

ANDRESSA RODRIGUES DE SOUSA

**EFEITO DA FARINHA DE SORGO (*Sorghum bicolor* L.) EXTRUSADO NA
ESTEATOSE HEPÁTICA, NA MICROBIOTA INTESTINAL, NA
INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS OBESOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S895e
2017

Sousa, Andressa Rodrigues de, 1992-
Efeito da farinha de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) extrusado na esteatose hepática, na microbiota intestinal, na inflamação e no estresse oxidativo em ratos obesos / Andressa Rodrigues de Sousa. – Viçosa, MG, 2017.

xiii, 93f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Obesidade. 2. Farinha de sorgo. 3. Compostos bioativos. 4. Microbiota. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 616.398

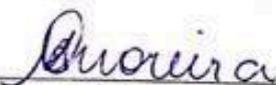
ANDRESSA RODRIGUES DE SOUSA

**EFEITO DA FARINHA DE SORGO (*Sorghum bicolor* L.) EXTRUSADO NA
ESTEATOSE HEPÁTICA, NA MICROBIOTA INTESTINAL, NA
INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS OBESOS**

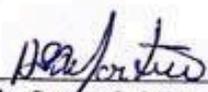
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.


Hilario Cuquetto Mantovani
(Coorientador)


Maria Eliza de Castro Moreira
(Coorientadora)


Renata Celi Lopes Toledo


Hercia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

Dedico este trabalho aos meus pais, Jarina e José Raimundo, os grandes incentivadores dos meus sonhos e objetivos. Gratidão à vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, agradeço pelas inúmeras bênçãos em minha vida, e pela força e coragem que me deu para enfrentar todos os desafios durante essa etapa.

Aos meus pais, Jarina e José Raimundo, que mesmo distantes fisicamente faziam-se presentes diariamente por meio de ligações e mensagens, dando apoio e me amparando nas horas difíceis.

À minha irmã, Katrine Rodrigues, por seu amor, alegria e pelas boas conversas.

À Aluisio Paiva, por todo amor, companheirismo, incentivo, paciência e por todas as sugestões e contribuições.

À Poliana Cristina, pelo acolhimento desde que cheguei em Viçosa, pela amizade, aconselhamentos, risadas e por toda a ajuda de sempre. Vou sentir muita falta.

À professora Hercia Stampini, por me receber e possibilitar essa incrível oportunidade de aprendizado, por todos os seus ensinamentos, orientação e carinho que sempre teve. Minha profunda gratidão.

À Embrapa Milho e Sorgo, em especial à Dra. Valéria Queiroz pela disponibilização da matéria-prima e todo o apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À Maria Eliza e Renata Celi, por toda a ajuda, contribuição e paciência no decorrer deste trabalho. Me faltam palavras para agradecer.

Ao professor Hilario Mantovani e a todos do laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, em especial a Cláudia e a Juliana, por toda a atenção, ensinamentos, sugestões e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Ao professor Laércio dos Anjos, pelos seus ensinamentos, contribuições e pelos bons momentos de conversas e descontração.

Ao laboratório de Ecofisiologia de Morcegos, em especial Jerusa Oliveira, por seus ensinamentos, disponibilidade e toda ajuda sempre.

À todos os colegas do Laboratório de Nutrição Experimental, pelas contribuições, ensinamentos, conversas e bons momentos compartilhados durante esse período.

Aos colegas do Departamento de Nutrição, principalmente, às meninas do Maranhão, com quem tive o prazer de conviver nesses dois anos em Viçosa, obrigada por todo o carinho, amizade, conversas e descontração.

À banca examinadora por suas sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

À Capes, pela concessão da bolsa parcial de estudos.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDRESSA RODRIGUES DE SOUSA, filha de José Raimundo Vasconcelos de Sousa e Jarina Rodrigues de Sousa, nasceu em 10 de Julho de 1992, em São Luís, Maranhão.

Em agosto de 2010, ingressou no Curso de Nutrição da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) graduando-se Nutricionista em agosto de 2014.

Em março de 2015, iniciou o mestrado no Programa de Pós - Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Valor Nutricional, Funcional e Controle de Qualidade de Alimentos e de Dietas, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral:	17
2.2. Objetivos Específicos:	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Obesidade e suas complicações metabólicas.....	18
3.2. Microbiota intestinal: aspectos gerais	20
3.3. Microbiota intestinal e obesidade.....	22
3.4. Sorgo: aspectos gerais	26
3.4.1. Composição química e propriedades funcionais do sorgo	28
3.4.2. Potencial do sorgo na modulação do estresse oxidativo.....	31
3.4.3. Potencial do sorgo na modulação da microbiota intestinal.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Apresentação	36
4.2. Locais de execução.....	36
4.3. Matéria-prima:	36
4.4. Animais e dietas experimentais	37
4.5. Dados biométricos	39
4.6. Expressão gênica no tecido hepático.....	40
4.7. Extração nuclear e citoplasmática de células hepáticas	42
4.8. Quantificação de PPAR- α em tecido hepático	42
4.9. Histomorfometria do fígado	43
4.10. Extração de DNA de amostras fecais	44
4.11. Análise da microbiota intestinal por RT-qPCR.....	45
4.12. Determinação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta	46
4.13. Citocinas	47
4.14. Determinação da proteína NF- κ B por Western Blotting.....	47
4.15. Enzimas antioxidantes e marcador de peroxidação lipídica no fígado.....	48
4.16. Quantificação de proteína dos homogeneizados de fígado	49

4.17. Malondialdeído pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	49
4.18. Óxido Nítrico (ON)	50
4.19. Superóxido Dismutase (SOD).....	50
4.20. Catalase.....	50
4.21. Glutationa S-Transferase (GST).....	51
REFERÊNCIAS	52
5. ARTIGOS	61
5.1. ARTIGO 1: Farinha de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.) extrusado melhora a lipogênese hepática e a biometria de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.....	61
Resumo	61
Materiais e Métodos	63
Resultados.....	67
Discussão	73
Conclusão	76
Referências	77
5.2 ARTIGO 2: Farinha de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.) extrusado melhora a microbiota intestinal, reduz a inflamação e o estresse oxidativo em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.....	80
Resumo	80
Introdução.....	80
Materiais e Métodos	82
Resultados.....	88
Discussão	94
Conclusão	97
Referências	98
6. CONCLUSÃO GERAL	103
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
ANEXO	105

ABREVIATURAS E SIGLAS

3-DXA	3- Deoxiantocianinas
ACC	Acetil coenzima-A carboxilase
ADIPOR1/R2	Receptor do hormônio adiponectina (1 e 2)
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AIN-93M	Dieta da <i>American Institute of Nutrition</i> para animais adultos (para manutenção)
AMPK	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
BHT	Butilhidroxitoluol
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Capacidade antioxidante total
CEA	Coefficiente de Eficiência Alimentar
CEE	Coefficiente de eficiência energética
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento regulador de carboidratos
COX-2	Cicloxigenase-2
CPT-1α	Carnitina palmitoil transferase 1 alfa
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMT2	Diabetes melito tipo 2
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FAS	Ácido graxo sintase
FIAF	Fator adipocitário induzido pelo jejum
FSE	Farinha de sorgo extrusado
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
GLUT-1	Transportador de glicose tipo-1
GPR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutationa peroxidase
GST	Glutationa S- transferase
HFD	Dieta hiperlipídica

HSP	Proteína de choque térmico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimioatrativa para monócitos -1
MDA	Malondialdeído
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NQO	NADH:quinona oxireductase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor de ativação do plasminogênio-1
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PPAR-α	Receptor ativado por proliferador de peroxissomas alfa
PYY	Peptídeo tirosina-tirosina
RT-qPCR	Transcrição Reversa associada à Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SCD1	Estearoil coenzima A dessaturase
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1c	Proteína ligada ao elemento regulador de esterol 1c
TAG	Triacilglicerol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLR4	Receptor 4 do tipo <i>toll-like</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
ZO-1	Zonula occludens -1

RESUMO

DE SOUSA, Andressa Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Efeito da farinha de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) extrusado na esteatose hepática, na microbiota intestinal, na inflamação e no estresse oxidativo em ratos obesos.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Ceres Mattos Della Lúcia, Hilário Cuquetto Mantovani, Maria Eliza de Castro Moreira e Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

O consumo de dietas hiperlipídicas está associado ao desenvolvimento da obesidade e outras complicações metabólicas, em parte, por promover alterações na composição da microbiota intestinal. A farinha de sorgo extrusado (FSE), obtida a partir do grão de sorgo marrom (*Sorghum bicolor* L.), genótipo SC 319, é um cereal rico em fibra alimentar, compostos bioativos e antioxidantes, que pode exercer efeitos benéficos à saúde por modular positivamente a microbiota intestinal e os sintomas associados a obesidade. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da FSE na biometria, na esteatose hepática, na microbiota intestinal, nos marcadores inflamatórios e no estresse oxidativo em ratos obesos. Ratos machos adultos *Wistar* (n=32) foram inicialmente divididos em dois grupos de alimentação: grupo AIN-93M como controle eutrófico (n = 8) e grupo HFD (dieta hiperlipídica; n = 24) para indução da obesidade, por sete semanas. Ao final desse período, o grupo AIN-93M foi mantido, e os animais obesos foram redistribuídos em três grupos: HFD (n = 8), HFDS50 (HFD + FSE substituindo 50% da fibra alimentar e 100% de amido de milho da dieta; n = 8) e HFDS100 (HFD + FSE substituindo 100% da fibra alimentar e 100% de amido de milho da dieta; n = 8) por oito semanas. Os resultados deste estudo demonstraram que a FSE contribuiu para a redução do índice de massa corporal, bem como o peso do fígado dos animais obesos. Além disso, verificou-se redução da lipogênese hepática nesses animais em virtude do aumento da expressão gênica e dos níveis proteicos do receptor ativado por proliferador de peroxissomas α (PPAR- α) e da expressão gênica do receptor de adiponectina 2 (AdipoR2), associado com a redução da expressão gênica da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c). As análises histológicas confirmaram a redução do grau de esteatose hepática nos animais alimentados com a FSE. Adicionalmente, a FSE melhorou a composição da microbiota intestinal e o perfil inflamatório por aumentar a proporção do filo *Bacteroidetes* em razão do filo *Firmicutes*, além de reduzir a expressão e níveis proteicos do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-

κB) e resistina. A FSE restaurou a capacidade antioxidante total do plasma reduzindo a peroxidação de lipídios, as espécies reativas e aumentando a expressão gênica da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e da proteína de choque térmico 72 (HSP72). Esses resultados indicam que a FSE produzida a partir do genótipo de sorgo de pericarpo marrom foi eficaz para melhorar as medidas biométricas, a lipogênese hepática, modular positivamente a microbiota intestinal, reduzir a inflamação e o estresse oxidativo, podendo, portanto, ser considerada um alimento com potencial funcional na prevenção da obesidade e suas co-morbidades.

ABSTRACT

DE SOUSA, Andressa Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Extruded sorghum (*Sorghum bicolor* L.) flour effect in hepatic steatosis, intestinal microbiota, inflammation and oxidative stress in obese mice.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisers: Ceres Mattos Della Lúcia, Hilário Cuquetto Mantovani, Maria Eliza de Castro Moreira and Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

The high fat diet intake is associated with the development of obesity and other metabolic complications, in part, to promote changes in the composition of the gut microbiota. Extruded sorghum flour (ESF), acquired from sorghum brown grains (*Sorghum bicolor* L.), genotype SC 319, is known as being a cereal rich in dietary fiber, bioactive compounds and antioxidants, which has positive effects on health by modulating positively human gut microbiota as well as symptoms associated with obesity. This study investigated the ESF effect on biometrics modulation; hepatic steatosis and gut microbiota; inflammatory markers and oxidative stress in obese mice fed a high fat diet. Adult male *Wistar* rats (n = 32) were initially divided into two feeding groups: AIN-93M as lean control (n = 8) and HFD group (n = 24) for induction of obesity for seven weeks. At the end of this period, the AIN-93M group was maintained, and obese animals were redistributed into three groups: HFD (n = 8), HFDS50 (HFD + FSE replacing 50% of dietary fiber and 100% of maize starch from the diet, N = 8) and HFDS100 (HFD + FSE replacing 100% of dietary fiber and 100% of maize starch in the diet, n = 8) for eight weeks. ESF contributed on decline for body bulk marks, as well as obese mice liver weight. ESF reduced hepatic lipogenesis due to expression increase and protein levels of peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR α) and increase in the adiponectin receptor 2 (AdipoR2) gene expression associated with reduced expression on the protein binded to the sterol regulatory element 1c (SREBP-1c). Histological analysis confirmed a hepatic steatosis degree reduction on the liver. The ESF improvement gut microbiota composition by increasing *Bacteroidetes* phylum proportion over the *Firmicutes* phylum, that fact had occur accompanied by an inflammatory profile amelioration with lower expression and lower transcription factor nuclear kappa B (NF- κ B) protein levels. Results also showed a decreasing of serum levels of resistin. ESF has restored the plasma total antioxidant capacity by reducing lipid peroxidation and reactive species beside increasing the antioxidant enzyme superoxide dismutase

(SOD) and heat shock protein 72 (HSP72) expression. Results indicate that ESF should be considered a food with functional potential and also can prevent the obesity and hepatic steatosis.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT) caracterizada pela deposição em excesso ou anormal de gordura no tecido adiposo. É uma doença que alcança proporções epidêmicas tanto em países desenvolvidos como nos países subdesenvolvidos. De acordo com o último dado da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2014, cerca de 1,9 bilhões de adultos em todo o mundo estavam acima do peso e mais de 600 milhões eram obesos. A etiologia da obesidade é multifatorial e envolve fatores biológicos, ambientais e neuropsicológicos, sendo normalmente, associada a alterações clínico-metabólicas tais como, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hipertensão, dislipidemias, esteatose hepática e outras (ABESO, 2016).

O desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia, constitui um dos principais fatores responsáveis para o desenvolvimento da obesidade. O consumo de dietas hipercalóricas, principalmente ricas em gorduras saturadas e carboidratos simples, está associado ao acúmulo de gordura no tecido adiposo, e podem promover alteração na composição da membrana celular de adipócitos, modular a transcrição de diferentes genes envolvidos na lipogênese e lipólise de ácidos graxos, além de alterar o padrão de produção e secreção das adipocinas (REYNÉS et al., 2017). A desregulação no metabolismo de lipídios em indivíduos obesos está associada à ativação de vias inflamatórias, estresse oxidativo, esteatose hepática e outras comorbidades que culminam no desenvolvimento de patologias, como a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (BROWNING; HORTON, 2004).

A inflamação no tecido adiposo e a lipogênese, características da obesidade, também podem ser parcialmente resultados da relação dieta-hospedeiro- microbiota intestinal. É crescente o número de evidências que demonstram o papel das dietas, especialmente relacionadas ao consumo de gorduras saturadas, afetando de maneira significativa a composição do ecossistema intestinal e influenciando na abundância de fatores microbianos inflamatórios circulantes (LAM et al., 2015; ZHOU et al., 2017). Os fatores microbianos (lipopolissacarídeos, flagelinas, peptideoglicanos) induzem a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, que alteram a expressão de genes do hospedeiro e promovem estado patogênico (CAESAR et al., 2015). Estudos têm demonstrado que ratos *germ-free* são resistentes à obesidade induzida por dieta e

exibem redução da inflamação no tecido adiposo, além de diminuição da absorção de glicose, redução da lipogênese hepática, aumento da oxidação de ácidos graxos e diminuição no depósito de triacilglicerol (TAG) nos adipócitos e em outros órgãos, demonstrando dessa forma o possível papel da microbiota intestinal nas desordens metabólicas da obesidade (BACKHED et al., 2004, 2007).

