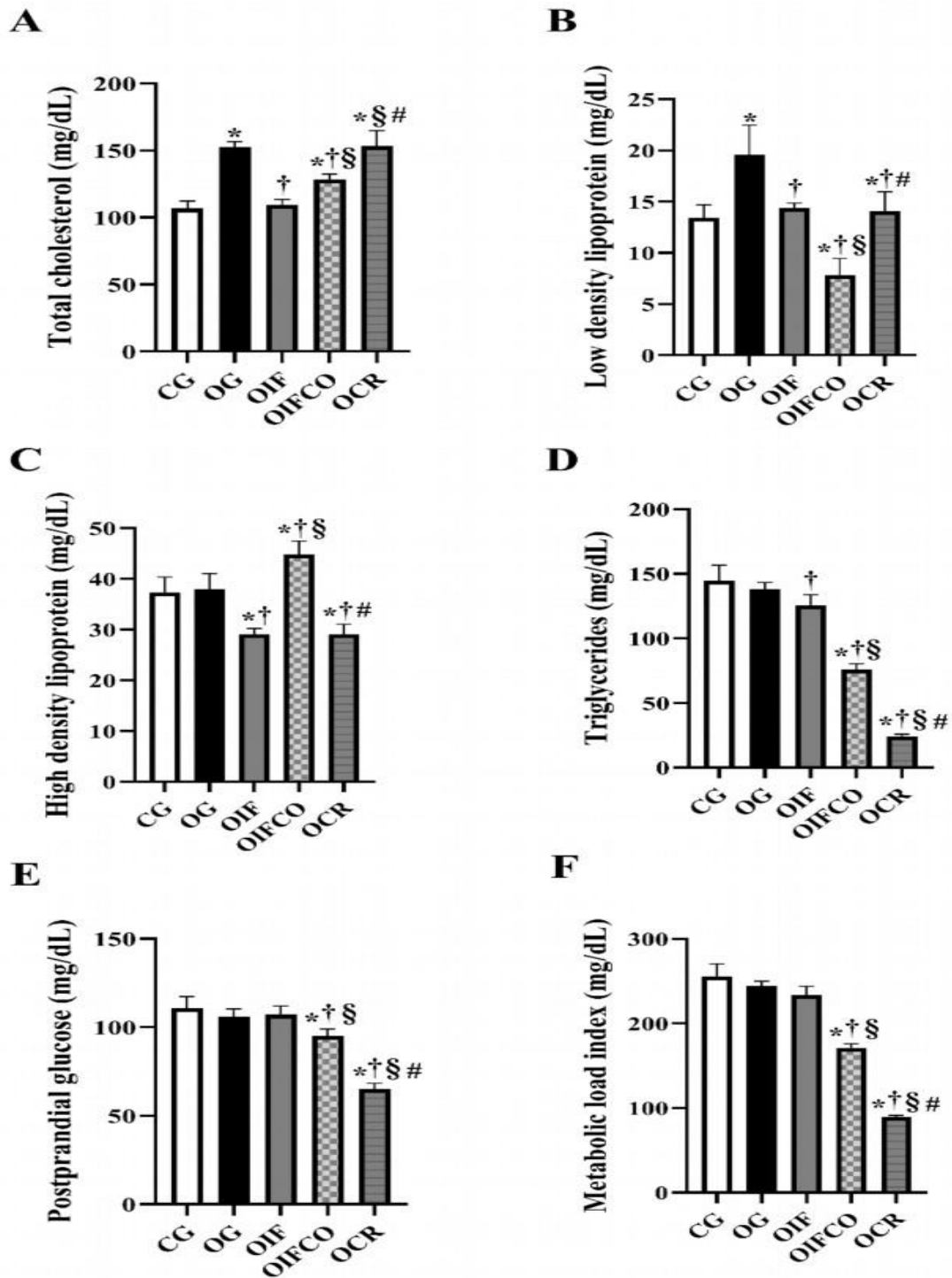


Fig. 1. Serum lipids (A-D), glycaemia (E) and metabolic load index (F) of rats. * Different from CG, † different from OG, § different from OIF, # different from OIFCO (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test, $p \leq 0.05$). Legend: CG = control group; OG = obese group; OIF= obese group submitted to intermittent fasting; OIFCO = obese group submitted to intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction.

Effects of IF protocols on triglycerides, total cholesterol, and bile acids contents in liver and faeces

All interventions resulted in changes in the faecal excretion of triglycerides, total cholesterol, and total bile acid (Fig. 2A and 2B). OIFCO group showed the highest faecal excretion of triglycerides (Fig. 2A) and total cholesterol (Fig. 4B), while the OCR group present high faecal excretions of total bile acids (Fig. 2C). Faecal excretion of triglycerides and total cholesterol had positive correlation ($p \leq 0.001$) to the liver triglycerides ($r = 0.83$) and liver total cholesterol ($r = 0.79$), respectively (Fig. S3).

In turn, the OIFCO group showed the highest hepatic accumulation of triglycerides (Fig. 2D), and total cholesterol (Fig. 2E) ($p \leq 0.05$), while the OIF group had the highest hepatic deposition of total bile acids among the other intervention groups (Fig. 2F) ($p \leq 0.05$).