Sendo assim, a modulação da ecologia do intestino por meio da dieta para melhorar a saúde do hospedeiro, reduzir a incidência de obesidade e outras doenças associadas, tem sido interesse de muitos autores (CAESAR et al., 2015; SONNENBURG; BÄCKHED, 2016). Os alimentos ricos em compostos bioativos, possuem atividade biológica comprovada e por isso estão sendo amplamente estudados, em virtude dos seus inúmeros benefícios à saúde. Os compostos bioativos e seus benefícios funcionais estão associados à sua atuação direta por meio da absorção (e de seus metabólitos) e indireta mediada por compostos não absorvidos que modificam a microbiota colônica e, conseqüentemente, todo o metabolismo com ações antioxidantes, anti-inflamatória, anticâncer e cardioprotetora (SHARMA et al., 2007; FLOEGEL et al., 2010; FREJNAGEL, S.; JUSKIEWICZ, J., 2011).

Nesse contexto, o sorgo (*Sorghum bicolor L.*) é uma excelente fonte de compostos bioativos, especialmente as 3-deoxiantocianinas (3-DXAs), taninos e policosanóis, além das fibras alimentares, alguns minerais, lipídios insaturados, vitaminas lipossolúveis e do complexo B que garantem uma boa qualidade nutricional e uma potente ação funcional a esse cereal (MARTINO et al., 2012; QUEIROZ et al., 2015). No entanto, muitas das propriedades biológicas do sorgo integral, não são utilizadas pelos sistemas biológicos em virtude das características estruturais dos seus compostos bioativos, como ácidos fenólicos ligados a cadeias de arabinosilanos e taninos de alta massa molecular. Essas características dificultam o processo de digestão de compostos bioativos no trato gastrointestinal superior reduzindo a sua biodisponibilidade e portanto, a atividade (LOPEZ et al., 2016).

Algumas técnicas de processamento, como a extrusão de cereais, utilizadas no intuito de viabilizar o consumo de sorgo por humanos e animais, vem sendo considerada promissora na produção de alimentos funcionais à base de cereais (GUMUL; KORUS, 2006; ANUNCIACÃO et al., 2017). O processamento por extrusão utiliza uma combinação de calor, umidade e trabalho mecânico, que modifica as matérias-primas, proporcionando novos formatos e estruturas com diferentes características funcionais e nutricionais em um curto espaço de tempo

(ALAM et al., 2016). Sugere-se que as elevadas temperaturas utilizadas nesse processamento favoreçam para a redução do grau de polimerização de taninos e também, fragmentem a estrutura de arabinosilanos, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos e portanto, o seu potencial biológico (CARDOSO et al., 2015a; LOPEZ et al., 2016). Em virtude disso, sugere-se que as dietas contendo farinha de sorgo marrom extrusado tenham ação importante na melhora de alterações metabólicas decorrentes da obesidade, como a biometria e a esteatose hepática de animais obesos, bem como a composição da microbiota intestinal, o perfil inflamatório e as defesas antioxidantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da farinha de sorgo extrusado (*Sorghum bicolor* L.) na esteatose hepática, na microbiota intestinal, na inflamação e no estresse oxidativo de ratos *Wistar* adultos obesos.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito do consumo de farinha de sorgo extrusado em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica sobre as medidas biométricas, o processo de lipogênese, oxidação e retenção de gorduras do tecido hepático;

- Avaliar o efeito do consumo de farinha de sorgo extrusado em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica sobre a composição da microbiota intestinal e a produção de ácidos graxos de cadeia curta, sobre os marcadores do processo inflamatório, o dano oxidativo e sobre as defesas antioxidantes;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Obesidade e suas complicações metabólicas

Considerada como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, a obesidade afeta não apenas nações industrializadas, mas também países em desenvolvimento, constituindo-se um fator de risco para outras doenças metabólicas, tais como o diabetes melito e as doenças cardiovasculares. Segundo a OMS, a prevalência da obesidade duplicou desde 1980 e em 2014, aproximadamente, 1,9 bilhões de pessoas adultas estavam com sobrepeso e 600 milhões de indivíduos apresentavam obesidade em todo o mundo.

A obesidade é resultado de interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais, que caracteriza-se pelo acúmulo de gordura corporal em consequência de desequilíbrios no metabolismo energético. O aumento na ingestão de energia proveniente de dietas hipercalóricas somado a redução no gasto energético por inatividade física, leva ao acúmulo de gordura inicialmente no tecido adiposo (KOPELMAN, 2000). No entanto, o depósito de gordura pode ocorrer em tecidos como do fígado, pâncreas, músculo esquelético e coração, o que caracteriza a lipotoxicidade, e prejudica o funcionamento normal desses órgãos. A lipotoxicidade ativa vias inflamatórias que prejudicam a sinalização celular normal em células imunitárias, tecido adiposo, fígado e músculo causando disfunção celular, consequentemente desordens metabólicas como a resistência à insulina e diabetes melito (LYONS; KENNEDY; ROCHE, 2016).

O tecido adiposo além de ser o principal órgão de armazenamento de gordura (na forma de TAG), também funciona como um órgão endócrino, pois produz uma série de substâncias conhecidas como adipocinas, as quais destacam-se a leptina, adiponectina e resistina. Também são secretadas pelas células adiposas o Fator de Necrose tumoral α (TNF- α), o Inibidor de ativação do plasminogênio 1 (PAI-1), a Interleucina -6 (IL-6), a interleucina- 1 β (IL-1 β), a interleucina- 8 (IL-8), a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), entre outras. A produção e a excreção desses fatores, com exceção da adiponectina, se intensificam com a obesidade, sendo muitos deles, como resistina, TNF- α , PAI-1, IL-6 e MCP-1 diretamente associados à indução de resistência à insulina e intensificação de estados pró-inflamatórios (ALEMANY, 2013).

Apesar de ser predominante no tecido adiposo, a expressão dessas citocinas também ocorrem em outros tecidos, como fígado, pâncreas e cérebro, aumentando, portanto, a inflamação na obesidade. Alguns estudos que avaliaram as fases iniciais de expressão das citocinas inflamatórias identificaram que as c-jun N-terminal cinases (JNKs) e a cinase do inibidor de fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (IKK) são os principais contribuintes intracelulares na indução da inflamação em tecidos metabólicos (GREGOR et al., 2009; NAKAMURA et al., 2010). Os efeitos biológicos provenientes da inflamação metabólica mediada por ativação do NF- κ B são deletérios em níveis celular e tecidual e contribui para o desenvolvimento da síndrome metabólica, diabetes melito tipo 2 (DMT2) e hipertensão arterial (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

A adiponectina, tanto em humanos quanto em roedores, possui ação anti-inflamatória e antiaterogênica e diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (WEYER et al., 2001). Sua ação anti-inflamatória e antiaterogênica está associada a supressão do NF- κ B e de moléculas de adesão vascular por inibir a fosforilação de proteínas cinases I kappa B (I κ B). Portanto, a redução da concentração plasmática de adiponectina em indivíduos obesos é um fator de risco independente para o desenvolvimento do DMT2 e complicações cardiovasculares (PISCHON et al., 2004). Além disso, a adiponectina também está associada à redução do acúmulo de TAG e o mecanismo pelo qual isso ocorre envolve a sensibilização de seus receptores hepáticos (AdipoR1 e AdipoR2), os quais ativam a proteína cinase dependente de AMP (AMPK) e o fator de transcrição nuclear do proliferador de peroxissomas α (PPAR- α), importantes reguladores da oxidação de ácidos graxos. O PPAR- α é membro da família de receptores nucleares que regula o metabolismo de nutrientes incluindo gliconeogênese e metabolismo de aminoácidos, além de mediar a captação, ativação e oxidação de ácidos graxos, por meio da transcrição e ativação de genes alvos, dentre eles a carnitina palmitoil transferase 1- α (CPT-1 α) (AHIMA; LAZAR, 2008).

Em indivíduos eutróficos, tanto a adiponectina quanto a leptina são propostas por atuar indiretamente no músculo e no fígado estimulando a fosforilação e ativação de AMPK. No fígado, a ativação de AMPK reduz a expressão de enzimas envolvidas na gliconeogênese como glicose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxicinase 1 e também de genes relacionados a lipogênese, como a proteína de ligação ao elemento regulador de estero1 1c (SREBP-1c), fator transcricional que regula a homeostase

lipídica por controlar a expressão de uma gama de enzimas necessárias para a síntese de TAG (AHIMA; LAZAR, 2008). Tem sido demonstrado que a menor sensibilidade à leptina no cérebro está relacionada a maior acúmulo de TAG no tecido adiposo e em outros tecidos, como o fígado; e as deficiências dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 induzem um quadro de esteatose hepática, inflamação, resistência à insulina e estresse oxidativo (UNGER, 2002; YAMAUCHI et al., 2007).

As dietas hipercalóricas, ricas em gorduras saturadas e colesterol, constitui-se como um dos fatores responsáveis por modular as vias de sinalização celular e desta forma alterar o metabolismo de lipídios promovendo o aumento no estoque de TAG em células não adiposas. Além disso, o excesso de lipídios provenientes da dieta pode promover alteração na composição da membrana celular de adipócitos, modular a transcrição de diferentes genes envolvidos na lipogênese e lipólise e alterar o padrão de produção e secreção das adipocinas (BROWNING; HORTON, 2004).

Excesso de TAG em tecidos como o fígado (esteatose) estão associados ao desenvolvimento da DHGNA, a qual é considerada uma das principais alterações metabólicas relacionadas a obesidade. As múltiplas vias metabólicas que estão envolvidas com o desenvolvimento da esteatose hepática incluem o aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados do tecido adiposo, aumento na síntese *de novo* de ácidos graxos e redução na β -oxidação. Estes eventos aumentam a vulnerabilidade do fígado ao estresse oxidativo que contribui para a progressão da doença a estágios mais avançados como esteato-hepatite, fibrose e cirrose (POSTIC; GIRARD, 2008; DOWMAN et al., 2010).

3.2. Microbiota intestinal: aspectos gerais

O trato gastrointestinal, tanto de humanos quanto de animais, é composto por trilhões de células bacterianas, coletivamente referidas de microbiota intestinal. É um ecossistema de alta complexidade e compreende em cerca de 90% os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, sendo o restante composto por *Actinobacterias* e *Proteobacterias*. Também constituem, em menor proporção, os filos *Synergistetes*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* e *Archea*. As classes de bactérias mais abundantes do filo *Firmicutes* incluem *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes* e dos *Bacteroidetes* são as *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Esfingobacterias* (QIN et al., 2010).

O maior número de células bacterianas encontra-se no trato gastrointestinal (cavidade oral, estômago e intestino), principalmente, no intestino grosso (10^{11} por

grama de conteúdo intestinal). A concentração específica e os tipos de bactérias são influenciados pelas variações micro habitacionais ao longo do intestino, tais como pH, oxigênio e disponibilidade de nutrientes (DIBAISE et al., 2008). As diversas interações entre microrganismo-hospedeiro modulam a composição da microbiota, tornando-a única para cada indivíduo (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006).

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na saúde do hospedeiro. Estudos utilizando ratos *germ-free* têm mostrado que a microbiota intestinal é crítica para a manutenção gastrointestinal, digestão de nutrientes e função imunológica. A microbiota intestinal autoctone ajuda a prevenir a colonização do lúmen por bactérias patogênicas, como algumas espécies de *Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella* e *Shigella* (GORBACH, 2000; DIBAISE et al., 2008). Embora não entendida completamente, esse ecossistema também está envolvido em funções importantes para o hospedeiro relacionadas ao desenvolvimento e função intestinal, *turnover* epitelial, imunomodulação, motilidade gastrointestinal e metabolismo de fármacos.

A microbiota também possui funções metabólicas importantes como a metabolização de toxinas alimentares e substâncias cancerígenas, síntese de micronutrientes (vitamina K e do complexo B), auxílio na absorção de certos eletrólitos e minerais, fermentação de substâncias alimentares não digeríveis (amido resistente, fibra alimentar e outros polissacarídeos de baixa digestão) e afeta o crescimento e diferenciação de enterócitos e colonócitos por meio da produção de AGCC como, butírico, acético e propiônico (DIBAISE et al., 2008). Os AGCC são a fonte de energia predominante das células intestinais e, auxiliam na reorganização do epitélio intestinal e suas junções mantendo a homeostase (WONG et al., 2006). Além disso, a maior produção de acetato e propionato ajuda a prevenir a colonização de espécies de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (SAAD; SANTOS; PRADA, 2016).

Uma vez que a homeostase da microbiota intestinal é interrompida, ocorre a disbiose. Frequentemente, a disbiose favorece a colonização de bactérias patogênicas, além de indução da atividade virulenta de patobiontes condicionais nativos, que podem causar diretamente a doença inflamatória intestinal e a colite infecciosa. Além disso, também tem sido apontada como um dos mais importantes fatores no desenvolvimento de outras doenças, incluindo a enterocolite necrozante, câncer de cólon, síndrome do intestino irritável, diabetes tipo I e II e a obesidade

(MORGUN et al., 2015). Apesar do crescente interesse em estudar a microbiota intestinal, há importantes lacunas no conhecimento sobre como esse ecossistema pode afetar a saúde, em particular, no que se refere a obesidade.

3. 3. Microbiota intestinal e obesidade

Muitos são os estudos que demonstram a relação causal entre a microbiota intestinal e a obesidade. No entanto, é importante enfatizar que a obesidade induzida pela dieta apresenta alterações metabólicas por mecanismos que podem ser independentes ou dependentes da microbiota intestinal.

Apesar dessa relação complexa, vem crescendo o número de evidências que demonstram as diferenças na composição da microbiota intestinal de indivíduos obesos em relação a microbiota de indivíduos magros. O papel da alimentação nessa relação vem sendo amplamente estudado e foi demonstrada sua interferência de maneira significativa na composição do ecossistema intestinal e no desenvolvimento de desordens metabólicas relacionadas (LAM et al., 2015; ZHOU et al., 2017).

Embora não haja consenso na literatura acerca dos grupos taxonômicos de microorganismos que caracterizam a microbiota de indivíduos obesos e eutróficos, a disbiose intestinal na obesidade tem sido amplamente correlacionada com o aumento do filo *Firmicutes* em razão de *Bacteroidetes* (ISMAIL et al., 2011; TURNBAUGH et al., 2009). Ley e colaboradores (2006) encontraram redução nos níveis de *Bacteroidetes* e um aumento proporcional de *Firmicutes* em animais obesos comparados ao seu grupo controle, e quando perderam peso, a proporção de *Firmicutes* caiu equiparando-se a microbiota de seus controles eutróficos. Em estudo com humanos obesos, Woting e colaboradores (2014) também observaram elevadas quantidades de *Erysipelotrichi*, uma classe de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, bem como elevadas quantidades de *Clostridium ramosum* nas fezes desses indivíduos, sendo essa última associada a sintomas de síndrome metabólica. No entanto, Duncan et al. (2008) não observaram diferenças na proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nas fezes de indivíduos eutróficos e obesos, assim como Schwiertz et al., 2010 não encontraram mudanças na razão de *Firmicutes/Bacteroidetes* em indivíduos com sobrepeso ou obesos.

Para essas diferenças observadas, é possível que as interações entre os fatores genéticos e fatores ambientais possam exercer grande influência na composição da microbiota intestinal (SAAD; SANTOS; PRADA et al., 2016). Segundo Backhed et

al. (2004), mudanças na ecologia microbiana induzidas por dietas ocidentais e, ou diferenças na ecologia microbiana entre os indivíduos que vivem nessas sociedades podem funcionar como um fator "ambiental" que afeta a predisposição para o armazenamento de energia e, portanto, a obesidade.

As bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* correspondem às bactérias Gram positivas, enquanto o filo *Bacteroidetes* é representado por bactérias Gram negativas. Diante disso, parece haver um paradoxo ainda não esclarecido na literatura, visto que bactérias Gram negativas contém lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa, e esses, são um potente ativador do receptor tipo Toll 4 (TLR4), expresso na maioria das células e macrófagos, que reconhece a presença de Padrão Molecular Associado a Patógenos (PAMP). A ligação de LPS aos receptores TLR4 está associado a um aumento de inflamação por ativação da via de sinalização NF- κ B e produção de citocinas inflamatórias (MEDZHITOV; HORNG, 2009)

O maior influxo de LPS está relacionada a aumento da permeabilidade intestinal, que ocorre devido à redução da expressão de proteínas de ligação do intestino, tais como a zonula occludens-1 (ZO-1), claudina e ocludina, responsáveis por criar uma barreira epitelial intestinal que impede que a população bacteriana e que, os produtos do lúmen intestinal atinjam a circulação (SAAD; SANTOS; PRADA et al., 2016). Portanto, a desagregação dessas proteínas promove a translocação de LPS para a circulação desencadeando inflamação, resistência à insulina e também acúmulo de gordura (PRADA et al., 2005). Além disso, o aumento de LPS circulante, ao desencadear a via de sinalização por TLR4, leva a uma expressão aumentada de óxido nítrico sintase indutível (iNOS), e esse por sua vez, está associado à indução do estresse do retículo endoplasmático por induzir S-nitrosação / S-nitrosilação a partir do óxido nítrico (STAMLER et al., 1997) (Figura 1).

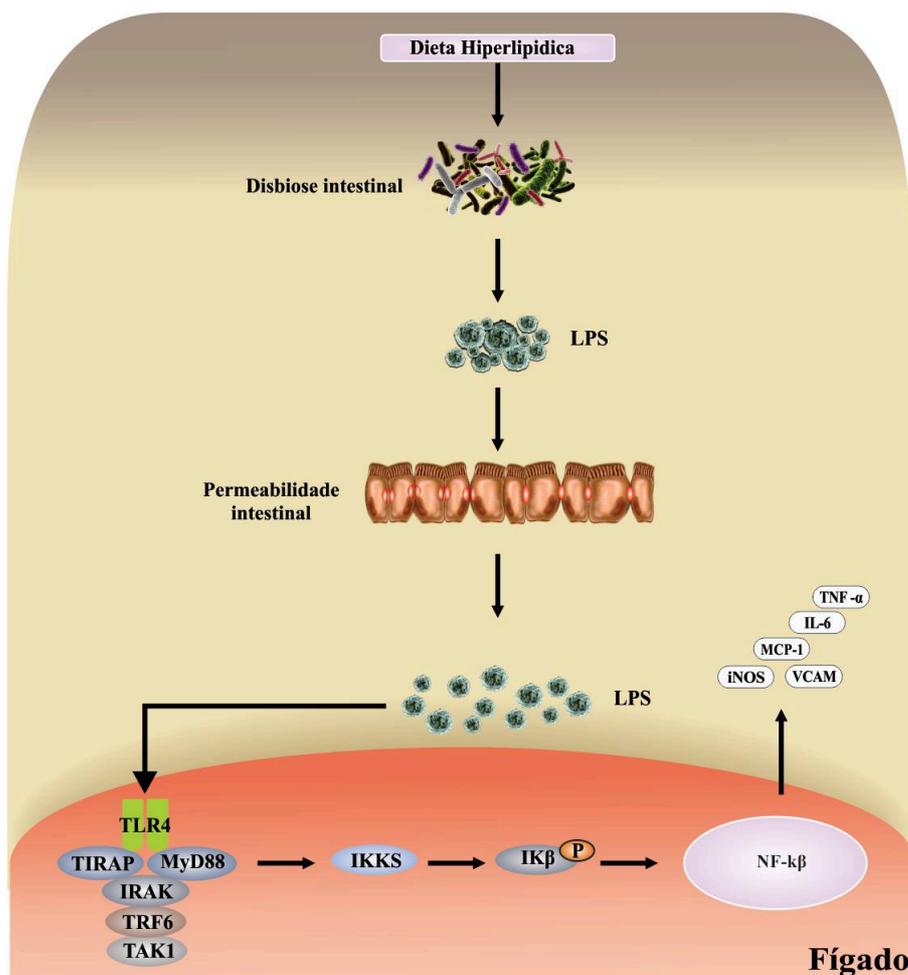


Figura 1. Interação entre dieta hiperlipídica, microbiota intestinal e hospedeiro na promoção de desordens metabólicas.

Os AGCC, produzidos pela fermentação microbiana de polissacarídeos, são importantes para manter a integridade da barreira do epitélio intestinal, e impedir a translocação de LPS, desde que o butirato, um dos principais AGCC produzidos pelos microrganismos do intestino, estimula a produção de muco e a expressão das proteínas de ligação do intestino, como ZO-1 e ocludina. Os AGCC também apresentam efeitos anti-inflamatórios, em parte, por inibir a ativação de NF- κ B nas células imunitárias do hospedeiro por se ligar aos receptores 43 e 41 acoplados a proteína G (GPR43 e GPR41), sendo que GPR43, parece ter um papel essencial na modulação de processos inflamatórios associados ao TNF- α (SAAD; SANTOS; PRADA et al., 2016).

A ligação de AGCC as GPR43 e GPR41 também proporcionam regulação do metabolismo de energia, visto que esses receptores são expressos nas células do epitélio intestinal, nas células L enteroendócrinas, as quais secretam hormônios

reguladores da saciedade, como o peptídeo-tirosina-tirosina (PYY) e peptídeo semelhante a glucagon -1 (GLP-1) (TREMAROLI; BACKHED, 2012). Outro mecanismo pelo qual os AGCC regulam o metabolismo de energia, ocorre pela ativação de AMPK, promovendo assim a maior oxidação de ácidos graxos, melhora na resistência à insulina e tolerância a glicose em ratos alimentados com dieta rica em gordura (BACKHED et al., 2007).

O perfil de AGCC colônico depende da natureza da microbiota residente no cólon e seus efeitos na regulação do apetite parecem ser influenciados também pelo tempo de trânsito intestinal. Animais obesos, quando comparados com animais magros, apresentam uma microbiota colônica que é mais eficiente na fermentação de AGCC de uma dada dieta, e portanto, mais eficientes em extrair energia proveniente dos AGCC. Associado a isso, ocorre maior expressão do transportador de glicose 1 (GLUT-1) nas células intestinais, que facilita maior absorção de monossacarídeos e a transferência desses para a circulação portal. Maior fluxo de monossacarídeos favorece a lipogênese *de novo* no fígado e no tecido adiposo devido a maior expressão gênica de acetil coenzima-A carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS), enzimas lipogênicas mediadas pelas proteínas SREBP-1 e ChREBP (proteína de ligação ao elemento regulador de carboidratos) que promovem o acúmulo de TAG no tecido hepático e no tecido adiposo (MACHADO et al., 2015).

Outro mecanismo da microbiota intestinal associado ao metabolismo de energia do hospedeiro, foi demonstrado em estudo realizado por Backhed et al. (2004). Os autores desse estudo observaram que a colonização de ratos *germ free* com a microbiota proveniente de animais convencionais demonstrou suprimir o Fator de Adiposidade Induzido pelo Jejum (*Fasting Induced Adipose Factor- FIAF*). A supressão do FIAF aumenta a atividade da lipoproteína lipase (LPL), promovendo a uma maior absorção celular de ácidos graxos e o acúmulo de TAG nos adipócitos.

A dieta ocidental caracterizada pelo alto conteúdo de gordura e açúcares, associado ao baixo conteúdo de fibras alimentares é considerada um dos principais fatores que contribuem para a disbiose intestinal, afetando as proporções e os tipos de metabólitos produzidos. Diante da grande interferência no metabolismo do hospedeiro, estratégias para restaurar a microbiota intestinal, bem como os sintomas associados às desordens do metabolismo, incluem uma dieta rica em fibras e compostos bioativos devido à sua capacidade antimicrobiana e antioxidante. Desse modo, fontes alimentares desses componentes têm sido investigadas, incluindo o

sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

3. 4. Sorgo: aspectos gerais

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é um cereal da família *Poaceae*, nativo da África, sendo o quinto cereal mais produzido no mundo, superado apenas por trigo (*Triticuma estivum* L.), milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e cevada (*Secale cereale* L.). Seu cultivo é mais econômico quando comparado a outros cereais, visto que pode ser produzido em áreas e situações ambientais adversas, tais como áreas muito secas e, ou muito quentes (AWIKA; ROONEY, 2004).

O consumo do sorgo está em expansão em todo o mundo. Segundo dados do levantamento sistemático de produção agrícola do IBGE (2016), a produção de sorgo no Brasil, em 2016, foi de 1.168.904 toneladas de grãos, no entanto, esse cultivo visa, principalmente, abastecer a demanda das indústrias de ração animal e como forragem, para alimentação de ruminantes (DYKES; ROONEY, 2006; QUEIROZ et al., 2014). Por outro lado, em países da África e Ásia, o sorgo é muito utilizado como o alimento básico, fornecendo cerca de 70% da ingestão calórica diária para essas populações. Além disso, esses países são responsáveis por mais de 95% do total do sorgo utilizado como alimento humano no mundo (DICKO et al., 2006).

O grão de sorgo é formado por diferentes estruturas anatômicas, entre elas: o pericarpo, que corresponde a camada exterior, testa, uma camada entre o pericarpo e o endosperma; o endosperma e o germe. Em geral, os polissacarídeos não amiláceos, compostos fenólicos (por ex. 3-DXAs, taninos e ácidos fenólicos) e carotenóides encontram-se no pericarpo e testa do grão, enquanto o endosperma corresponde o tecido de armazenamento de amido, proteínas e vitaminas do complexo B; no germe estão os lipídios e algumas vitaminas lipossolúveis (CARDOSO et al., 2015b). Essa distinção anatômica da estrutura dos grãos de sorgo se torna relevante, à medida que essas são responsáveis pela qualidade tecnológica, nutricional e funcional do grão.

Quanto a diversidade na concentração e composição de compostos fenólicos no sorgo, esses variam amplamente em função de fatores ambientais e genéticos. A classificação que explica os níveis variáveis dos constituintes fenólicos principais (antocianinas e taninos) é baseada na coloração. Segundo essa classificação, tem-se o sorgo branco, que não possui taninos ou antocianinas detectáveis e apresenta níveis muito baixos de fenol extraível total; o sorgo vermelho também não possui taninos mas tem um pericarpo vermelho com níveis significativos de fenóis extraíveis; os

sorgos preto apresentam o pericarpo de coloração preta e possuem níveis muito elevados de antocianinas, assim como os sorgos marrom que possuem testa pigmentada, com diferentes graus de pigmentação do pericarpo e contêm níveis significativos de taninos (AWIKA; ROONEY, 2004).

Devido a facilidade e versatilidade na produção do sorgo, além da sua composição nutricional que compreende uma diversidade de compostos bioativos, vem crescendo o interesse por esse grão como alternativa para alimentação humana, e portanto, vem sendo empregado no preparo de diversos produtos alimentícios, incluindo a produção de produtos prontos para consumo. Na África e na Ásia é utilizado para o preparo de alimentos como *bouillie*, *tô*, *injera*, *nasha* e *ogi* (mingaus), na forma de pão fermentado, como o *kisra* (tradicional do Sudão), cervejas (*dolo*, *tchapallo*, *pito*, *burukutu*), tortilhas, dentre outros (ACHI, 2005; DICKO et al., 2006; ABDELGHAFOR et al., 2011). No Japão e Estados Unidos, a farinha de sorgo branco também vem sendo muito utilizada no desenvolvimento de produtos extrusados como *snacks*, cereais matinais e biscoitos em substituição à farinha de trigo (ROONEY, 2001; DLAMINI et al., 2007).

A elaboração de produtos extrusados à base de sorgo é uma opção extremamente viável para o incentivo da utilização do sorgo na alimentação humana. No entanto, alguns estudos demonstram que esse processamento pode alterar o perfil e o conteúdo de compostos fenólicos, visto que, é um procedimento que utiliza combinação de calor, umidade e trabalho mecânico, que modifica as matérias-primas, proporcionando novos formatos e estruturas com diferentes características funcionais e nutricionais (DLAMINI et al., 2007; CARDOSO et al., 2015a; ALAM et al., 2016).

Cardoso et al. (2015a) ao comparar os efeitos do processamento por calor seco em forno convencional e o cozimento por extrusão de alguns cultivares de sorgo (marrom, vermelho e amarelo) demonstraram que, em geral, o efeito do cozimento por extrusão foi mais prejudicial ao conteúdo de 3-DXAs, proantocianidinas (taninos), flavonas e flavanonas, porém sem prejudicar a capacidade antioxidante dos cereais. A maior capacidade antioxidante foi associada à maior retenção de monômeros e dímeros de proantocianidinas após a extrusão, compensando a redução dos outros fenólicos, em especial na variedade de cor marrom (genótipo SC 319). É esperado que essa redução no grau de polimerização das proantocianidinas, aumente a sua biodisponibilidade e portanto, seu papel antioxidante.

Em acordo com esses resultados, estudo recente realizado por Lopez et al. (2016) demonstrou que o farelo de sorgo apresentou maior quantidade de ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico após o processo de extrusão e portanto, maior capacidade antioxidante. Os autores sugerem que elevadas temperaturas utilizadas para a extrusão são suficientes para quebrar a ligação química de lignina e ácido ferúlico que poderia fragmentar a estrutura de arabinosilanos e consequentemente aumentar a liberação de ácidos fenólicos.

3.4.1. Composição química e propriedades funcionais do sorgo

Os polissacarídeos constituem os principais componentes do sorgo, correspondendo a 75% do cereal e, o amido, é o carboidrato mais abundante (32,1 e 72,5 g/100 g). Entre os polissacarídeos não-amiláceos do sorgo encontram-se as fibras insolúveis (75,0 – 90,0%) e fibras solúveis (10,0 – 25,0%). Quanto ao conteúdo de proteínas do sorgo, esse varia de 7 a 15 g/100g e correspondem, principalmente, as prolaminas (79% das proteínas totais), sendo as kafirinas as principais prolaminas do sorgo. O conteúdo e o perfil de aminoácidos desse grão podem variar largamente, em função da característica genética e do local de plantio (QUEIROZ et al., 2011; CARDOSO et al., 2015b).

O sorgo apresenta um conteúdo reduzido de lipídios (1,24 a 3,07 g/100 g), porém, predominam os ácidos graxos insaturados (83 – 88%), destacando-se o ácido graxo linoléico (45,6 – 51,1%), oleico (32,2 – 42,0%), palmítico (12,4 – 16,0%) e linolênico (1,4 – 2,8%). Também, pode ser considerado uma boa fonte de vitaminas lipossolúveis e do complexo B como, tiamina, riboflavina e piridoxina, além de minerais (fósforo, potássio e zinco) que variam de acordo com a área de plantio. Quanto a biodisponibilidade dos minerais do sorgo, estudos ainda precisam ser realizados, porém, sabe-se que a disponibilidade de zinco varia entre 9,7% e 17,1% e a disponibilidade de ferro, entre 6,6% a 15,7% (MARTINO et al., 2012; CARDOSO et al., 2015b).