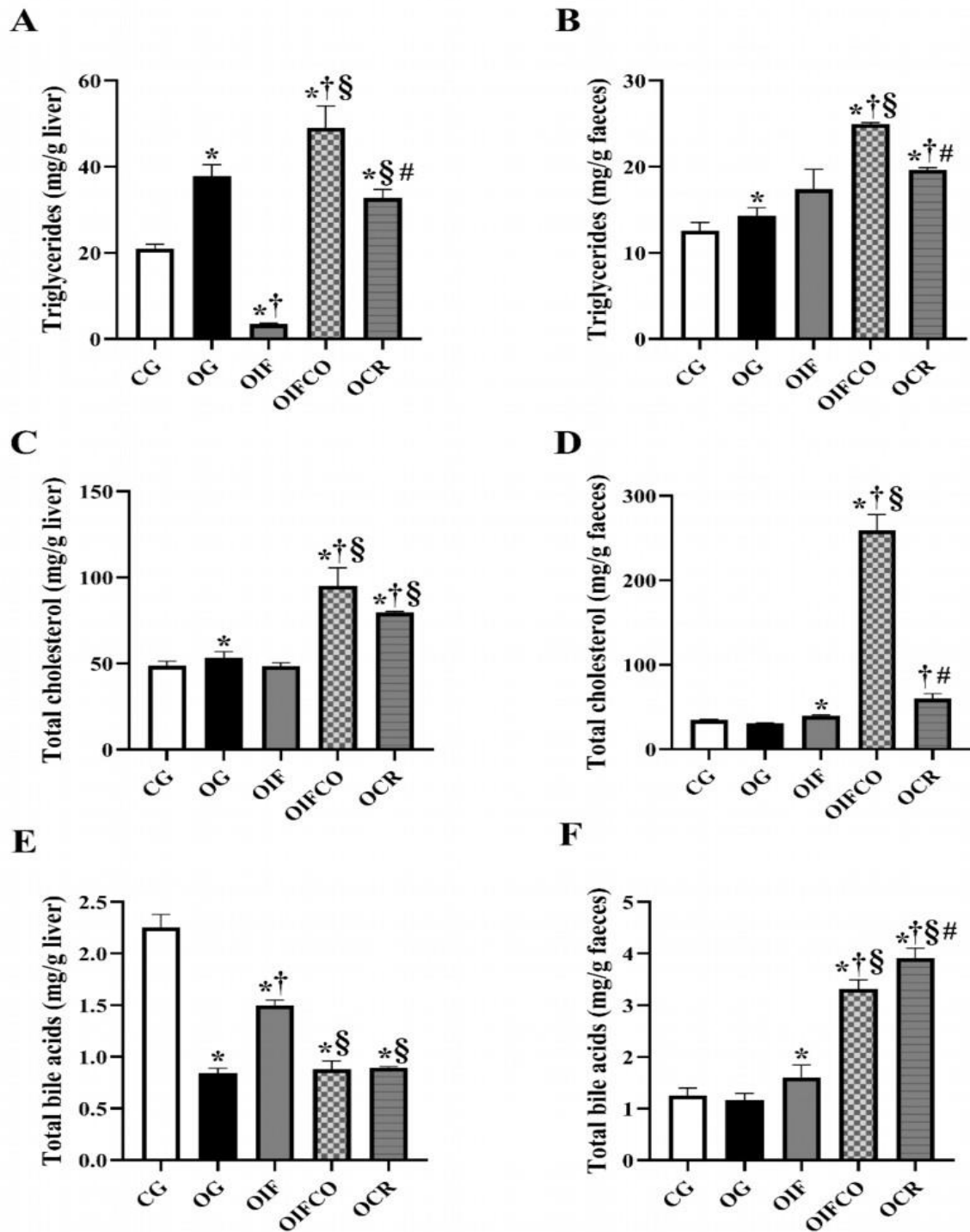


Fig. 2. Triglycerides (A and B), total cholesterol (C and D) and total bile acids (E and F) in liver (A, C and E) and faeces (B, D and F) of rats. * Different from CG, † different from OG, § different from OIF; # different from OIFCO (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test, $p \leq 0.05$). Legend: CG = control group; OG = obese group; OIF= obese group submitted to intermittent fasting; OIFCO = obese group submitted to intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction.

Effects of IF fasting protocols on bacterial counts in faeces

The OG had lower counts of *Bifidobacterium* (Fig. 3A) and higher counts of enterobacteria (Fig. 3C) and *E. coli* (Fig. 3D) compared to the control ($p \leq 0.05$). On the other hand, interventions in obese groups reduced *E. coli* counts (Fig. 3D), however neither diets nor interventions interfered with *Lactobacillus* counts (Fig. 3B), being similar among groups ($p > 0.05$).

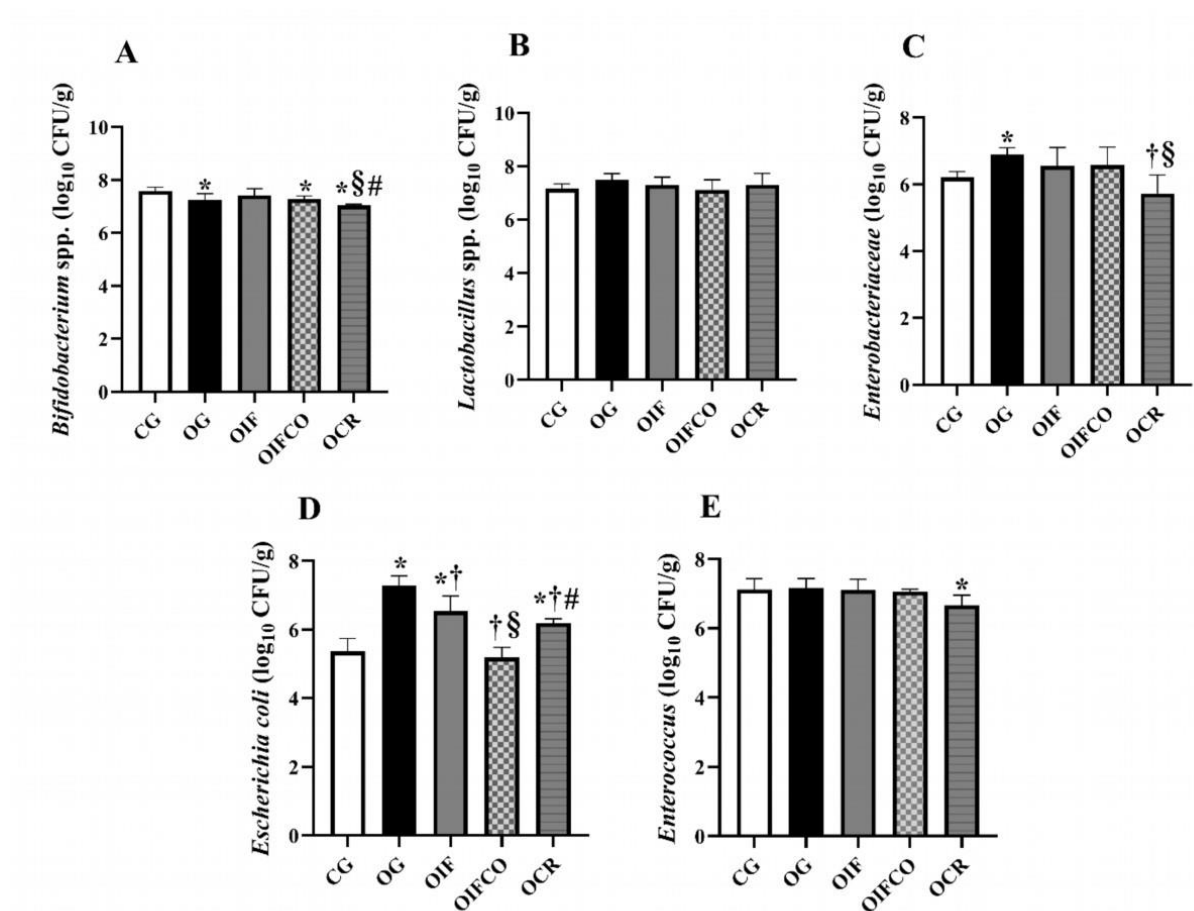


Fig. 3. Bacterial counts in faecal samples of rats. * Different from CG; † Different from OG; § Different from OIF; # Different from OIFCO (One Way ANOVA followed by Tukey's post-test, $p \leq 0.05$). Legend: CFU = colony forming units; CG = control group; OG = obese group; OIF= obese group submitted to intermittent fasting; OIFCO = obese group submitted to intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction.

Effects of IF protocols on organic acids and carbohydrates concentrations in faeces, intestine and liver

The OG group showed increased concentrations of all faecal and hepatic organic acids compared to the CG ($p \leq 0.05$), except for acetic and malic acids which were similar or not detected, respectively, in the faeces and liver of the obese (OG) and control (CG) groups and for butyric acid which were reduced in faeces and liver of OG *versus* CG (Table 2). However, the interventions reduced concentrations of total organic acids in faeces and increased concentrations in the liver ($p \leq 0.05$). All interventions increased concentrations of butyric acid in faeces, intestine and liver ($p \leq 0.05$). The OIF and OIFCO groups showed lower concentrations of formic acid in faeces, intestine and liver compared to the OG ($p \leq 0.05$). On the other hand, propionic acid concentrations were high in the liver and intestines of OIF and OIFCO as well as reduced in the faeces of these same groups when compared to OG ($p \leq 0.05$). In addition, OIF and OIFCO groups presented patterns of concentration of organic acids similar to each other, however differentiated from the OCR group in the faeces, intestine and liver, especially for formic, lactic and propionic acids ($p \leq 0.05$).

The acetic acid, butyric acid, citric acid, formic acid, lactic acid, malic acid, propionic acid, succinic acid, tartaric acid, glucose and maltose concentrations found in faeces, intestine and liver of rat groups were subjected to pathway analysis, in which the pathway most affected by metabolites were ($p \leq 0.05$; $FDR \leq 0.05$; pathway impact value ≥ 0.06): citrate or tricarboxylic acid cycle (TCA; citric and succinic acids) and pyruvate metabolism (lactic and acetic acids) (Fig. 4A, 4D and 4G; Tables S5-S7).

Table 1. Organic acids and sugars in the faeces, intestine and liver of rats.