Quanto a composição de compostos fenólicos, o sorgo possui ácidos fenólicos, taninos, antocianinas e fitatos, além de fibra alimentar, que contribuem para a elevada capacidade antioxidante desse cereal, podendo, portanto, serem úteis para reduzir o risco de doenças crônicas, incluindo a obesidade. As duas grandes categorias de compostos fenólicos presentes no sorgo são de ácidos fenólicos e flavanóides. Os ácidos fenólicos são derivados de ácidos hidroxibenzóico ou

hidroxicinâmico, os quais derivam de ácido benzoico e são, predominantemente, encontrados em plantas auxiliando no combate a pragas e fitopatógenos (AWIKA; ROONEY, 2004; DYKES; ROONEY, 2006). A composição de ácidos fenólicos no sorgo varia de 135,5 a 479,40 µg/g e correspondem, principalmente, aos ácidos protocatecuico e felúrico. No sorgo, assim como em outros cereais, os ácidos fenólicos estão ligados a cadeias de arabinosilanos e lignina, portanto não são digeridos por enzimas digestivas, mas são importantes para a fermentação microbiana (CARDOSO et al., 2015b).

No grupo dos flavanóides, considerados como principais compostos fenólicos, pertencem as antocianinas. No sorgo, são denominadas de 3-DXAS, devido à ausência de uma molécula de oxigênio na posição C-3 de sua estrutura química, o que possibilita uma maior estabilidade a pH elevado, tornando-as, portanto, mais vantajosas comercialmente em comparação com as encontradas em frutas e vegetais (AWIKA; ROONEY, 2004). As principais 3-DXAs encontradas no sorgo estão na forma não-metoxilada (luteolinidinas e apigenidinas). No entanto, também são encontrados, em pequenas quantidades, os derivados metoxilados que são 5-metoxiapigenidina, 7-metoxiapigeninidina, 5,7-dimetoxiapigeninidina, 7-metoxiluteolinidina e 5,7-dimetoxiluteolinidina. O conteúdo de 3-DXAS no sorgo correlaciona-se com sua cor e atividade antioxidante, sendo que os genótipos com pericarpo e testa de coloração preta tem 3 a 4 vezes mais 3-DXAs (5,4 – 6,1 mg/g) do que os genótipos vermelho e marrom (1,6 – 2,8 mg/g) (AWIKA; ROONEY, 2004; CARDOSO et al., 2015b).

Em relação ao seu potencial funcional, estudos demonstram que, além do seu papel antioxidante, as antocianinas também exercem importantes efeitos anti-inflamatórios. Em estudo de Bralley et al. (2008), o consumo de genótipos de sorgo rico em antocianinas e outros polifenóis promoveu inibição da enzima hialuronidase, cuja atividade aumenta em condições de inflamação. Já foi demonstrado que muitos dos mediadores relacionados com a ativação da via de sinalização do NF-κB encontram-se em menores concentrações no plasma de adultos saudáveis após suplementação com antocianinas, quando comparados com grupos controles. As antocianinas podem atuar, em parte, inibindo a fosforilação do IκBα, e conseqüentemente a ativação de NF-κB e portanto, reduzir a expressão de mediadores chave do processo inflamatório, tais como a IL-6, IL-8, MCP-1,

ciclooxigenase-2 (COX-2), entre outros (RAHMAN et al., 2006; KARLSEN et al., 2007; DOMITROVIC, 2011).

Os flavonóides, também incluem taninos, que juntamente com as antocianinas são considerados os mais importantes constituintes isolados do sorgo até o momento. Os taninos encontrados nesse cereal são do tipo condensado, conhecidos como proantocianidinas e possuem alta massa molecular (DYKES; ROONEY, 2006). A concentração de taninos das cultivares de sorgo, apresentam ampla variedade devido suas características genéticas. Os genótipos de sorgo que possuem grãos com a testa pigmentada apresentam maiores conteúdos de taninos, bem como maiores concentrações de fenólicos totais e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante (DLAMINI et al., 2007; CARDOSO et al., 2015b).

Os taninos condensados presentes no sorgo podem auxiliar na redução do índice glicêmico, pois interagem fortemente com a amilose e α -amilase propiciando a formação de amido resistente. Também se ligam a moléculas protéicas e quelam minerais, que dificultam a ação de enzimas digestivas, e conseqüentemente diminuem a taxa de digestão de proteínas, reduzindo o valor calórico e nutricional dos alimentos, o que pode ser benéfico para o controle da obesidade e do DM2 em humanos (DYKES; ROONEY, 2006; QUEIROZ et al., 2011).

Estudo de Park e colaboradores (2012) demonstrou que a administração de 0,5% e 1% de extrato de sorgo rico em taninos em uma dieta hiperlipídica para ratos, aumentou a expressão de PPAR- γ , assim como os níveis de adiponectina, e esses por sua vez foram responsáveis pela redução dos níveis de colesterol total, da lipoproteína de baixa densidade (LDL), TAG, glicose, níveis séricos de insulina e também de citocinas inflamatórias, como o TNF- α .

Burdette et al. (2010), também demonstraram que o extrato de sorgo rico em taninos e outros fitoquímicos melhorou a inflamação, por reduzir a formação de edema em ratos por meio da regulação negativa da expressão da COX-2, resultando em menor permeabilidade vascular e edema com infiltração de neutrófilos. O mesmo foi observado por Shim e colaboradores (2013) após a administração de um genótipo de sorgo (sorgo gelatinoso dourado) rico em fotoquímicos e antioxidantes na redução de mediadores inflamatórios como óxido nítrico sintase indutível e COX-2 em um estudo *in vivo*.

3.4.2. Potencial do sorgo na modulação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem por definição o desequilíbrio entre o sistema oxidativo e os mecanismo antioxidantes, ou seja, entre a produção e eliminação de radicais livres. Os oxidantes podem ser agrupados em espécies reativas de oxigênio (ERO's) e espécies reativas de nitrogênio (ERN's) e ambos podem ser produzidos naturalmente pelo metabolismo celular, possuindo um papel importante no processo de sinalização da célula, especialmente no sistema imunológico. No entanto, em excesso, esses radicais livres tornam-se lesivos promovendo a oxidação de biomoléculas com a consequente perda de função biológica (BECKMAN; AMES, 1998) e portanto, a cronicidade de espécies reativas em excesso está associada ao desenvolvimento de DCNT, como por exemplo, a obesidade, o diabetes, o câncer e outras.

Para a eliminação de radicais livres e a propagação dos danos por eles causados, o organismo utiliza dois sistemas de defesa, o antioxidante endógeno e o antioxidante exógeno. Os sistemas endógenos de defesa constituem as enzimas antioxidantes, e essas são classificadas como sistema de defesa primário, correspondendo o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular que compete com a produção de radicais livres e favorecem a recuperação e reconstituição de estruturas biológicas lesadas. São caracterizados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase e glutathione s-transferase (GST). Em reações enzimáticas, a SOD converte ânions superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e estes podem ser rapidamente degradados por catalase, GPx e GST a H_2O (BONNEFOY; DRAI; KOSTKA, 2002).

Em conjunto com as enzimas antioxidantes, citadas acima, há um mecanismo de defesa secundário que auxilia na atenuação de processos oxidativos e é representado pelas proteínas de estresse (*heat shock proteins* – HSP). As HSP são sintetizadas em situações de estresse por indução de fatores fisiológicos (divisão celular, fatores de crescimento, diferenciação celular, desenvolvimento do tecido e estimulação hormonal), fatores ambientais (metais pesados, inibidores metabólicos, etanol, antibióticos) e fatores patológicos (infecções virais, bactérias e parasitais, febre, inflamação, isquemia e radiação), em todos os seres vivos. As HSP's funcionam como chaperonas celulares e atuam no reparo ou degradação de proteínas

que, por algum motivo, estejam prejudicadas. Dentre as HSP's, as mais estudadas são as quatro isoformas da família HSP 70: Hsp 72 e 73; Grp (*Glucose regulated proteins*) 75 e 78, sendo a HSP 72 a única isoforma expressa exclusivamente por indução do estresse enquanto as demais, também podem ser expressas constitutivamente (KIANG; TSOKOS, 1998).

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático (exógeno) inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem alimentar, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e o β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, além de carotenóides como o licopeno, luteína e zeaxantina (sem atividade pró-vitamina A), são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Entre os minerais destacam-se o zinco, o cobre, o selênio e o manganês, que além de sua atividade direta como antioxidantes, também funcionam como co-fatores da atividade de enzimas do sistema de defesa endógeno (VALKO et al., 2006). A SOD, por exemplo, pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, onde é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como co-fator (SOD-Mn). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (BARBOSA et al., 2010).

Os compostos químicos provenientes de várias espécies de plantas também têm sido amplamente reportadas por seus diferentes efeitos medicinais cientificamente comprovados, incluindo seu potencial efeito antioxidante. Os compostos fenólicos ajudam a manter a integridade da parede celular e o DNA por reduzir e neutralizar ERO's, como hidroxila (OH⁻), superóxido (O²⁻-), óxido nítrico (NO), peroxil (RO²⁻-) e peroxil lipídico (LOO⁻) (WINTOLA; AFOLAYAN, 2015). Sugere-se que os compostos fenólicos apresentam esse efeito antioxidante devido à sua capacidade de modular a expressão de enzimas de fase II, principalmente NADH:quinona oxiredutase (NQO). A enzima NQO converte continuamente espécies eletrofílicas altamente reativas em metabólitos não tóxicos e excretáveis (YANG; BROWNING; AWIKA, 2009; CARDOSO et al., 2015b).

As antocianinas, compostos fenólicos da classe dos flavanóides, além de possuir atividade direta de eliminação de radicais livres por meio da sua capacidade de doação de hidrogênio, também podem atuar indiretamente na melhora das defesas antioxidantes endógenas por restaurar ou aumentar as atividades de enzimas

antioxidantes (SOD e GPx, por exemplo) (TOUFEKTSIAN; LORGERIL; NAGY, 2008) como também, atuar diretamente sobre os genes de codificação para essas enzimas (SHIH; YEH; YEN, 2005). Os ácidos fenólicos e proantocianinas também exibem alta atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, que podem contribuir para o tratamento de várias doenças como a inflamação, o estresse oxidativo, a disfunção hepática, as infecções microbianas, o câncer e as doenças cardiovasculares (KAMATH et al., 2004; FLOEGEL et al., 2010).

Nesse contexto, uma dieta rica em sorgo pode prevenir doenças as quais estão relacionadas com a produção de radicais livres, em função da alta concentração de polifenóis, taninos, antocianinas e capacidade antioxidante desse cereal (KAMATH et al., 2004; CARDOSO et al., 2015b). Os genótipos de sorgo com pericarpo e testa pigmentada preto e marrom, em virtude da maior concentração de polifenóis, apresentam melhores efeitos na indução da atividade de NQO (YANG; BROWNING; AWIKA, 2009). Os compostos bioativos do sorgo apresentam elevada atividade antioxidante *in vitro* e podem contribuir significativamente com benefícios à saúde, quando associados ao consumo do grão integral (KAMATH et al., 2004). Foi demonstrado uma correlação entre a atividade antioxidante de cultivares de sorgo com a presença de fenólicos totais e, também, de taninos, ou seja, cultivares que possuíam taninos apresentaram maior atividade antioxidante (DLAMINI et al., 2007). Esta atividade dos taninos deve-se a proximidade de muitos anéis aromáticos e grupos hidroxilas que impedem que estes fenólicos atuem como pró-oxidantes (AWIKA; ROONEY, 2004).

Os estudos *in vivo* que avaliaram os benefícios relacionados ao consumo de alimentos com sorgo sobre o estresse oxidativo ainda são escassos, no entanto, um estudo realizado em ratos *Wistar* demonstrou que uma dieta contendo farinha de sorgo reduziu o estresse oxidativo e os marcadores de inflamação (MORAES et al., 2012). Em estudo realizado com humanos, Khan e colaboradores (2015) observaram aumento dos níveis de polifenóis no plasma, capacidade antioxidante total, atividade de enzima antioxidante endógena (SOD) e redução dos níveis de proteínas carboniladas em indivíduos que consumiram macarrão contendo farinha de sorgo vermelho quando comparados a um grupo controle.

3.4.3. Potencial do sorgo na modulação da microbiota intestinal

Os compostos bioativos e seus benefícios funcionais estão associados à sua atuação direta por meio da absorção (e de seus metabólitos) e indireta mediada por compostos não absorvidos que modificam a microbiota colônica e, conseqüentemente, todo o metabolismo (SHARMA et al., 2007; FLOEGEL et al., 2010; FREJNAGEL, S.; JUSKIEWICZ, J., 2011). No entanto, os mecanismos pelos quais, os compostos bioativos atuam para modificar a microbiota intestinal ainda não foram elucidados (CARDOSO et al., 2015b).

Estudo *in vitro* e *in vivo* demonstram que os taninos e outros compostos bioativos podem afetar a sobrevivência de grupos de bactérias que tipicamente residem no trato gastrointestinal, promovendo o crescimento de bactérias benéficas à saúde do hospedeiro (tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp.), enquanto elimina ou inibe o crescimento de bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* no intestino (SMITH; MACKIE, 2004; CUEVA et al., 2012).

Smith e Mackie (2004) ao testarem o efeito de taninos condensados *in vivo* relataram inibição de bactérias Gram-positivas pertencentes, por exemplo, ao filo *Firmicutes*, enquanto outras bactérias entéricas tais como *Bacteroides fragilis* e grupos *Bacteroides – Prevotella - Porphyromonas* aumentaram significativamente.

Até o momento, poucos estudos avaliaram a relação de nutrientes do sorgo com alterações na composição da microbiota intestinal (MARTINEZ et al., 2009; TURNER et al., 2010; RITCHIE et al., 2015). Os efeitos do sorgo, incluindo genótipos ricos em taninos e 3-DXAs, na diversidade intestinal, ainda precisam ser melhor explorados. Baseado nesta composição, pode-se inferir que este cereal pode representar uma potencial estratégia nutricional para restabelecer a homeostase intestinal e metabólica de indivíduos obesos.

Turner et al. (2010), demonstraram que genótipos de sorgo preto e marrom na forma de farelo contendo altas concentrações de 3-DXA, de taninos condensados e, ou uma combinação destes compostos aumentaram as concentrações de AGCC fecal e melhoraram a composição da microbiota intestinal, promovendo maior diversidade e redução da disbiose causada por *Firmicutes/Bacteroidetes*. Em estudo com ratos alimentados com farelo de sorgo rico em taninos também foram observadas maior

proporção de *Bacteroides* e *Bacteriodales* comparados aos animais que receberam celulose (RITCHIE et al., 2015).

A fração de lipídios do sorgo também pode afetar a composição da microbiota intestinal e portanto, ter efeitos no metabolismo do hospedeiro. Martinez et al. (2009) demonstraram que a fração lipídica de extratos de sorgo na alimentação de hamsters promoveu aumento nas concentrações de *Bifidobacteria spp.* e redução da família *Coriobacteriaceae*. A proporção de *Bifidobacteria spp.* associou-se positivamente com os níveis plasmáticos de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade; HDL-c), enquanto *Coriobacteriaceae* apresentou associação positiva com ambos, colesterol total e não HDL-c, sugerindo que esta família pode ter um impacto negativo sobre a homeostase do colesterol e no metabolismo de lipídios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Apresentação

O presente estudo foi desenvolvido como continuação de um projeto inicial intitulado “Potencial do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) na modulação do estresse oxidativo, inflamação e adiposidade em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica”, que teve como objetivos avaliar o efeito da farinha de sorgo extrusado na modulação dos marcadores biométricos e bioquímicos, sobre a concentração de citocinas pro e anti-inflamatórias no plasma e a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios no tecido adiposo epididimal, bem como a histomorfometria deste tecido.

4.2. Locais de execução

As etapas deste estudo foram realizadas nos seguintes Laboratórios/Instituições: desenvolvimento e cultivo dos genótipos de sorgo: Embrapa Milho e Sorgo; processamento do sorgo: Laboratório de Análise Sensorial e Processamento de Novos Produtos (DNS/UFV) e Laboratório de Cereais (EMBRAPA Agroindústria de Alimentos); preparo das dietas testes e desenvolvimento do ensaio biológico: Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV); demais análises: Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV); Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários (DBB/UFV); Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios (DMB/UFV); Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (BIOAGRO/UFV); Laboratório de Metabolismo e Fermentação (DBB/UFV); Laboratório de Biologia de Peixes (DVT/UFV); Laboratório de Sistemática Molecular de Vertebrados (DBA/UFV).

4.3. Matéria-prima:

O genótipo de sorgo selecionado foi o SC 319, de pericarpo marrom, com elevado conteúdo de fibra alimentar e compostos bioativos como, proantocianinas (taninos) e 3- deoxiantocianinas (CARDOSO et al., 2015a). O genótipo de sorgo SC 319 foi cultivado no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo localizada em Nova Porteirinha, MG, em uma latitude de 15°47'S, longitude 43°18'O e 516 m acima do nível do mar, em junho de 2011. Após a colheita, os grãos foram trilhados e armazenados em câmara fria ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) na sede da Embrapa Milho e Sorgo (Sete

Lagoas, MG). Posteriormente, os grãos foram encaminhados para o Laboratório de Cereais (EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ) e submetidos à extrusão, segundo procedimento descrito por Vargas-Solórzano et al. (2014). Os grãos extrusados foram moídos em farinha e, em seguida, embalados em sacos de polietileno e armazenados a $-20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os dados de composição química da farinha de sorgo extrusado (FSE), incluindo carboidratos, proteínas, lipídios, fibra alimentar e compostos bioativos, foram determinados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARDOSO et al., 2015) e esses dados foram utilizados para a elaboração das dietas experimentais.

4.4. Animais e dietas experimentais

Ratos machos *Wistar (Rattus norvegicus)* adultos (60 dias de idade; $n = 32$), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram alocados em gaiolas individuais de aço inoxidável e mantidos a uma temperatura controlada de $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso à água *ad libitum*.

Inicialmente, os grupos de animais receberam as seguintes dietas: dieta hiperlipídica (HFD) ($n = 24$) como controle obeso, baseada na composição da dieta comercial D12079B (Research Diets®) para indução da obesidade e dieta AIN-93M (REEVES et al., 1993) ($n = 8$) como controle eutrófico, durante 49 dias, correspondendo a fase I do estudo. Ao final desse período, foram realizadas as medidas biométricas, testes de glicemia de jejum e triacilgliceróis para identificar a incidência de riscos metabólicos e verificar a indução da obesidade nos animais que receberam HFD (dados não apresentados). Na fase II, confirmada a indução da obesidade, os animais do grupo HFD foram redistribuídos em três grupos segundo o peso corpóreo ($303,8\text{ g} \pm 1,4$; $n = 8$ / grupo) e o grupo AIN-93M foi mantido. As farinhas de grãos de sorgo do genótipo SC 319 extrusados foram adicionadas às dietas de dois desses grupos em quantidades suficientes para fornecer 50% (HFDS 50) e 100% (HFDS 100) da fibra alimentar recomendada (5g), que substituiu 100% de amido de milho das dietas, durante 56 dias. Os demais ingredientes da dieta (caseína, maltodextrina, sacarose e óleo de soja) foram ajustados para fornecer dietas hiperlipídicas isocalóricas com ou sem adição de FSE. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente durante todo o experimento (Tabela 1) (Figura 2).

Ao final da fase II de experimentação, os 32 animais foram anestesiados com isoflurano 100% (Isoforine, Cristália®) e eutanaziados por punção cardíaca após jejum por 12 horas. O sangue foi estocado em tubos com heparina e sem anticoagulante, 16×100 mm (BD Vacutainer®) e centrifugados sob refrigeração por 10 minutos a $1006 \times g$, para obtenção de plasma e do soro, respectivamente. Os órgãos coração, cérebro, ceco e fígado dos animais foram retirados, pesados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80° C. Algumas amostras do tecido hepático foram lavadas em solução salina, fixadas em formaldeído a 10% e mantidas à temperatura ambiente para posterior análise histológica. As fezes excretadas pelos animais, no dia anterior à eutanásia, foram imediatamente coletadas e armazenadas a -80° C para extração do DNA fecal e análises microbiológicas por método de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR) e também, para quantificação de AGCC.

Os animais desse estudo foram mantidos e tratados de acordo com o protocolo (Nº 06/2014; data de aprovação: 25 de Fevereiro/ 2015) aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (Anexo).

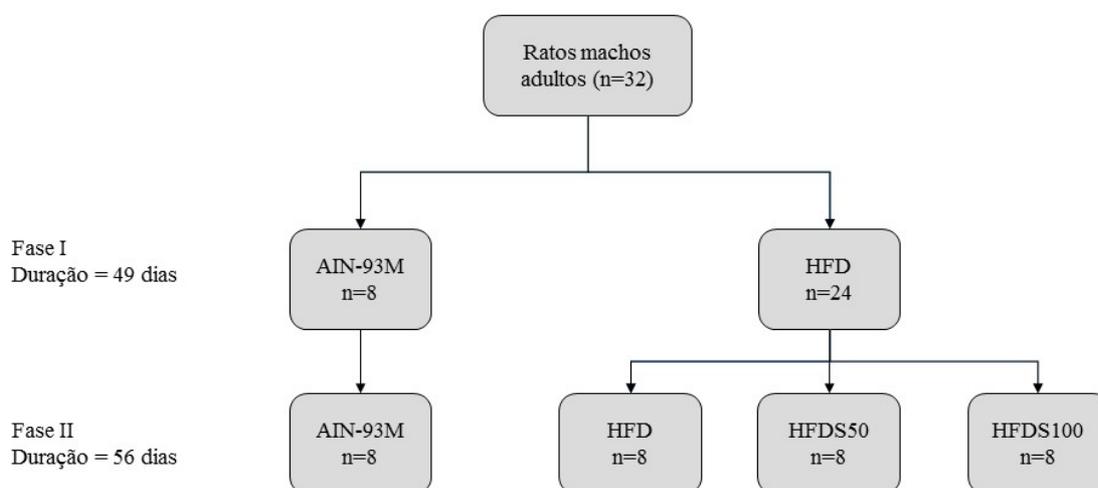


Figura 2. Desenho Experimental

AIN-93M: dieta padrão para roedores; HFD: dieta hiperlipídica; HFDS50: dieta hiperlipídica com substituição em 50% de celulose e 100% do amido de milho por farinha de sorgo extrusado; HFDS100: dieta hiperlipídica com substituição em 100% de celulose e amido de milho por farinha de sorgo extrusado;

Tabela 1: Composição das dietas experimentais (g·100g⁻¹).

Ingredientes	AIN-93M^A	HFD^B	HFDS50^C	HFDS100^D
Caseína	14	19,50	17,67	15,84
Maltodextrina	15,50	10	3,10	0
Amido de milho	46,57	5,32	0	0
Sacarose	10	34,10	34,10	25,04
Óleo de soja	4	1	0,66	0,32
Banha de porco	0	20	20	20
Celulose	5	5	2,5	0
Mix vitamínico	1	1	1	1
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Colesterol	0	0,15	0,15	0,15
BHT	0,0008	0,0004	0,0004	0,0004
Farinha de sorgo extrusado	nd	nd	16,86	33,72
3- DXAS total (µg)	nd	nd	16,92	33,85
Luteolinidina (µg)	nd	nd	4,45	8,90
Apigeninidina (µg)	nd	nd	2,39	4,78
5-Metoxi-luteolinidina (µg)	nd	nd	6,82	13,65
7-Metoxi-apigeninidina (µg)	nd	nd	3,27	6,54
Proantocianidinas totais (mg EC)*	nd	nd	8,20	16,41
Compostos Fenólicos totais (mg AG)**	nd	nd	0,08	0,16
Calorias (kcal):				
Carboidrato (%)	72,58	42,42	41,09	39,82
Proteína (%)	17,96	16,74	17,12	17,58
Lipídio (%)	9,47	40,85	41,79	42,61
Densidade calórica (kcal/g)	3,80	4,66	4,56	4,44

^A: dieta padrão para roedores; ^B: dieta hiperlipídica; ^C: dieta hiperlipídica com substituição em 50% de celulose e 100% do amido de milho por farinha de sorgo extrusado; ^D: dieta hiperlipídica com substituição em 100% de celulose e amido de milho por farinha de sorgo extrusado; *: equivalente de catequina; **: equivalente de ácido gálico.

nd: Não determinado; BHT: hidroxitolueno butilado

4.5. Dados biométricos

Ao final do experimento foram obtidas medidas biométricas e dados do consumo alimentar. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento do animal. Os animais foram considerados obesos quando os valores de IMC foram superiores que 0,68 (REYNÉS et al., 2014). O índice somático de órgãos como fígado, ceco, coração e cérebro foi calculado pela relação entre o peso do órgão e o peso corporal total, multiplicado por 100. O

coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação entre o ganho de peso médio e a quantidade média de dieta (gramas) consumida por grupos.

4.6. Expressão gênica no tecido hepático

O tecido hepático (100 mg) foi triturado por moagem, utilizando gral e pistilo, sob nitrogênio líquido mantendo em baixa temperatura. Foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o homogeneizado transferido para um microtubo de 1,5 mL deixando em temperatura ambiente sob agitação por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 200 μ L de clorofórmio e agitado vigorosamente. Após centrifugação a $12\ 000 \times g$ por 15 minutos a 4°C , o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 500 μ L de isopropanol e, em seguida, agitado por inversão. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e após uma nova centrifugação a $12\ 000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi removido por inversão, permanecendo no microtubo apenas o pellet de mRNA. Sobre o pellet, foi adicionado 1 mL de etanol 75% e em seguida, centrifugado a $7\ 500 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Posteriormente, o sobrenadante foi removido por inversão, e o pellet deixado à temperatura ambiente por, aproximadamente, 2 horas para secar. Após a secagem, o pellet foi ressuspense em 50 μ L de água DPEC (água miliq tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (Invitrogen Brasil Ltda) autoclavada a $121^\circ\text{C}/30\text{ min}$) e em seguida, armazenado a -80°C .

O mRNA foi quantificado em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) e o grau de pureza determinado pela razão de absorbância 260/280 nm. Após a quantificação, as amostras de mRNA foram tratadas com DNase (DNase I Amplil; Promega), utilizando-se o protocolo do fabricante: 7 μ L da amostra (contendo 2 μ g de RNA) foram transferidos para um tubo novo e tratadas com 1 μ L de tampão DNase (*Buffer – RQ1 DNase*) mais 2 μ L de DNase (Invitrogen) para um volume final de 10 μ L. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e a reação interrompida por meio da adição de 1 μ L de *RQ1 DNase Stop Solution* e incubados a 65°C por 10 minutos, para inativação da DNase.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do mRNA tratado utilizando-se um Kit de transcrição reversa M-MLV (Invitrogen Brasil Ltda.). Foram adicionados 2 μ L de um MIX 1 (1 μ L de oligo dT 100 μ M + 1 μ L de dNTPs 10 μ M diluídos) em cada amostra com RNA tratado com DNase e em seguida, incubadas

por 5 min a 65° C. Colocou-se a mistura no gelo e foram acrescentados 7 µL de um MIX 2 (4 µL tampão 5x FF, 2µL de DTT 0,1M e 1 µL de RNase Out). Foram acrescentadas em cada reação 1 µL de MMLV transcriptase reverse (200 U/µL) e a mistura foi incubada em banho-maria a 37° C / 1 hora. Em seguida colocou-se o cDNA a 70° C por 10 minutos.

A expressão dos níveis de mRNA foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), sendo a reação constituída por 2 µL de cDNA (1:10), 5 µL de FastStart Master SYBR Green da Applied Biosystems (Foster City, CA) e oligonucleotídeos a uma concentração final de 100 nM, em um volume de reação final de 10 µL. A quantificação foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green e Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições da PCR foram as seguintes: 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos, seguidos da curva padrão de dissociação. Foram utilizadas sequências de oligonucleotídeos (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) senso e anti-senso envolvidos no processo de oxidação de ácidos graxos: carnitina palmitoil transferase (CPT-1), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- α) e receptor de adiponectina 2 (ADIPOR2); lipogênese hepática: proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP-1c); inflamação: fator nuclear kappa B (NF- κ B); e estresse oxidativo: proteína de choque térmico HSP72 e superóxido dismutase (SOD). A expressão relativa dos níveis de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) para ratos.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR

Gene	Senso (5'-3')	Antisenso (5'-3')
NF-κB	CTG CGC GCT GAC GGC	TCG TCG TCT GCC ATG TTG AA
ADIPO R2	CAT GTT TGC CAC CCC TCA GTA	ATG CAA GGT AGG GAT GAT TCC A
SREBP-1c	CGC TAC CGT TCC TCT ATC AAT GAC	AGT TTC TGG TTG CTG TGC TGT AAG
CPT1	GTA AGG CCA CTG ATG AAG GAA GA	ATT TGG GTC CGA GGT TGA CA
PPAR-α	CCT GGC TTC CCT GTG AAC T	ATC TGC TTC AAG TGG GGA GA
HSP72	AGG CCA ACA AGA TCA CCA TC	TAG GAC TCG AGC GCA TTC TT
ZnSOD	GAG CAG AAG GCA AGC GGT GAA	CCA CAT TGC CCA GGT CTC
GAPDH	AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC	CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC

Todos os oligonucleotídeos foram desenhados no programa Primer 3 Plus e obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

4.7. Extração nuclear e citoplasmática de células hepáticas

Preparou-se o homogeneizado de fígado utilizando o *Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 20 mg de tecido hepático foram cortados em pedaços pequenos, colocados em microtubo de 1,5 mL e lavados com PBS (0,1 M; pH 7,2). Em seguida, foram centrifugados a $500 \times g$ por 5 minutos e ao final foram removidos os sobrenadantes. Com o auxílio de um pistilo para microtubo e a adição de 200 μL de Reagente de Extração citoplasmática I (CER I) os tecidos foram homogeneizados, agitados vigorosamente em vortex por 15 segundos para completa suspensão do pellet de células e incubados em gelo por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada microtubo, 11 μL de Reagente de Extração citoplasmática II (CER II), agitados em vortex por 5 segundos e incubados em gelo por 1 minuto. Após a incubação em banho de gelo, os microtubos foram agitados vigorosamente em vortex por 5 segundos e centrifugados a $16\ 000 \times g$ por 5 minutos.

Os sobrenadantes (extratos citoplasmáticos) foram imediatamente transferidos para microtubos limpos previamente refrigerados e estocados a -80°C . Em relação as frações insolúveis contendo os núcleos, esses foram ressuspensos em 100 μL de Reagente de Extração Nuclear (NER) gelado, agitados vigorosamente em vortex por 15 segundos a cada 10 minutos, por um total de 40 minutos. Em seguida, foram centrifugados a $16\ 000 \times g$ por mais 10 minutos e os sobrenadantes (extrato nuclear) foram imediatamente transferidos para novos microtubos e armazenados a -80°C .