	CG	OG	OIF	OIFCO	OCR
Faeces (mg/g)					
Glucose	0.25 ± 0.10	0.55 ± 0.05*	n.d.	n.d.	n.d.
Maltose	n.d.	1.40 ± 0.02	n.d.	n.d.	0.16 ± 0.06*
Total CHO	0.25	1.95	-	-	0.16
Acetic acid	2.50 ± 0.11	2.20 ± 0.02	n.d.	n.d.	1.00 ± 0.06*†
Butyric acid	8.02 ± 0.41	3.25 ± 0.19*	7.55 ± 0.33†	8.28 ± 0.11†§	7.29 ± 0.39†#
Citric acid	0.13 ± 0.02	0.31 ± 0.07*	0.08 ± 0.03*†	n.d.	0.07 ± 0.02*†
Formic acid	1.30 ± 0.03	2.90 ± 0.02*	0.01 ± <0.01*†	0.60 ± 0.01*†	3.00 ± 0.10*
Lactic acid	3.40 ± 0.19	11.00 ± 0.08*	n.d.	n.d.	3.30 ± 0.38†
Malic acid	n.d.	1.40 ± 0.02	0.15 ± <0.01†	n.d.	0.18 ± 0.03†
Propionic acid	24.00 ± 0.27	21.00 ± 0.47*	0.59 ± 0.01*†	n.d.	17.01 ± 0.52*†§
Succinic acid	0.57 ± 0.07	6.00 ± 0.06*	0.23 ± <0.01 *†	n.d.	0.34 ± <0.01 †§
Total OA	31.90	44.81	1.06	0.60	24.90
Intestine (mg/g)					
Acetic acid	n.d.	0.11 ± 0.01	2.30 ± 0.21†	1.90 ± 0.04†	0.12 ± 0.01§#
Butyric acid	6.57 ± 0.14	4.87 ± 0.24*	6.02 ± 0.22†	6.18 ± 0.31†	6.29 ± 0.30†
Formic acid	6.50 ± 0.25	4.80 ± 0.41	1.10 ± 0.12*†	1.60 ± 0.05*†§	4.70 ± 0.21*§#
Lactic acid	0.34 ± 0.07	0.51 ± 0.01	14.00 ± 0.68*†	10.00 ± 0.55*†§	0.32 ± 0.04†§#
Propionic acid	7.60 ± 0.70	7.30 ± 0.23	36.00 ± 0.33*†	13.00 ± 0.48*†§	6.80 ± 0.25†§#
Succinic acid	0.28 ± 0.01	1.30 ± 0.05*	0.01 ± <0.01 *†	0.21 ± 0.03*†§	1.30 ± <0.01*§#
Total OA	14.72	14.02	53.41	26.71	13.24
Liver (mg/g)					
Glucose	9.20 ± 0.15	12.00 ± 0.11*	n.d.	n.d.	11.00 ± 0.45
Total CHO					
Acetic acid	n.d.	n.d.	1.90 ± 0.03	0.36 ± <0.01 §	n.d.
Butyric acid	4.01 ± 0.34	1.87 ± 0.18*	4.12 ± 0.13†	4.58 ± 0.41†	4.19 ± 0.35†
Citric acid	0.26 ± 0.01	0.61 ± 0.06*	0.15 ± <0.01 *†	n.d.	0.39 ± 0.01*§

Continue

Table 1. Organic acids and sugars in the faeces, intestine and liver of rats.

	CG	OG	OIF	OIFCO	OCR
Liver (mg/g)					
Formic acid	13.00 ± 0.69	16.00 ± 0.16*	2.20 ± 0.09*†	7.40 ± 0.33*†§	19.00 ± 0.53*§#
Lactic acid	1.30 ± 0.05	1.30 ± 0.02	14.00 ± 0.70*†	8.00 ± 0.61*†§	1.20 ± 0.70§#
Malic acid	n.d.	n.d.	n.d.	4.69 ± <0.01	n.d.
Propionic acid	5.30 ± 0.27	9.50 ± 0.02*	32.00 ± 0.54*†	25.00 ± 0.54*†§	12.00 ± 0.32*†§#
Succinic acid	0.11 ± 0.01	0.28 ± 0.01*	0.17 ± 0.02*	n.d.	0.07 ± 0.01*†§
Tartaric acid	0.35 ± <0.01	0.15 ± <0.01*	n.d.	n.d.	0.29 ± 0.01*†
Total OA	20.32	27.84	50.42	32.95	32.95

* Different from CG; † Different from OG; § Different from OIF; # Different from OIFCO (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test or Student's t-test, $p \leq 0.05$). Legend: CG = control group; OG = obese rats without intervention; OIF = obese intermittent fasting; OIFCO = obese intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction; CHO = carbohydrates; n.d. = not detected; OA = organic acids.

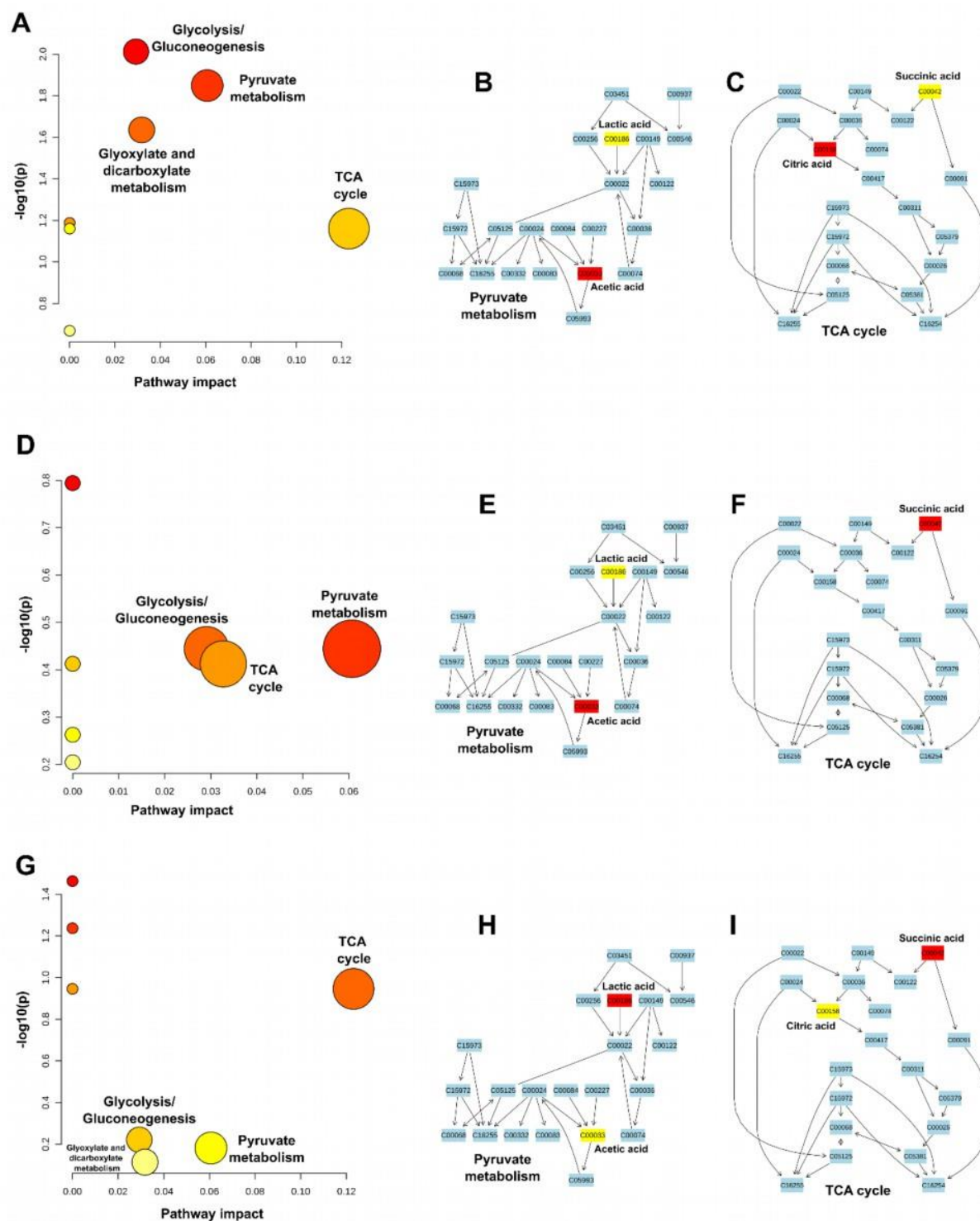


Fig. 4. Impact of organic acids and sugars on metabolic pathways in faeces (A), intestine (D) and liver (G) of rats. Each circle represents a metabolic pathway, the colour of the circle being based on p-values (darker colours indicate more significant changes of metabolites in the corresponding pathway), while the size of the circle corresponds proportionally to the pathway's impact score. Main metabolic pathways (selected by the size and colour of circles) affected by specific organic acids and/or sugars in faeces (B and C), intestine (E and F) and liver (H and I).

Effects of IF protocols on liver and intestinal histology

In the hepatic parenchyma, maintenance of architecture and organization of hepatocytes and hepatic vessels is observed, compatible with normality in all experimental conditions (Fig. 5A-E). In the histological analysis of the intestine, preserved villi are observed with maintenance of enterocytes and glands without abnormalities, with vascular preservation, compatible with normality in all experimental conditions (Fig. 5F-J).

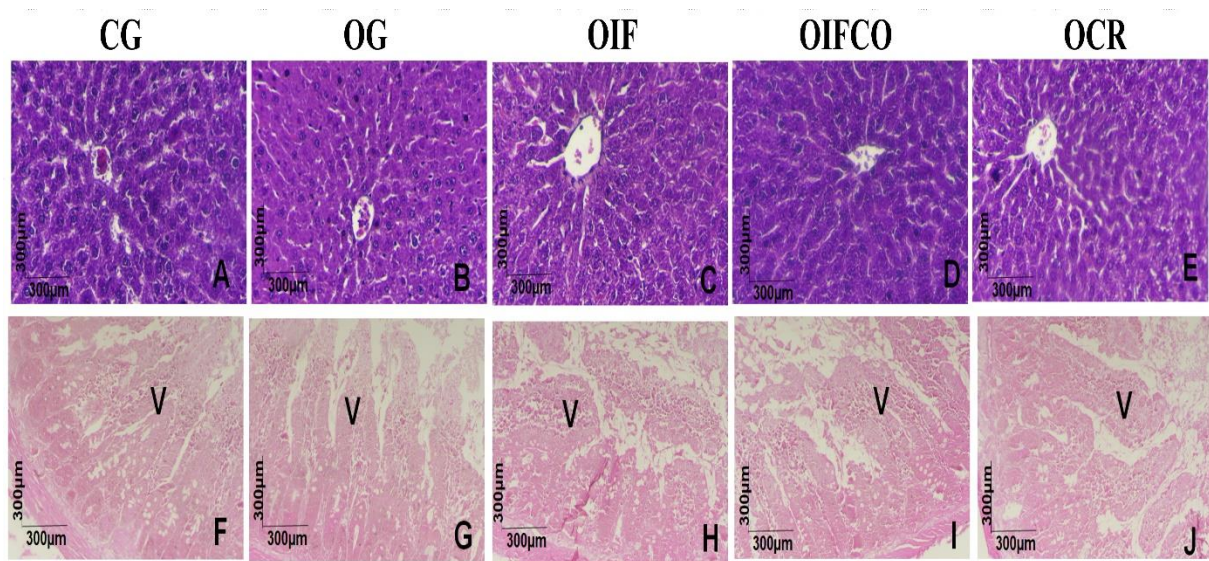


Fig.5. Histological sections stained with H&E of the liver (A-E) and intestine (F-J) of rats subjected to different experimental conditions. Legend: CG = control group; OG = obese rats without intervention; OIF = obese intermittent fasting; OIFCO = obese intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction; V= intestinal villus.

Discussion

Our results demonstrated that the diet rich in sugars (HS) such mono and disaccharides increased the fat mass, BMI, CC, AC and reduced the lean mass of the rats, in addition to increasing the serum TC and LDL and faecal *E. coli* count in the OG rats compared to the control group. The obese group also showed alterations in the concentrations of organic acids in the faeces, intestine and liver induced by the HS diet, when compared to the CG. On the other hand, the interventions carried out in the OIF,

OIFCO and OCR groups resulted in better somatic parameters, lower serum concentrations of TG and LDL, reduction in faecal *E. coli* counts, increase in the concentrations of total hepatic organic acids compared to the OG.

We observed that the OG remained with higher diet and energy consumption compared to the control in the last four weeks of the experiment. In turn, dietary and energy intake did not increase to compensate for the fasting periods in the OIF and OIFCO groups, which may indicate that there was no excessive compensatory consumption. Nevertheless, among interventions lower energy and diet intake were found in OCR. It is important to highlight that the OCR group received 30% of the total daily calories consumed by the OG group, however, the OIF and OIFCO groups consumed diet *ad libitum* during the feeding window.

The HS diet was efficient in inducing obesity in OG rats when compared to CG, by increasing BMI, fat mass and reducing lean mass. All interventions (OIF, OIFCO and OCR) were able to reduce BMI and fat mass and preserve lean mass in obese rats compared to OG. In the fasting period, lean mass can be preserved when ketone bodies are used as an energy source from the degradation of fatty acids (Jamshed *et al.*, 2019). CO associated with IF may also have contributed to the reduction in fat mass, since this oil is rich MCFA which are rapidly metabolized by the liver into energy in the form of ketones (Vasconcelos *et al.*, 2023). However, caloric restriction stood out among the interventions in terms of improving somatic parameters. In the ORC, caloric restriction can activate the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway (Hardie, Ross, & Hawley, 2012), an important signalling pathway involved in the regulation of energy homeostasis through fatty acid oxidation. Additionally, caloric restriction can decrease the activity of mammalian target of rapamycin (mTOR) (Sciarretta *et al.*, 2021), a signalling pathway that plays a critical role in anabolism and cellular growth. These processes result in improved preservation of lean mass and reduction of body fat (Ge *et al.*, 2022).

OIFCO and OCR groups exhibited the lowest metabolic load index. TG and glucose are substrates that can undergo acute changes after food intake, and elevated levels of postprandial glycaemia and triglycerides can cause tissue damage, increasing the risk of diabetes, cardiovascular diseases, and other chronic diseases (Erridge *et al.*, 2007). Thus, metabolic load index is a measure that can provide a better understanding of the metabolic challenge level that an organism faces during the fasting period or after food intake (Emerson *et al.*, 2016).

In our study the HS diet led to an increase in serum levels of TC and LDL in obese rats in comparison to control. The nutritional interventions were able to reduce the values of TC, LDL, and TG, and particularly in the OIFCO group, still to increase HDL levels in the rats' serum. Consistent with our findings, Marinho *et al.* (2019) observed that male adult obese rats subjected to IF for 4 weeks, the same duration used in our study, exhibited a reduction in serum concentrations of TG and TC. Furthermore, these beneficial results on serum lipid profile may be related to the profile of bioactive compounds in virgin coconut oil, such as MCFA, phenolic compounds, vitamin E, and phytosterols (Zicker *et al.*, 2019). It is worth noting that phenolic compounds are antioxidants that help prevent LDL oxidation and consequently atherosclerosis (Famurewa and Ejezie, 2018).

OIFCO showed increased faecal excretion of TG and TC without interfering with the levels of hepatic TC and TG. However, there was a significant reduction in serum TG, TC, and LDL profiles, along with a notable increase in HDL. This effect is likely due to the presence of CO, which is rich in MCFA that are easily absorbed and metabolized by the liver, where they are converted into ketone bodies and used as an energy source. This action leads to a decrease in fatty acid synthesis in the liver, resulting in a decrease in cholesterol and triglyceride synthesis (Zhao *et al.*, 2023).

Beyond that, IF can also stimulate the production of bile acids, which are synthesized by the liver from cholesterol. Previous study has shown that IF can increase the excretion of bile acids, which may contribute to the reduction of circulating cholesterol levels in the blood and, consequently, lead to higher excretion of TC and TG in faeces (Askungar *et al.*, 2022).