4.8. Quantificação de PPAR- α em tecido hepático

O receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR- α) foi avaliado com enzima ligada a ensaio imunoabsorvente (ELISA) utilizando o *kit Rat PPAR- α Elisa Kit* (kit Cat # E-EL-R0725-ra; Elabscience, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados para a análise, 100 μL de extrato nuclear do homogeneizado de tecido hepático contendo 60 μg de proteína. Inicialmente determinou-se sete poços da placa para cada diluição do reagente padrão e um poço para o branco e foram adicionados 100 μL de cada diluição do padrão, branco e amostras nos poços determinados; a placa foi selada e incubada a

37° C por duas horas e em seguida, o líquido de todos os poços foi removido sem lavagem.

Foram adicionados 100 µL do reagente de detecção A em cada poço da placa, selada e novamente, incubada a 37° C por uma hora. Após o período de incubação, as soluções de cada poço foram aspiradas e os poços lavados com 350 µL de solução de lavagem 1x e deixados descansar por 1 a 2 minutos. Todo o líquido foi retirado dos poços por inversão em papel absorvente e em seguida, lavados por 3 vezes. Após a última lavagem, todo o tampão de lavagem remanescente foi removido por aspiração e a placa invertida em papel absorvente. Após essa etapa, foram adicionados 100 µL de reagente de detecção B em cada poço da placa, a mesma foi selada e incubada a uma temperatura de 37° C por meia hora. Os processos de aspiração e lavagem, citados anteriormente, foram repetidos por um total de cinco vezes. Em seguida, foram adicionados 90 µL de solução de substrato em cada poço e após a selagem da placa, a mesma foi incubada a 37° C por 15-25 minutos protegida da luz. Ao final da incubação, o líquido adquiriu coloração azul por conta da adição da solução de substrato.

Por fim, foram adicionados 50 µL de solução de bloqueio em cada poço, e o líquido retornou a coloração amarelada após homogeneização suave realizada manualmente. A leitura foi realizada imediatamente a 450 nm e o cálculo dos resultados foi realizado por meio de curva padrão, cujas concentrações variaram de 20 ng / ml a 0,312ng / mL.

4.9. Histomorfometria do fígado

Os fragmentos de tecidos fixados em formaldeído a 10% foram lavados com álcool a 70% por 2 dias consecutivos. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 95% por quatro horas, imersos em solução de álcool-resina na proporção de 1:1 durante 24 horas e, posteriormente, colocados em resina de infiltração glicolmetacrilato (Leica, Historesin[®]) por mais 48 horas. Os tecidos foram incluídos em resina pura. Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Reichert-Jung[®]) utilizando-se navalha de vidro, e submetidos à coloração pela técnica Hematoxilina/Eosina. As lâminas (BioGlass[®]) foram montadas e analisadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry[®], Japão) e as imagens capturadas com câmera digital DIGI-PRO 5.0 M por meio de Software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope[®]). Dez campos

diferentes por animal foram capturados com objetiva de 40X (Barra: 20 μM) e foi aplicada sobre as fotos uma gradícula com 40.000 μM^2 contendo 441 pontos. Os pontos sobre vesículas de gordura, núcleos e citoplasmas foram contados com o auxílio do aplicativo Image J versão 1.5 (Wayne Rasband). O grau de esteatose foi avaliado semiquantitativamente de acordo com uma escala de 5 graus: grau 0, se o percentual de gordura fosse ausente ou <5%; Grau 1, se $\geq 5\%$ e <25%; Grau 2, se $\geq 25\%$ e <50%; Grau 3, se $\geq 50\%$ e <75%; e grau 4, se $\geq 75\%$ (TURLIN et al., 2001).

4.10. Extração de DNA de amostras fecais

A extração do DNA foi realizada com a utilização do QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram pesadas em um microtubo de 2 mL, 200 ± 20 mg de amostras de fezes e foram adicionadas em cada amostra 1 mL de Tampão InhibitEX. Em seguida, agitou-se em vortex continuamente por 1 minuto ou até as amostras de fezes serem completamente homogeneizadas e posteriormente incubadas 5 minutos a 70° C. Novamente foram agitados em vortex por 15 segundos e em seguida, centrifugadas a $20\,000 \times g$ por 1 minuto para sedimentar as partículas de fezes (pellets) e separação do sobrenadante.

Em um novo microtubo (1,5 mL) foram pipetados na seguinte ordem: 15 μL de Proteinase K, 200 μL do sobrenadante e 200 μL do Tampão de lise (AL), em seguida as misturas foram agitadas vigorosamente em vortex por 15 segundos e incubadas a 70° C por 10 minutos. Sob o lisado, foram adicionados 200 μL de etanol (96-100%) e agitados em vortex. Posteriormente, 600 μL dos lisados foram aplicados à coluna e centrifugados por 1 minuto a $20\,000 \times g$. As colunas foram lavadas com 500 μL do Tampão de lavagem 1 (AW1) e centrifugadas por 1 minuto a $20\,000 \times g$. Após a centrifugação, as colunas foram novamente lavadas com 500 μL de Tampão de lavagem 2 (AW2) e em seguida centrifugadas a $20\,000 \times g$ por 6 minutos para completa eliminação do tampão residual. As colunas foram transferidas para um novo tubo de coleta e foram pipetados 200 μL de Tampão de eluição (ATE) aplicados diretamente sobre cada membrana. As colunas foram mantidas à temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida, foram centrifugadas a $20\,000 \times g$ por 1 minuto para eluir o DNA.

4.11. Análise da microbiota intestinal por PCR quantitativo em tempo real

A concentração de DNA foi determinada por absorbância a 260 nm (A260), e a pureza estimada por meio da determinação da razão A260 / A280 em um espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA). Foram utilizados iniciadores específicos para diferentes filos de bactérias que caracterizaram a microbiota fecal quantificadas por qPCR em tempo real (Tabela 3). As análises de qPCR foram realizadas em um sistema de detecção CFX96 Touch™ (Bio-Rad, Berkeley, California) (Primer Express software), utilizando o kit de detecção Power SYBR green PCR master mix da Promega (Madison, WI). Todas as análises foram realizadas em duplicata contendo em cada poço 2 µL de amostra ou padrão, iniciadores senso e anti-senso (Alpha DNA) a concentrações de 300 nM e água livre de nucleases para um total de 25 µL. As condições térmicas do ciclo de PCR utilizadas foram as seguintes: uma desnaturação inicial do DNA a 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95° C durante 10 segundos, anelamento do iniciador à 60° C durante 20 segundos e extensão a 72° C durante 15 segundos. Uma análise da curva de melting após amplificação foi realizada para garantir a qualidade e especificidade da PCR.

Curvas padrão foram construídas para cada experimento utilizando cinco diluições sequenciais de DNA genômico bacteriano de culturas puras (Tabela 3) variando de 20 ng a 0,032 ng. A acurácia do método qPCR foi analisada a partir da relação linear entre o log de concentração das diluições do DNA isolado das culturas puras e os valores de C_t dos filos de bactérias das amostras. As eficiências de amplificação e R^2 das equações de cada placa analisada variaram de 1,63 a 1,88 e 0,96 a 0,99, respectivamente. Valores de eficiência próximos de 2 e R^2 da equação 1, comprovam a acurácia do método. A abundância dos filos de bactérias de cada amostra fecal foram calculadas segundo o método de quantificação relativa descrito por Stevenson e Weimer (2007). As diferentes linhagens utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (*Bacteroides ovatus* ATCC 8483; *Escherichia coli* ATCC 11775) e da Coleção de Culturas Tropical (*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 CCT 3744).

Tabela 3. Sequência de iniciadores específicos para o qPCR

Grupo	Primers (S e A)	DNA genômico padrão	Referências
Bactérias totais (16S rRNA)	S- GCAGGCCTAACACATGCAAGTC A- CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Escherichia coli.</i>	Castillo et. al., 2006
Bacteriodetes	S- CATGTGGTTTAATTCGATGAT A- AGCTGACGACAACCATGCAG	<i>Bacteroides ovatus</i>	Guo et. al., 2008
Firmicutes	S-ATGTGGTTTAATTCGAAGCA A-AGCTGACGACAACCATGCAC	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Guo et. al., 2008
Proteobacteria	S- CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG A- CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	<i>Escherichia coli.</i>	Friswell et. al., 2010

S: Senso; A: Antisenso. Todos os oligonucleotídeos foram obtidos da Alpha DNA e Diagnósticos Moleculares LTDA.

4.12. Determinação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta

As amostras de fezes (300 mg: 2,5 mL de água destilada) foram centrifugadas (12 000 × g, 10 minutos) e os sobrenadantes isentos de células foram tratados como descrito por Siegfried, Ruckemann e Stumpf (1984).

Após a centrifugação, foram colhidos 600 µL do sobrenadante em duplicata para novos tubos de microcentrífuga. Juntamente ao sobrenadante, foram adicionados em cada amostra 600 µL de solução de hidróxido de cálcio (264,5 g/L) e 300 µL de solução de sulfato cúprico (125 g/L) contendo 2,0 g de ácido crotônico. Agitou-se em vortex por 10 segundos e em seguida, as amostras foram congeladas.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 12 000 × g por 10 minutos. Foram transferidos 1,0 mL do sobrenadante para novos tubos de microcentrífuga, adicionados 28 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄; 1M) em cada amostra e novamente foram congeladas. O processo de descongelamento e congelamento das amostras se repetiu por mais duas vezes e em seguida, foram centrifugadas a 12 000 × g por 10 minutos. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante para *vials* de HPLC.

As concentrações de ácidos orgânicos (acético, propiônico e n-butírico) em amostras fecais foram determinadas por HPLC em um Dionex Ultimate 3000 HPLC (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) acoplado a um índice de refração (RI) Shodex RI-101 mantido a 40° C utilizando uma coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex-ROA Organic Acid, 300 mm x 4,6 mm mantida a 45° C. A fase móvel foi preparada com 5 mM de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o fluxo foi de 0,7 mL / minuto. Os seguintes ácidos orgânicos foram utilizados para a calibração da curva padrão: ácido acético, succínico, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico e butírico. As soluções padrões de ácidos graxos voláteis foram

preparados com uma concentração final de 10 mmol / L, exceto ácido isovalérico (5 mmol / L) e ácido acético (20 mmol / L).

4.13. Citocinas

Foram realizadas análises de concentrações séricas de adiponectina (Adiponectin Cat. #EZRADP-62K-Millipore Corporation, CA) e resistina (Resistin Cat. #SEA847 RA, USCN, USA) utilizando kit comercial ELISA seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram adicionadas às placas de microtitulação revestidas com os anticorpos primários monoclonal Anti-adiponectina ou Anti-resistina, as quais foram incubadas por 2 horas. Em seguida, foi adicionado o anticorpo conjugado a biotina, a enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP)-Avidina incubando por 1 hora. Após a solução do substrato ser adicionada, os poços que continham o anticorpo resistina e, ou adiponectina conjugado com biotina e avidina apresentaram mudança de cor de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra. A reação enzima-substrato terminou com a adição de solução de ácido sulfúrico e a alteração da cor foi determinada espectrofotometricamente (Awareness®, Stat Fax 2100) a um comprimento de onda de 450 nm. A concentração de resistina e, ou adiponectina nas amostras foram determinadas por comparação da absorbância das amostras com a curva padrão.

4.14. Determinação da proteína NF- κ B por Western Blotting

As proteínas do homogeneizado de fígado (extrato nuclear e citoplasmático) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com SDS-PAGE, utilizando o método proposto por Laemmli (1970). Utilizou-se o sistema de eletroforese vertical mini gel (Loccus do Brasil Ltda.) em voltagem constante de 100 Volts por duas horas e 40 minutos. Quantidades conhecidas (15 μ g) de proteína total das amostras e 5 μ L do padrão de referência (Broad Range Markers – Santa Cruz Biotechnology) foram aplicadas ao gel. A amostra foi preparada utilizando-se uma alíquota de 30 μ L do homogeneizado de fígado (extrato nuclear e citoplasmático) e adicionando-se 10 μ L de tampão de amostra 4X (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% glicerol, 4% SDS; 0,002% azul de bromofenol e 4 μ L de β -mercaptoetanol). Antes de serem aplicadas no gel, as amostras congeladas a -20°C foram fervidas por 4 minutos, e imediatamente imersas em gelo. Após a separação em gel de bis-acrilamida-SDS, as proteínas foram eletroforicamente transferidas para uma

membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF) (BioRad®). A transferência ocorreu por uma hora e meia a 4° C em amperagem constante (0,35 A) e 90 V, usando o módulo interno para *western blot* da *Loccus* do Brasil Ltda.

Após sucessivas lavagens com tampão TBS (10 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl), os sítios de interação não-específicos foram bloqueados utilizando uma solução de bloqueio a 5% (Blotting-grade blocker, Bio-Rad) por 1 hora com agitação constante. Em seguida, a solução de bloqueio foi desprezada e a membrana foi lavada três vezes consecutivas com 15 mL de TBS-T (TBS 1X acrescido de 0,1% de Tween 20) e com agitação de 15 minutos.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada sob agitação *overnight*, a 4° C com o anticorpo primário monoclonal anti-NF-κB-p65 (65 kDa) (ab13594; Abcam, Cambridge, Reino Unido) em 15 mL de albumina sérica bovina (BSA) 3% na diluição de 3:1000. Após incubação a solução de anticorpo primário foi retirada, sendo então realizadas três lavagens sob agitação constante com 15 mL de TBS-T por 10 minutos. A membrana foi incubada com um anticorpo secundário conjugado *horseradish peroxidase* (HRP) (A-9044, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) diluído em 15 mL BSA 3% em TBS-T, na proporção de 1:8000, por duas horas, a temperatura ambiente e agitação constante. Após nova sequência de lavagens, conforme descrito anteriormente, a reação de cor foi desenvolvida utilizando o substrato tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB) diluído em 15 mL Tris-HCl 50mM (pH 7,6) e 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (30%), permanecendo incubadas por aproximadamente 10 minutos com agitação constante até o aparecimento das bandas. Após lavagem com água destilada, a membrana foi seca em papel filtro e mantida ao abrigo da luz.

4.15. Enzimas antioxidantes e marcador de peroxidação lipídica no fígado

As amostras de fígado (100 mg) obtidas a partir de cada animal foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 10 000 × g por 15 minutos a 4° C e os sobrenadantes colhidos e armazenados a -80° C. As concentrações de proteínas nos sobrenadantes foram quantificadas segundo o método de Bradford (1976). A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como o padrão de proteína. Os níveis de malondialdeído (MDA), óxido nítrico e atividade das enzimas SOD, catalase e GST nos sobrenadantes de fígado foram determinados segundo os métodos calorimétricos.

4.16. Quantificação de proteína dos homogeneizados de fígado

Inicialmente, preparou-se o reagente de Bradford diluindo 100 mg de comassie brilhante blue G250 em 50 mL de etanol absoluto 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%, em seguida completou-se o volume para 200 mL e obteve-se Bradford 5X após permanecer em agitação *overnight*. Para o ensaio, foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL, 790 µL de água destilada, 10 µL de homogeneizado de fígado diluído 1:10 e 200 µL do reagente de Bradford. Para a determinação do branco foram utilizados 800 µL de água destilada e 200 µL de reagente Bradford.

A mistura foi agitada em vórtex e permaneceu em repouso por 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda a 595 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA).

4.17. Malondialdeído pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ácido tiobarbitúrico forma adutores de cores com peróxidos lipídicos, hidroperóxido e duplas ligações de oxigênio que apresentam absorção máxima a 532 nm. O MDA, um aldeído reativo (baixa estabilidade) amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo, ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma uma solução de cor rosa (PILZ; MEINEKE; GLEITER, 2000).