Regarding faecal microbiota, the higher counts of *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* in the obese rat group may partially explain the elevated faecal excretion of organic acids, reflecting increased production of these acids through microbial fermentation. A hypercaloric diet promotes intestinal dysbiosis (DO *et al.*, 2018), in which microorganisms require a greater amount of energy from the diet and produce organic acids for their proliferation (Bai *et al.*, 2018). Lower faecal count of *E. coli* in OIFCO rats, a potentially pathogenic bacterial species, is related to the MCFA present in coconut oil that interact with bacterial cell membranes and are responsible for the antibacterial activity of these compounds (Yoon *et al.*, 2018). The lipophilic tail of fatty acids aggregates with the phospholipids presents in the bacterial membrane, causing disruption of membrane integrity and subsequent oxidation (Desbois *et al.*, 2010). Moreover, MCFA can disrupt electron transfer reactions by binding to electron carriers.

This process prevents the production of cellular energy and decreases the membrane potential, interfering with oxidative phosphorylation (Yonn *et al.*, 2018), thus hindering the proliferation of *Escherichia coli*.

OIF and OIFCO groups had higher intestinal and hepatic concentrations of organic acids and maintained a similar pattern of metabolism of these compounds. This groups had the lowest faecal concentrations of propionic acid compared to the other intervention groups. This decrease is likely associated with the higher concentration of propionic acid in colonic tissues, enabling its utilization as an energy source by the body during fasting (Schonfeld and Wojtczak, 2016). In addition, lactic acid is used to synthesize propionic acid, which may also have influenced these results (Vasconcelos *et al.*, 2023). Propionic acid can be converted into succinate, which is also an intermediate of the TCA cycle and they play a significant role in regulating energy metabolism, with a preventive effect against obesity (Chambers *et al.*, 2015).

Additionally, we observed a reduction in faecal acetic acid in the caloric restriction group, which is consistent with the findings of Butner *et al.* (2009). Their research demonstrated that caloric restriction leads to a decrease in extracellular acetic acid due to reduced availability of carbohydrates and lipids as energy sources. This reduction is justified by the increased activity of enzymes involved in fatty acid oxidation and ketone production, such as acetyl-CoA carboxylase and hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, which convert acetic acid into acetyl-CoA (Zheng *et al.*, 2012). This conversion is responsible for ATP production and facilitates the utilization of this organic acid as an alternative energy source (Vadder *et al.*, 2016).

Previous studies indicate that obesogenic diets reduce levels of faecal butyric acid, which was also observed in the present study. Butyric acid can bind to the GPR41 receptor, a G-protein-coupled receptor. The GPR41 receptor plays a role in regulating energy metabolism and appetite, primarily through the activation of peptide YY (PYY). This interaction among butyric acid, the GPR41 receptor and PYY may potentially offer benefits against obesity (Van Deuren *et al.*, 2022). On the other hand, all interventions (OIF, OIFCO and ORC) were able to increase butyric acid concentrations in the liver, intestine and faeces, which is particularly important due to the role of this acid in modulating the intestinal barrier, since its presence in intestinal cells stimulates physiological, metabolic and immunological processes. In addition, butyric acid helps to reduce luminal pH, inhibiting the growth of pathogenic bacteria that can be harmful to health (Cantu-Jungles *et al.*, 2019).

Our results indicated that although exposure to HS diet caused systemic changes in lipid metabolism and synthesis and excretion of organic acids, the period of exposure to the diet may not have been sufficient to change the morphology of hepatic and enteric tissues. Furthermore, despite the HS diet being rich in mono- and disaccharides, the global amount of carbohydrates (72.71%) is lower than that contained in the commercial diet (75.57%) and both are in accordance with the nutritional recommendations for rodents (Reeves *et al.*, 1993), which may also have influenced these results.

As limitations of the study, it would be relevant to evaluate the effects of IF protocols compared to caloric restriction on enzymes involved in the beta-oxidation of fatty acids, such as carnitine palmitoyltransferase I, Acyl-CoA dehydrogenase. For future studies, the inclusion of the obese group treated with CO and the obese group treated with CO combined with caloric restriction could bring other prominent metabolic responses along the enterohepatic axis. However, it is essential to emphasize the importance of the results of this study, which sought to demonstrate the effects of an IF protocol associated with CO frequently performed by the human population and also compare it with caloric restriction, which is the gold standard of dietary intervention in obesity. This study presented, for the first time in the literature, the effects of these interventions on intestinal and hepatic health in obese rats.

Our results demonstrated that all interventions improved somatic parameters such as BMI, fat mass and lean mass, as well as lipid parameters in obese rats, with emphasis on IF associated with CO and on the caloric restriction. All interventions reduced the faecal count of the potentially pathogenic microorganism *E. coli* and mainly affected the pyruvate metabolism and the TCA cycle, reducing the accumulation of body fat in the rats. Thus, IF associated with CO brought benefits in several parameters of the enterohepatic axis, comparable to caloric restriction in obese rats. Such effects may be related to the antioxidant compounds and MCFA present in CO, and this protocol is proposed as a variation of existing fasting protocols, which may be an alternative in combating disorders of the enterohepatic axis caused by obesity.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors express their thanks to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (grant number 001) for granting the scholarship to H.C.C., M.L.V.D., A.N.V.A., L.M.G.D. and K.S.B., to the Post Graduate Program in Nutritional Sciences and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant number 312620/2021-7) for granting the scholarship to J.S.A and the Bioclin® for donating of kits for lipid analysis. The authors thank Christopher Quinn for the English revision.

References

- ALBILLOS, Agustín; DE GOTTARDI, Andrea; RESCIGNO, María. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. **Journal of hepatology**, v. 72, n. 3, p. 558-577, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>
- AOAC, 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21th Ed. USA: AOAC International. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.6.127A>
- BAI, Juan; ZHU, Ying; DONG, Ying. Modulation of gut microbiota and gut-generated metabolites by bitter melon results in improvement in the metabolic status in high fat diet-induced obese rats. **Journal of functional foods**, v. 41, p. 127-134, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.050>
- BATISTA, Kamila Sabino *et al.* Acerola fruit by-product alleviates lipid, glucose, and inflammatory changes in the enterohepatic axis of rats fed a high-fat diet. **Food Chemistry**, v. 403, p. 134322, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134322>
- BOQUIST, Susanna *et al.* Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. **Circulation**, v. 100, n. 7, p. 723-728, 1999. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.7.723>
- CHAMBERS, Edward S. *et al.* Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut**, v. 64, n. 11, p. 1744-1754, 2015. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307913>.
- CHATTERJEE, Pratishtha *et al.* Potential of coconut oil and medium chain triglycerides in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 186, p. 111209, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111209>
- COELHO, Emanuela Monteiro *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>

DE VADDER, Filipe *et al.* Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. **Cell metabolism**, v. 24, n. 1, p. 151-157, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.013>

DESBOIS, Andrew P.; SMITH, Valerie J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, p. 1629-1642, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

DO, Moon Ho *et al.* High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 761, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10060761>

DOMASZEWSKI, Przemysław *et al.* Effect of a six-week intermittent fasting intervention program on the composition of the human body in women over 60 years of age. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 4138, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114138>

DORAND, V. A. M., Soares, N. L., da Silva Andrade, A. D. A., Ribeiro, M. D., de Almeida Filho, E. J. B., Neto, M. M., ... & de Souza Aquino, J. (2023). Intermittent fasting associated with aerobic exercise improves oxidative parameters and causes muscle damage without compromising the performance of Wistar rats. *Nutrition*, 112159. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112159>

EMERSON, Sam R. *et al.* Summation of blood glucose and TAG to characterise the 'metabolic load index'. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 9, p. 1553-1563, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003585>

ERRIDGE, Clett *et al.* A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **The American journal of clinical nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1286-1292, 2007. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1286>

FAMUREWA, Ademola Clement; EJEZIE, Fidelis Ebele. Polyphenols isolated from virgin coconut oil attenuate cadmium-induced dyslipidemia and oxidative stress due to their antioxidant properties and potential benefits on cardiovascular risk ratios in rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.

FOLCH, Jordi *et al.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

HARDIE, D. Grahame; ROSS, Fiona A.; HAWLEY, Simon A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 251-262, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>

HONG, N. *et al.* Determination of total bile acids in bile by phosphomolybdate colorimetry. *Shanghai Medical Journal*, v. 1, p. 1-12, 1983. <https://doi.org/10.3390/nu10060761>

JAMSHED, Humaira *et al.* Early time-restricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1234, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11061234>

KOBYLIAK, Nazarii; VIRCHENKO, Oleksandr; FALALYEYEVA, Tetyana. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutrition journal**, v. 15, p. 1-12, 2015. [https://doi.org/ 10.1186/s12937-016-0166-9](https://doi.org/10.1186/s12937-016-0166-9)

LANGEVELD M, DeVries JH. The long-term effect of energy restricted diets for treating obesity. *Obesity*.2015;23(8):1529–1538. <https://doi.org/10.1002/oby.211>

LIU, Ruixin *et al.* Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. **Nature medicine**, v. 23, n. 7, p. 859-868, 2017. <https://doi.org/10.1038/nm.4358>

LUZ, Anna Beatriz Santana *et al.* Adipocytes and intestinal epithelium dysfunctions linking obesity to inflammation induced by high glycemic index pellet-diet in Wistar rats. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.1042/BSR20180304>

MARINHO, Thatiany de Souza *et al.* Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. **Nutrition**, v. 65, p. 103-112, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.02.020>

MATÍAS-PÉREZ, Diana; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, Emilio; GARCÍA-MONTALVO, Iván Antonio. Intermittent fasting may optimize intestinal microbiota, adipocyte status and metabolic health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 16-23, 2022. [https://doi.org/ 10.6133/apjcn.202202/PP.0001](https://doi.org/10.6133/apjcn.202202/PP.0001)

MILOSEVIC, Ivana *et al.* Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: a review of the literature. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 395, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20020395>

NAIR, Anroop B.; JACOB, Shery. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016. <https://doi.org/10.5530/ijper.56.3.108>

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007. <https://doi.org/10.1258/002367707779399518>

PATTERSON, Ruth E.; SEARS, Dorothy D. Metabolic effects of intermittent fasting. *Annu Rev Nutr*, v. 37, n. 1, p. 371-93, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064634>

PERCIE DU SERT, Nathalie *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 40, n. 9, p. 1769-1777, 2020. <https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>

PUGH, Thomas D.; KLOPP, Roger G.; WEINDRUCH, Richard. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. **Neurobiology of aging**, v. 20, n. 2, p. 157-165, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00043-3)

REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY JR, George C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

SCIARRETTA, Sebastiano *et al.* Miméticos de restrição calórica para o tratamento de doenças cardiovasculares. **Cardiovascular Research**, v. 117, n. 6, pág. 1434-1449, 2021. See More. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa297>

SOARES, Nais Lira *et al.* Does intermittent fasting associated with aerobic training influence parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats?. *Journal of Affective Disorders*, v. 293, p. 176-185, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.06.028>

VAJRO, Pietro; PAOLELLA, Giulia; FASANO, Alessio. Microbiota and gut-liver axis: a mini-review on their influences on obesity and obesity related liver disease. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 56, n. 5, p. 461, 2013. <https://doi.org/10.1097%2FMPG.0b013e318284abb5>

VAN DEUREN, Thirza; BLAAK, Ellen E.; CANFORA, Emanuel E. Butyrate to combat obesity and obesity-associated metabolic disorders: Current status and future implications for therapeutic use. **Obesity Reviews**, v. 23, n. 10, p. e13498, 2022. <https://doi.org/10.1111/obr.13498>

VASCONCELOS, Maria Helena Araújo *et al.* Extra virgin coconut oil (*Cocos nucifera* L.) intake shows neurobehavioural and intestinal health effects in obesity-induced rats. **Food & Function**, 2023. <https://doi.org/10.1039/D3FO00850A>

VOGEL, Christine Érika *et al.* Effect of coconut oil on weight loss and metabolic parameters in men with obesity: a randomized controlled clinical trial. **Food & function**, v. 11, n. 7, p. 6588-6594, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0FO00872A>

WHO NEWS (2021). Accessed at 19/07/2023

YOON, Bo Kyeong *et al.* Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 1114, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>

ZHAO, J., Pike, B., Huang, J., Feng, Z., Odle, J., & Lin, X. (2023). Effects of medium chain triglycerides on hepatic fatty acid oxidation in clofibrate-fed newborn piglets. *Animal Nutrition*, 12, 334-344. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.12.001>

ZHENG, Yubin *et al.* Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: ammonia's effect. **biomass and bioenergy**, v. 37, p. 114-121, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.022>

ZICKER, Marina Campos *et al.* Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 63, p. 117-128, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.013>

Supplementary materials

Table S1. Ingredients and macronutrients of the control diet and diet rich in sugars which used in the experiment.

Ingredients and composition	Diets	
	Control	HS
Ingredients		
Crushed feed (g)	100.00	45.20
Refined sugar (g)	-	9.60
Commercial condensed milk (mL)	-	45.20
Macronutrients (%)		
Carbohydrate	75.57 ± 0.14	72.71 ± 0.16*
Protein	22.00 ± 0.10	23.00 ± 0.10*
Fat	2.43 ± 0.01	4.29 ± 0.01*
Energy value (kcal)	412.15	421.45

* Significant difference between the diets (Student's t-test, $p \leq 0.05$); HS= high-sugar diet

Table S2. Organic acids and sugars quantified in the control diet and in the diet rich in sugars which used in the experiment.

Parameters	Diets	
	Control	HS
Mono and disaccharides (mg/g)		
Glucose	1.89 ± 0.09	37.64 ± 0.93*
Fructose	0.83 ± 0.15	28.82 ± 0.24*
Maltose	0.13 ± 0.02	11.30 ± 1.64*
Total sugars (mg/g)	2.85	77.76
Organic acids (mg/g)		
Acetic	0.08 ± <0.01	n.d.
Butiric	n.d.	n.d.
Formic	1.87 ± 0.78	0.52 ± 0.15
Propionic	2.44 <0.01	0.22 ± 0.03*
Citric	3.37 ± 0.84	2.48 ± 0.40
Malic	5.04 <0.01	n.d.
Succinic	1.34 ± 0.05	2.61 ± 0.19*
Tartaric	n.d.	n.d.
Total organic acids (mg/g)	14.82	9.02

* Significant difference between the diets (Student's t-test, $p \leq 0.05$). Legend: n.d= not detected; HS= high-sugar diet

Table S3. Fatty acid composition of virgin coconut oil used in the experiment.

Fatty acids (%)	Virgin coconut oil
Caproic acid C 6:0	1.82 ± 0.32
Caprylic acid C 8:0	5.87 ± 0.35
Capric acid C 10:0	6.43 ± 0.05
Lauric acid C12:0	50.78 ± 0.1
Miristic acid C 14:0	18.32 ± 0.05

Palmitic acid C16:0	8.03 ± 0.03
Stearic acid C18:0	2.81 ± 0.02
Arachidic acid C20:0	0.08 ± 0.01
Total saturated fatty acids (SFA%)	94.14 ± 0.93
Myristoleic acid C14:1 n5c	n.d.
Palmitoleic acid C16:1 n7	n.d.
Oleic acid C18:1 n9c	4.99 ± 0.02
Vaccenic acid C18:1 n11	0.05 ± <0.01
Gadoleic acid C20:1 n9	0.01 ± <0.01
Total monounsaturated fatty acids(MUFA%)	5.05 ± 0.02
Linoleic acid C18:2 n6 c (ω 6)	0.83 ± 0.01
Total polyunsaturated fatty acids(PUFA%)	0.83 ± 0.01
Total medium chain fatty acids (MCFA, C₆-C₁₂)	64.90
Total long chain fatty acids (LCFA, C₁₄-C₂₄)	35.12

Legend: n.d= not detected.

Table S4. Somatic parameters of rats.