Foram adicionados em 200 µL de homogeneizado do fígado, 200 µL de solução de TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,075% e HCl 0,25 M). Após agitação em vórtex, as misturas foram incubadas por 40 minutos a 90° C, sendo em seguida acrescentados 600 µL de n-butanol e centrifugada por 10 minutos a $900 \times g$ com a retirada da fase orgânica, na qual foi determinada a absorbância em 532 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA) (BUEGE; AUST, 1978).

Os valores finais foram calculados por meio de curva-padrão, sendo utilizado como padrão o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMPO), com a concentração variando de 20 µM a 1,25 µM. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína (nmol MDA/mg PTN).

4.18. Óxido Nítrico (ON)

A concentração de óxido nítrico foi determinada pelo método de Griess (GREEN et al, 1982). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida (I) e 0,1% de naftiletenodiamino-bicloridrato (II) em ácido ortofosfórico (H_3PO_4) a 2,5%.

No momento do ensaio, foram misturadas 50 μ L da solução I e 50 μ L da solução II formando o reagente de Griess. As amostras (50 μ L do homogeneizado de fígado) foram pipetadas em triplicata em uma placa tipo Elisa de 96 poços. Em seguida, um volume de 100 μ L de reagente Griess foi adicionado em todos os poços. Após incubar por 10 minutos em ambiente escuro, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA) a 570 nm. As concentrações de óxido nítrico foram calculadas a partir de uma curva-padrão realizada com uma solução de 6,9 mg de nitrito de sódio ($NaNO_2$) em 400 mL de tampão fosfato (pH 7,0) expressos em μ M. Os valores utilizados para o cálculo da curva-padrão de $NaNO_2$ variaram de 125 a 0,97 μ M.

4.19. Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi estimada utilizando a metodologia descrita por Marklund (1985). Ânions superóxido são gerados durante a oxidação do pirogalol sob condições de teste e a enzima SOD inibe a oxidação do pirogalol. A atividade enzimática é medida por monitoramento da taxa de diminuição da densidade óptica a 570 nm. Para 30 μ L de homogeneizado do fígado, 15 μ L de pirogalol (100 μ M), 6 μ L de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolio a 1,25mM) e 99 μ L de tampão fosfato pH 7,0 foram adicionados. A leitura de absorvância foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA), após incubação a 37° C por 5 minutos e adição de 150 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol sob as condições de teste e expressa como U de SOD/ mg proteína.

4.20. Catalase

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade em clivar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEI (1984).

Em uma cubeta semi-micro de quartzo (1,5 mL) foram adicionados 10 μL do homogeneizado de fígado diluído (1:5) e 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) adicionado de H_2O_2 (25 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, para 40 μL de H_2O_2 30%). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as absorbâncias foram determinadas no tempo 0, 30, 60 e 90 segundos a 240 nm em espectrofotômetro. Para o branco, foram utilizados 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) mais 10 μL de amostra, antes de cada reação.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1 mol de H_2O_2 ($\epsilon=39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto. A absorbância utilizada para o cálculo da catalase foi o delta obtido da absorbância inicial (tempo 0) menos a absorbância a 60 segundos em espectrofotômetro e o resultado obtido multiplicado pela constante 2,361. Os dados foram expressos em U de catalase/mg de proteína.

4.21. Glutathione S-Transferase (GST)

A determinação da GST baseia-se no princípio no qual o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é metabolizado pela GST conjugando-se à glutathione na sua forma reduzida (GSH), com aumentos de absorbância a 340 nm (HABIG et al., 1974).

Para a reação foram adicionados 970 μL de tampão fosfato (100 mM; pH 7,0), 10 μL de CNDB (0,1 M diluído em etanol 80%) e 10 μL de GSH (0,1 M diluído em tampão fosfato a 100 mM; pH 7,0). Por fim, acrescentou-se 10 μL do sobrenadante do homogeneizado de fígado. A solução foi pipetada em cubeta semi-micro de quartzo (1,5 mL) e registradas em espectrofotômetro os aumentos de absorbância a 340 nm nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. Para o cálculo da atividade de GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$), foi utilizada a seguinte equação:

$$\Delta A_{340} \times \text{diluições}/\epsilon = A_{340} \times 1000 (100 \text{ cubeta} \times 10\text{f})/9.6 = A_{340} \times 104,17; \text{ onde}$$

$$\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (coeficiente de extinção molar).}$$

REFERÊNCIAS

ABDELGHAFOR, R. F.; et al. Quality of Bread from Composite Flour of Sorghum and Hard White Winter Wheat. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 9-15, 2011.

ACHI, O. K. The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 375-380, 2005.

AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 105, p. 121–126, 1984.

AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. Adipokines and the Peripheral and Neural Control of Energy Balance. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 5, p. 1023–1031, 2008.

ALAM, M. S.; et al. Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 445-475, 2016.

ALEMANY, M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, p. 1-11, 2013.

ANUNCIACÃO, P. C.; et al. Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. **Food Chemistry**, v. 221, p. 984-989, 2017.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W. Sorghum phytochemicals and their potential aspects on human health. **Phytochemistry Elmsford**, v. 65, p. 1 199-1221, 2004.

BACKHED, F, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 104, n.3, p.979-984, 2007.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v.101, n.44, p. 15718-15723, 2004.

BARBOSA, K. B. F.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, fact and perspectives. **Presse Medicale**, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n. 1-2, p. 248, 1976.

BRALLEY, E.; et al. Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 307-122, 2008.

BRANDT, K.; SAMPAIO, M.; MIUKI, C. Importance of the intestinal microflora. **Pediatrics**, v. 28, n. 2, p.117-127, 2006.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 2004.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURDETTE, A.; et al. Anti-inflammatory activity of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 879-887, 2010

CAESAR, R.; et al. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 658–668, 2015.

CAESAR, R.; et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v. 61, n. 12, p.1701–1707, 2012.

CALDER, P. C.; et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106 (Suppl 3), p. S5–S78, 2011.

CARDOSO, L. D. M.; et al. Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven, **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 220-226, 2015a.

CARDOSO, L. M.; et al. Sorghum (*sorghum bicolor* L.): Nutrients, Bioactive Compounds, and Potential Impact on Human Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 372-390, 2015b.

CASTILLO, M.; et al. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 1-2, p. 165-170, 2006.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110–119, 2015.

CLARKE, S. F.; et al. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. **Gut Microbes**, v. 3, p. 186-202, 2012.

CUEVA, C.; et al. In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites FEMS. **Microbiology Ecology**, v. 83, p. 792–805, 2012.

DIBAISE, J. K. et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 4, p. 460–469, 2008.

GUMUL, D.; KORUS, J. Polyphenol content and antioxidant activity of rye bran extrudates produced at varying parameters of extrusion process. **Food Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2006.

DICKO, M. H.; et al. Review: sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 5, 384-395, 2006.

Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. – 4.ed. - São Paulo, SP. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em: 02 de fevereiro de 2017

DLAMINI, N. R.; TAYLOR, J. R. N.; ROONEY, L. W. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1412–1419, 2007.

DOMITROVIC, R. The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. **Current Medicinal Chemistry Journal**, v. 18, n. 29, p. 4454-4469, 2011.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 103, p. 71-83, 2010.

DUNCAN, S. H. et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 1720–1724, 2008.

DYKES, L.; ROONEY, I. W. Sorghum and millet phenols and antioxidants. **Journal of Cereal Science**, London, v.44, n.3, p.236-251, 2006.

FLOEGEL, A. et al. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 600-623, 2010.

FREJNAGEL, S.; JUSKIEWICZ, J. Dose-dependent effects of polyphenolic extracts from green tea, blue-berried honeysuckle, and chokeberry on rat caecal fermentation processes. **Planta Medica**, v. 77, n. 9, p. 888-93, 2011.

FRISWELL, M. K., et al. Site and strain- specific variation in gut microbiota profiles and metabolism in experimental mice. **PLoS One** v. 5, p. 8584, 2010.

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, p. S2–S4, 2000.

GREEN, L. C.; et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREGOR, M. F.; et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. **Diabetes**, v. 58, p. 693–700, 2009.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 415–445, 2011.

GUO, X., et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 367-373, 2008.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, v.29, n.12, p. 1-82, 2016.

ISMAIL, N. A.; et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science**, v. 3, n. 3, p. 501–507, 2011.

KAMATH, V. G.; CHANDRASHEKAR, A.; RAJINI, P. S. Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. **Journal of Cereal Science**, v. 40, n. 3, p. 283-288, 2004.

KARLSEN, A.; et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1951-1954.

KHAN, I.; et al. Acute effect of sorghum flour-containing pasta on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and oxidative stress markers in healthy subjects: A randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 415–421, 2015.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 80, p. 183-201, 1998.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, 2000.

LAM, Y. Y.; et al. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. **Obesity** (Silver Spring), v. 23, n. 7, p. 1429-39, 2015.

LEY, R. E., PETERSON, D. A., GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell** 124, 837-848, 2006.

LOPEZ, N. J. S.; et al. The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

LYONS, C. L.; KENNEDY, E. B.; ROCHE, H. M. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. **Nutrients**, v. 8, n. 5, 2016.

MACHADO, A. B. F., et al. Microbiota gastrintestinal – evidências da sua influência na saúde e na doença. **Ed. Rubio**, 2015.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p. 243-247, 1985.

MARTÍNEZ, I.; et al. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4175-4184, 2009.

MARTINO, H. S. D. et al. Chemical characterization and size distribution of sorghum. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 337-344, 2012.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 692–703, 2009.

MORAES, E. A., et al. Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. **Food Research International**, v. 49, n. 2012, p. 553-559, 2012.

MORGUN, A. et al. Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. **Gut**, v. 64, n. 11, p. 1732-1743, 2015.

NAKAMURA T.; et al. Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 338. 2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Obesity and overweight fact sheet. World Health Organization website.**

PAIVA, C. L.; EVANGELISTA, W. P.; QUEIROZ, V. A. V.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in sorghum: method optimisation and influence of line, tannin and hydric stress. **Food Chemistry**, v. 173, p. 224-230, 2015.

PARK, J. H.; et al. Sorghum extract exerts an anti-diabetic effect by improving insulin sensitivity via PPAR- γ in mice fed a high-fat diet. **Nutrition research and practice**, v. 6, p. 322-327, 2012.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivate. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, p. 315-325, 2000.

PISCHON, T.; et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 14, p. 1730-1737, 2004.

POSTIC, C.; GIRARD, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. **Diabetes Metabolism**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. 643-648, 2008.

PRADA, P. O.; et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology** 146: 1576–1587, 2005.

QIN, J.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p.59-65, 2010.

QUEIROZ, V. A. V.; et al. Nutritional composition of sorghum [sorghum bicolor(L.) Moench] genotypes cultivated without and with water stress. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 103-111, 2015.

QUEIROZ, V. A. V.; et al. Potencial do sorgo para uso na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 278, p. 7-12, 2014.

QUEIROZ, V. A. V.; et al. Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo [Sorghum bicolor (L.) moench], para alimentação humana. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 180-195, 2011.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemistry Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 1439-1452, 2006.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n.11, p. 1939-1951, 1993.

REYNÉS, B., et al. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839- 459, 2014.

REYNÉS, B.; PALOU, M.; PALOU, A. [*in press*] Gene expression modulation of lipid and central energetic metabolism related genes by high-fat diet intake in the main homeostatic tissues. **Food and Functional**, 2017.

RITCHIE, L. E.; et al. Polyphenol-rich sorghum brans alter colon microbiota and impact species diversity and species richness after multiple bouts of dextran sodium sulfate-induced colitis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 3, 2015

ROONEY, L. W. Food and nutritional quality of sorghum and millet. **INTSORMIL Annual Report**, Lincoln, p. 105-1 14, 2001.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. **Physiology**, v. 31, p. 283–293, 2016.

SCHWIERTZ, A.; et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v. 18, p. 190-195, 2010.

SHARMA, S. D.; MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 995-1005, 2007.

SHIH, P. H.; YEH, C. T.; YEN, G. C. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1557–1566, 2005.

SHIM, T.; et al. Toxicological evaluation and anti-inflammatory activity of a golden gelatinous sorghum bran extract. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, p. 697-705, 2013.

SIEGFRIED, B. R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, p. 298–304, 1984.

SMITH, A. H.; MACKIE, R. I. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1104–15, 2004.

SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, p. 56–64, 2016.

STAMLER, J. S.; et al. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron**, v. 18, p. 691–696, 1997.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 165–174, 2007.

TOUFEKTSIAN, M.; LORGERIL, M. D.; NAGY, N. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 747–752, 2008.

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

TSUDA, T.; et al. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2125-2130, 2003.

TURLIN, B.; et al. Histologic Features of the Liver in Insulin Resistance–Associated Iron Overload. A Study of 139 Patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 116, n. 2, p. 263-270, 2001.

TURNBAUGH, P. J.; et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 6, p. 6ra14, 2009.

TURNER, N.; et al. Polyphenol-rich sorghum brans promote fecal water retention and alter short chain fatty acids in Sprague Dawley rats. **Cereal Foods World**, v. 55, n. 4 Suppl., p. A72–73, 2010.

UNGER, R. H. Lipotoxic diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p 319-336, 2002.

VALKO, M.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2006.

VARGAS-SOLORZANO, J. W.; et al. Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. **Food Research International**, v. 55, p. 37-44, 2014.

WEYER, C.; et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, 2001.

WINTOLA, O.; AFOLAYAN, A. The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora Africana* Thunb. used as antidiarrheic in Eastern Cape Province, South Africa. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 307, 2015

WONG, J. M.; et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal Clinical of Gastroenterology** v. 40, p. 235–243, 2006.

WOTING, A.; BLAUT, M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 202, 2016.

WOTING, A.; PFEIFFER, N.; LOH, G.; KLAUS, S.; BLAUT, M. *Clostridium ramosum* promotes high-fat diet-induced obesity in gnotobiotic mouse models. **Mbio**, v. 5, p. 1530-1514, 2014.

YAMAUCHI, T.; et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 332-339, 2007.

YANG, L. Y.; BROWNING, J. D.; AWIKA, J. M. Sorghum 3-Deoxyanthocyanins Possess Strong Phase II Enzyme Inducer Activity and Cancer Cell Growth Inhibition Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p.1797–1804, 2009.

ZHOU, D. et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 60-75, 2017.

5. ARTIGOS

5.1. ARTIGO 1: Farinha de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) extrusado melhora a lipogênese hepática e a biometria de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica

Resumo

Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito do consumo da farinha de sorgo extrusado (FSE) adicionada em uma dieta hiperlipídica nas medidas biométricas e na lipogênese hepática de ratos *Wistar* obesos. Ratos machos *Wistar* foram divididos em quatro grupos e alimentados com dieta normal (AIN-93M), dieta hiperlipídica (HFD), HFD acrescida de FSE substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho (HFDS50) e HFD acrescida de FSE substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho (HFDS100) por oito semanas. A FSE contribuiu para a redução do índice de massa corporal, bem como o peso do fígado dos animais obesos. O consumo de FSE reduziu a lipogênese hepática por aumentar a expressão gênica e os níveis proteicos do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR- α), aumentar a expressão gênica do receptor de adiponectina 2 (AdipoR2) e reduzir a expressão gênica da proteína ligada ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c). As análises histológicas confirmaram a redução do grau de esteatose hepática dos animais obesos alimentados com FSE. Portanto, a FSE produzida a partir do genótipo de pericarpo marrom foi eficaz para melhorar as medidas biométricas e a lipogênese hepática, podendo ser considerado um alimento com potencial funcional na prevenção da obesidade e suas co-morbidades.

Palavras-chave: farinha de sorgo extrusado, β - oxidação, compostos bioativos, adipogênese

Introdução

A dieta associada ao sedentarismo constitui-se como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade. O consumo de dietas hipercalóricas, principalmente ricas em gorduras e carboidratos, está associado ao acúmulo de gordura visceral e também em tecidos como o fígado, o que caracteriza a lipotoxicidade (LYONS; KENNEDY; ROCHE, 2016). A lipotoxicidade ativa as vias inflamatórias e promove o aumento do estresse oxidativo, desregula o metabolismo de lipídios, induz às dislipidemias e a esteatose hepática podendo levar ao

desenvolvimento de patologias como a Doença Hepática Gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (CERIELLO; MOTZ, 2004).

A DHGNA é identificada como uma das mais prevalentes doenças crônicas do fígado, sendo reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) e caracteriza-se por esteatose simples, podendo progredir para a esteatohepatite não-alcoólica (EHNA), que pode levar à fibrose e até a cirrose letal (SZCZEPANIAK et al., 2005; DOWMAN et al., 2010). Os mecanismos que conduzem à deposição excessiva de gordura no fígado (esteatose), observada nesta patologia, ainda não estão completamente esclarecidos, no entanto, aceita-se a hipótese de “dois hits”, em que o “primeiro hit” é a resistência à insulina, levando às desordens no metabolismo de lipídios por meio da maior expressão de genes lipogênicos e redução da β -oxidação mitocondrial (YAMAZAKI et al., 2007). O “segundo hit” é a progressão para EHNA por aumento do estresse oxidativo, da peroxidação lipídica e de citocinas pró-inflamatórias (DAY; JAMES, 1998).

Devido ao elevado número de indivíduos obesos e, portanto, de suas doenças associadas, estratégias nutricionais de prevenção e tratamento da obesidade tem sido o foco de muitos pesquisadores (BELOBRAJDIC et al., 2011; GOTO et al., 2011). O sorgo (*Sorghum bicolor* L.), um cereal da família *Poaceae*, nativo da África, possui um elevado potencial nutricional e funcional, que pode trazer benefícios à saúde de humanos. Entre os genótipos de sorgo, os grãos que possuem o pericarpo e a testa pigmentada apresentam elevado conteúdo de ácidos fenólicos, 3-deoxiantocianinas e proantocianidinas (taninos), que são compostos eficazes na modulação de doenças como o câncer, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e outras (CARDOSO et al., 2015; PAIVA et al., 2015). Estudos tem demonstrado que a ingestão oral de extratos de compostos fenólicos de sorgo (50 a 600 mg / kg por 14 dias) é eficiente em reduzir a concentração plasmática de colesterol e triacilglicerol em ratos e podem efetivamente reduzir a lipogênese por mecanismos que melhoram a sensibilidade à insulina, aumentando a adiponectina e reduzindo citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (CHUNG et al., 2011; PARK et al., 2012).

No intuito de viabilizar o consumo de sorgo por humanos e animais, algumas técnicas de processamento são utilizadas, como por exemplo, a extrusão de cereais. O processamento por extrusão vem sendo considerado promissor na produção de alimentos funcionais à base de cereais, e caracteriza-se pela utilização de uma combinação de calor, umidade e trabalho mecânico, que modifica as matérias-

primas, proporcionando novos formatos e estruturas com diferentes características funcionais e nutricionais em um curto espaço de tempo (ALAM et al., 2016; ANUNCIÇÃO et al., 2017). Sugere-se que as elevadas temperaturas utilizadas no processamento de extrusão de sorgo favorecem para a redução do grau de polimerização de taninos e também, fragmentem a estrutura de arabinosilanos, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos e portanto, seus efeitos biológicos à saúde (CARDOSO et al., 2015a; LOPEZ et al., 2016).

Até o momento, não foram encontrados estudos *in vivo* que avaliaram o potencial benefício do sorgo extrusado nas alterações metabólicas relacionadas à obesidade e suas comorbidades. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo da farinha de sorgo extrusado (FSE) por animais obesos, em alterações relacionadas ao perfil biométrico, ao processo de lipogênese, à β - oxidação e à retenção de gordura hepática.

Materiais e Métodos

Farinha de sorgo extrusado

O genótipo de sorgo selecionado foi o SC 319 de pericarpo marrom, que possui alto conteúdo de fibra alimentar e compostos bioativos, como proantocianinas (taninos) e 3-deoxiantocianinas (CARDOSO et al., 2015). As sementes do genótipo de sorgo SC 319 foram plantadas na estação de pesquisa Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Nova Porteirinha, MG, em uma latitude de 15°47'S, longitude 43°18'O e 516 m acima do nível do mar, em junho de 2011. Posteriormente, os grãos foram encaminhados para o Laboratório de Cereais (EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ) e submetidos à extrusão, segundo procedimento descrito por Vargas-Solórzano et al. (2014). Os grãos extrusados foram moídos em farinha e, em seguida, embalados em sacos de polietileno e armazenados a $-20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os dados de composição química da FSE, incluindo carboidratos, proteínas, lipídios, fibra alimentar e compostos bioativos, foram determinados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARDOSO et al., 2015) e esses dados foram utilizados para a elaboração das dietas experimentais.

Animais e dietas experimentais

Ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos adultos (60 dias de idade; $n = 32$), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram alocados em gaiolas individuais de aço inoxidável e mantidos a uma temperatura controlada de $22^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso à água *ad libitum*.

Inicialmente, os grupos de animais receberam as seguintes dietas: Dieta hiperlipídica (HFD) ($n = 24$) como controle obeso, baseada na composição da dieta comercial D12079B (Research Diets®) para indução da obesidade e dieta AIN-93M (REEVES et al., 1993) ($n = 8$) como controle eutrófico durante 49 dias, correspondendo a fase I do estudo. Ao final dessa fase, os ratos ficaram em jejum durante 12 h para a coleta de amostras de sangue por punção caudal. Medidas biométricas e análises bioquímicas foram realizadas para confirmação da indução de obesidade nesses animais (dados não apresentados). Na fase II, o grupo AIN-93M foi mantido e os animais do grupo HFD obesos foram redistribuídos em três grupos segundo o peso corpóreo médio ($303,8 \text{ g} \pm 1,4$; $n = 8$ / grupo). As farinhas de grãos de sorgo do genótipo SC 319 extrusados foram adicionadas às dietas de dois desses grupos em quantidades suficientes para fornecer 50% (HFDS 50) e 100% (HFDS 100) da fibra alimentar recomendada (5g), que substituiu 100% de amido de milho das dietas (Tabela 1). Os demais ingredientes da dieta (caseína, maltodextrina, sacarose e óleo de soja) foram ajustados para fornecer dietas hiperlipídicas isocalóricas com ou sem adição de FSE. O peso e o consumo alimentar de cada animal foram monitorados semanalmente durante 56 dias.

Ao final da fase II de experimentação, após jejum de 12 horas, os 32 animais foram anestesiados com isoflurano 100% (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos apropriados, $16 \times 100 \text{ mm}$ (BD Vacutainer®) e centrifugados sob refrigeração por 10 minutos a $1006 \times g$, para obtenção de soro. Os órgãos coração, cérebro, ceco e fígado foram retirados e em seguida, pesados. O fígado dos animais foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C . Algumas amostras do tecido hepático foram lavadas em solução salina, fixadas em formaldeído a 10% e mantidas à temperatura ambiente para posterior análise histológica.

Os animais desse estudo foram mantidos e tratados de acordo com o protocolo (Nº 06/2014; data de aprovação: 25 de Fevereiro/ 2015) aprovado pelo

Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Tablea 1. Composição das dietas experimentais (g·100g⁻¹).

Ingredientes	AIN-93M^A	HFD^B	HFDS50^C	HFDS100^D
Caseína	14	19,50	17,67	15,84
Maltodextrina	15,50	10	3,10	0
Amido de milho	46,57	5,32	0	0
Sacarose	10	34,10	34,10	25,04
Óleo de soja	4	1	0,66	0,32
Banha de porco	0	20	20	20
Celulose	5	5	2,5	0
Mix vitamínico	1	1	1	1
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Colesterol	0	0,15	0,15	0,15
BHT	0,0008	0,0004	0,0004	0,0004
Farinha de sorgo extrusado	-	-	16,86	33,72
3- DXAS total (µg)	nd	nd	16,92	33,85
Luteolinidina (µg)	nd	nd	4,45	8,90
Apigeninidina (µg)	nd	nd	2,39	4,78
5-Metoxi-luteolinidina (µg)	nd	nd	6,82	13,65
7-Metoxi-apigeninidina (µg)	nd	nd	3,27	6,54
Proantocianinas totais (mg EC)*	nd	nd	8,20	16,41
Compostos Fenólicos totais (mg AG)**	nd	nd	0,08	0,16
Calorias (kcal):				
Carboidrato (%)	72,58	42,42	41,09	39,82
Proteína (%)	17,96	16,74	17,12	17,58
Lipídio (%)	9,47	40,85	41,79	42,61
Densidade calórica (kcal/g)	3,80	4,66	4,56	4,44

^A: dieta padrão para roedores; ^B: dieta hiperlipídica; ^C: dieta hiperlipídica com substituição em 50% de celulose e 100% do amido de milho por farinha de sorgo extrusado; ^D: dieta hiperlipídica com substituição em 100% de celulose e amido de milho por farinha de sorgo extrusado; *: equivalente de catequina; **: equivalente de ácido gálico.

nd: Não determinado; BHT: hidroxitolueno butilado

Análise da transcrição reversa associada à Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR) no fígado

O RNA total de amostras de fígado foi extraído utilizando reagente Trizol disponível comercialmente (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando um Kit de transcrição reversa M-MLV (Invitrogen Brasil Ltda.) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 2. Os níveis de cada mRNA foram determinados com o sistema de detecção StepOne Plus real-time PCR

utilizando SYBR green Fast PCR master mix da Applied Biosystems (Foster City, CA). As condições da PCR foram as seguintes: 95° C por 20 segundos e 40 ciclos incluindo 95° C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos, seguidos da Curva de Melting. A expressão gênica foi calculada pelo método 2- Delta- Delta C(T) (2- $\Delta\Delta C_t$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando GAPDH como referência e o grupo obeso como controle, sendo este normalizado para valor de 1.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR

Gene	Iniciador Senso (5' - 3')	Antisense (3' - 5')
PPAR-α	CCT GGC TTC CCT GTG AAC T	ATC TGC TTC AAG TGG GGA GA
ADIPO R2	CAT GTT TGC CAC CCC TCA GTA	ATG CAA GGT AGG GAT GAT TCC A
SREBP-1c	CGC TAC CGT TCC TCT ATC AAT GAC	AGT TTC TGG TTG CTG TGC TGT AAG
CPT-1α	GTA AGG CCA CTG ATG AAG GAA GA	ATT TGG GTC CGA GGT TGA CA
GAPDH	AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC	CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC

Todos os oligonucleotídeos foram desenhados no programa Primer 3 Plus e obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Citocina e fator de transcrição

As concentrações séricas de adiponectina foram analisadas no soro por imunoensaio utilizando um kit comercial ELISA específico (Adiponectin Cat. #EZRADP-62K-Millipore[®], Billerica, MA). As amostras foram adicionadas à placa de microtitulação revestida com o anticorpo primário monoclonal Anti-adiponectina, a qual foi incubada por 2 horas. Acrescentou em seguida o anticorpo conjugado a biotina, a enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP)-Avidina incubando por 1 hora. A reação enzima-substrato terminou com a adição de solução de ácido sulfúrico e a alteração da cor foi determinada espectrofotometricamente (Awareness[®], Stat Fax 2100) a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram determinados por comparação da absorbância das amostras com a curva padrão.

Para a determinação das concentrações hepáticas do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR- α), as amostras de tecido hepático foram homogeneizadas utilizando o *Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific Fisher) para separação das proteínas da fração nuclear e citoplasmática, de acordo com as instruções do fabricante. O PPAR- α da fração nuclear foi avaliado por imunoensaio utilizando *Kit Rat PPAR- α Elisa* (kit Cat # E-EL-R0725-ra; Elabscience, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A

micro placa ELISA fornecida neste kit foi pré-revestida com um anticorpo específico para PPAR- α . A absorvância foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm. A concentração de PPAR- α nas amostras foram calculadas comparando-se as amostras com a curva padrão correspondente.

Histomorfometria do fígado

As amostras de tecido hepático dos 32 animais foram embutidas em resina. Nove secções transversais semi-seriadas com 3 μ m foram obtidas utilizando micrótomo automático (Reichert Jung®) com navalhas de vidro. As secções foram coradas com hematoxilina / eosina. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry®, Japão) e as imagens capturadas com câmera digital DIGI-PRO 5.0 M por meio de Software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope®). Dez campos diferentes por animal foram capturados com objetiva de 40X e os pontos sobre as vesículas de gordura, citoplasma e núcleo foram contados manualmente com o auxílio do aplicativo Image J® versão 1.5 (Wayne Rasband). O grau de esteatose foi avaliado semiquantitativamente de acordo com uma escala de 5 graus: grau 0, se o percentual de gordura fosse ausente ou <5%; Grau 1, se $\geq 5\%$ e <25%; Grau 2, se $\geq 25\%$ e <50%; Grau 3, se $\geq 50\%$ e <75%; e grau 4, se $\geq 75\%$ (TURLIN et al., 2001).

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em Log10 antes das análises estatísticas paramétricas. Os dados foram expressos em médias \pm desvio padrão (DP). Análise de variância One-way (ANOVA) foi utilizada para analisar variáveis contínuas e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *post-hoc* Tukey, a um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statical Package for Social Sciences (SPSS) versão 20.0 e os gráficos foram feitos com o auxílio do programa Graphpad Prism versão 6.0.

Resultados

Efeito da farinha de sorgo extrusado no consumo alimentar, no peso corporal e no peso dos órgãos

Em geral, o consumo alimentar do grupo controle obeso (HFD) foi menor e o peso corporal foi maior ($p < 0,05$) que o grupo controle eutrófico (AIN-93M) (Fig. 1A e C). O consumo alimentar dos grupos HFDS50 e HFDS100 foi semelhante aos grupos controle eutrófico e controle obeso até a sétima semana, quando houve maior consumo alimentar pelos grupos alimentados com a FSE ($p < 0,05$). O coeficiente de eficiência alimentar e o coeficiente de eficiência energética (ARBEX, 2015) foi maior ($p < 0,05$) nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica com ou sem adição de FSE (Fig. 1B).

O consumo de FSE não interferiu no peso corporal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. No entanto, o Índice de Massa Corporal (IMC) foi menor nos animais obesos que receberam FSE em relação ao grupo controle obeso ($p < 0,05$) e semelhante ao grupo controle eutrófico ($p < 0,05$) (Figura 1C e D). O peso do fígado e o índice hepatossomático foi maior no grupo controle obeso ($p < 0,05$) e diminuiu nos grupos HFDS50 e HFDS100 ($p < 0,05$). O peso do ceco e seu índice somático reduziram no grupo controle obeso ($p < 0,05$) e foi maior no grupo controle eutrófico ($p < 0,05$). O consumo de FSE pelos grupos HFDS50 e HFDS100 interferiu no peso do ceco e seu índice somático, tornando-os semelhantes ao grupo controle eutrófico ($p < 0,05$), porém, o peso desse órgão não foi diferente do grupo controle obeso. Não houve diferença ($p > 0,05$) no peso do cérebro e do coração entre os grupos experimentais (Figura 1E e F