Parameters	Groups				
	CG	OG	OIF	OIFCO	OCR
Final weight (g)	395±20.49	447.5±33.28*	321.7±18.35*†	375±18.97§	277.5±12.94*†§#
Length (cm)	24.17±0.68	25.83±0.81	24.25±0.52	25.25±0.42	24±0.84†
AC (cm)	18.42±0.66	20.25±0.76*	17±0.32*†	17.25±0.69*†	15.83±0.82*†§#
CC (cm)	15.17±0.26	17.67±0.82*	14.08±0.59*†	14.67±0.61†	13.33±0.41*†§#
BMI (g/cm ²)	0.66±0.01	0.69±0.01*	0.54±0.04*†	0.60±0.02*†§	0.53±0.05*†#
Lean mass	95.03±0.47	90.44±0.20*	95.31±0.17†	96.04±0.65†	97.56±0.20*†§
Fat mass	4.98±0.45	7.11±0.11*	4.46±0.25†	3.82±0.05†§	1.91±0.07*†§#

Values expressed as mean, with standard deviation from the mean. * Different from CG; † different from OG; § different from OIF; # different from OIFCO (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test, $p \leq 0.05$). Legend: CG = control group; OG = obese group; OIF= obese group submitted to intermittent fasting; OIFCO = obese group submitted to intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction; AC = Abdominal circumference; CC= Chest circumference; BMI = body mass index.

Table S5. Pathway analysis for organic acids and carbohydrates from the faeces of rats

Pathway Name	Total	Hits	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impact
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	3	0.0097178	2.0124	0.068025	0.049558	0.02927
Pyruvate metabolism	22	2	0.014159	1.849	0.084956	0.049558	0.06065
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	3	0.023151	1.6354	0.11575	0.054019	0.03175
Propanoate metabolism	23	2	0.064905	1.1877	0.25962	0.080665	0.0
Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	0.069141	1.1603	0.25962	0.080665	0.12311
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	2	0.069141	1.1603	0.25962	0.080665	0.0
Butanoate metabolism	15	2	0.21447	0.66862	0.25962	0.21447	0.0

Raw p, the original p-value calculated by enrichment analysis; Holm p, p value adjusted by Holm Bonferroni method; FDR, false discovery rate.

Table S6. Pathway analysis for organic acids and carbohydrates from the intestine of rats

Pathway Name	Total	Hits	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impact
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	2	0.16063	0.79419	1.0	0.54156	0.0
Pyruvate metabolism	22	2	0.35938	0.44444	1.0	0.54156	0.06065
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	2	0.35938	0.44444	1.0	0.54156	0.02906
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	0.38683	0.41248	1.0	0.54156	0.03273
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	1	0.38683	0.41248	1.0	0.54156	0.0
Butanoate metabolism	15	2	0.54602	0.26279	1.0	0.62425	0.0
Propanoate metabolism	23	2	0.62425	0.20464	1.0	0.62425	0.0

Raw p, the original p-value calculated by enrichment analysis; Holm p, p value adjusted by Holm Bonferroni method; FDR, false discovery rate.

Table S7. Pathway analysis for organic acids and carbohydrates from the liver of rats

Pathway Name	Total	Hits	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impact
Propanoate metabolism	23	2	0.034444	1.4629	0.24111	0.19824	0.0
Butanoate metabolism	15	2	0.058004	1.2365	0.34802	0.19824	0.0
Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	0.11328	0.94585	0.5664	0.19824	0.12311
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	2	0.11328	0.94585	0.5664	0.19824	0.0
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	3	0.60083	0.22125	1.0	0.76786	0.02927
Pyruvate metabolism	22	2	0.65817	0.18166	1.0	0.76786	0.06065
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	3	0.76906	0.11404	1.0	0.76906	0.03175

Raw p, the original p-value calculated by enrichment analysis; Holm p, p value adjusted by Holm Bonferroni method; FDR, false discovery rate.

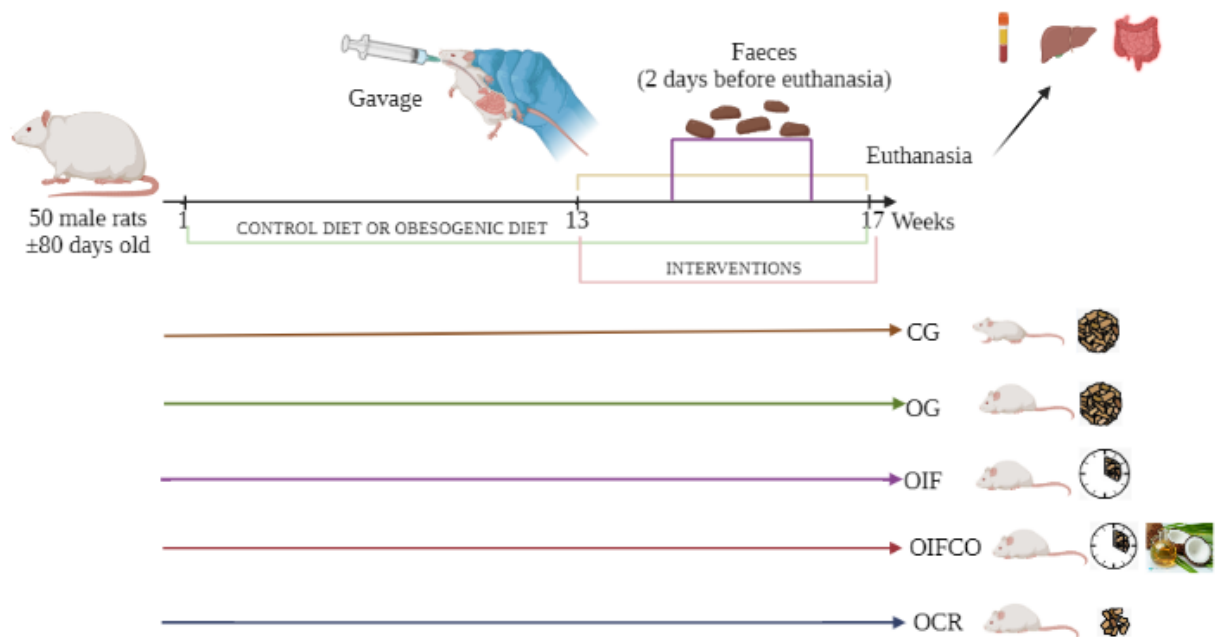


Fig. S1. Flowchart of the study design. Legend: CG = control group; OG = obese group; OIF= obese group submitted to intermittent fasting; OIFCO = obese group submitted to intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction. HS = high-sugar diet.

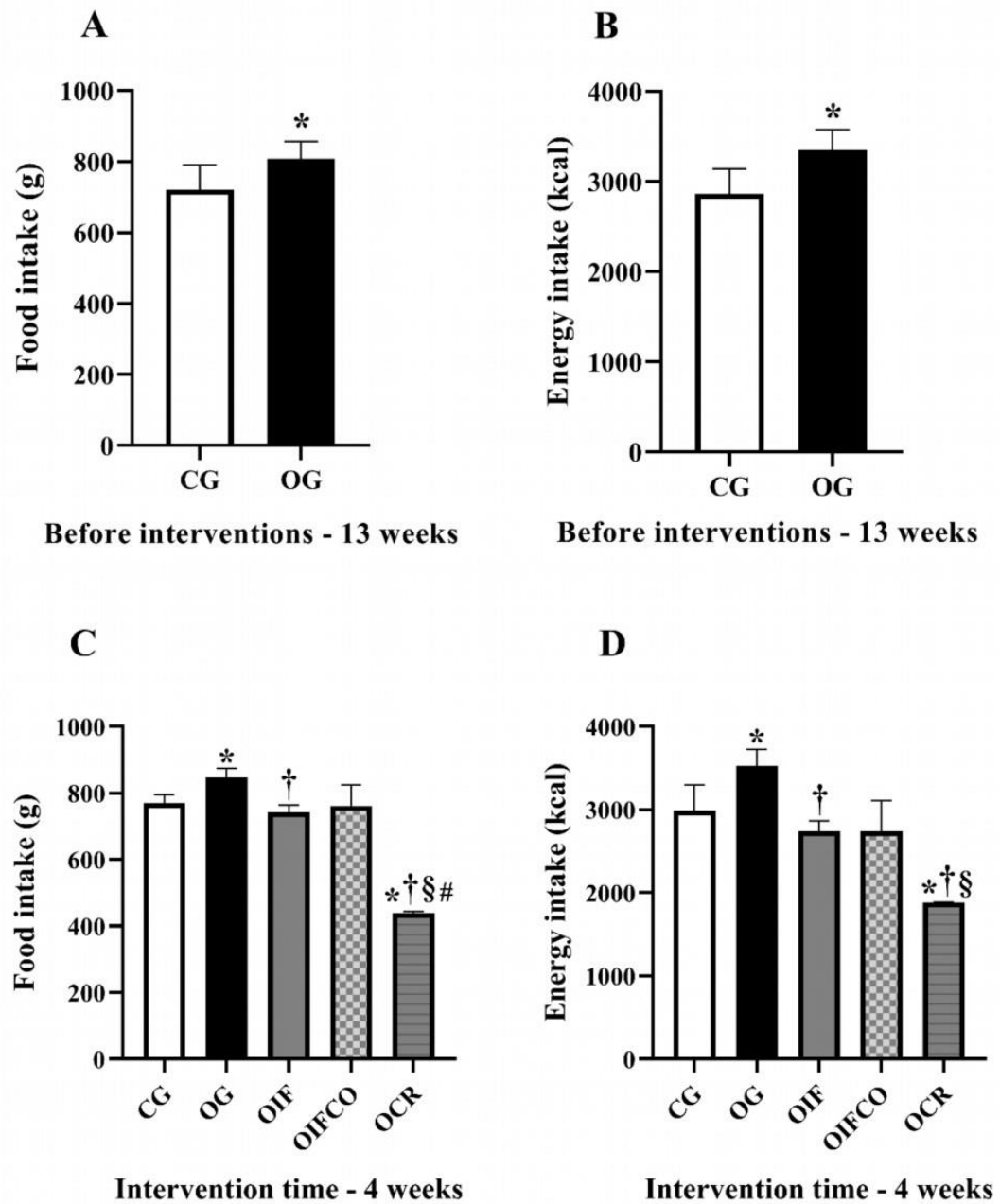


Fig. S2. Food (A) and energy intakes (B) before starting interventions; and food (C) and energy intakes (D) during the intervention period. Consumption data were based only on dietary intake. * Different from CG; † different from OG; § different from OIF, # different from OIFCO (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test or Student's t-test, $p \leq 0.05$). Legend: CG = control group; OG = obese group; OIF= obese group submitted to intermittent fasting; OIFCO = obese group submitted to intermittent fasting associated with coconut oil; OCR= obese group submitted to caloric restriction.

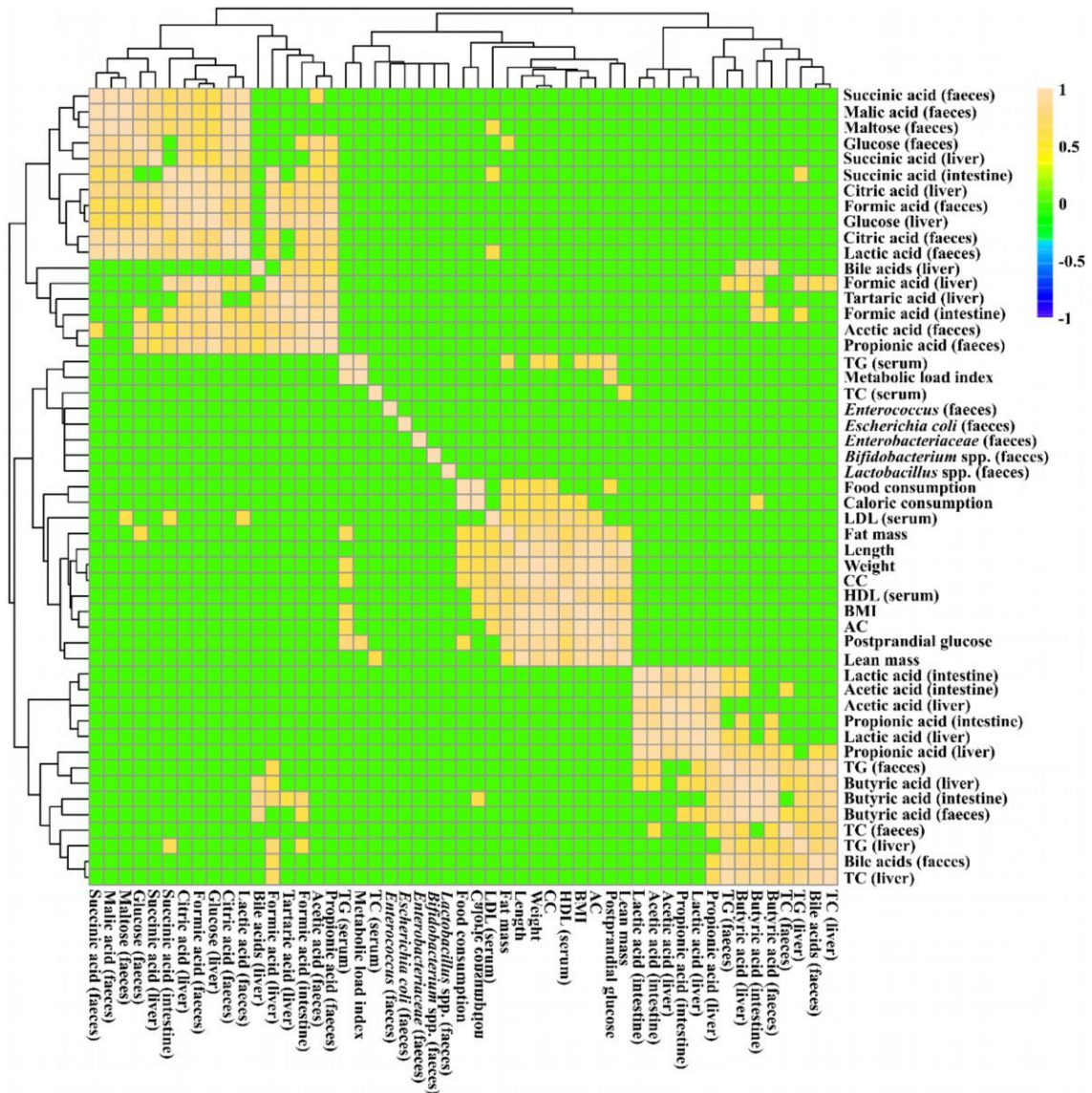


Fig. S3. Hierarchical grouping based on Pearson's correlation matrix between biological parameters of rats. Significant correlations were determined based on an $r \geq 0.6$ and $p \leq 0.05$. Positive and negative correlations are shown as yellow and blue, respectively.

ANEXO



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE COCO (Cocos nucifera L.) SOBRE RATOS HIPERINSULINÊMICOS", protocolada sob o CEUA nº 5752150319 (ID 000756), sob a responsabilidade de **Jailane de Souza Aquino e equipe; Hassler Clementino Cavalcante** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 09/08/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECTS OF INTERMITTENT FUSION ASSOCIATED WITH THE SUPPLEMENTATION OF COCONUT OIL (Cocos nucifera L.) ON HYPERINSULINEMIC RATS", utilizing 108 Heterogenics rats (108 males), protocol number CEUA 5752150319 (ID 000756), under the responsibility of **Jailane de Souza Aquino and team; Hassler Clementino Cavalcante** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 08/09/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2019** a **03/2020** Área: **Nutrição**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 70 dias**

N: **108**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Local do experimento: Laboratório de Nutrição Experimental, Centro de Ciências da Saúde, UFPB.

João Pessoa, 10 de agosto de 2019

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba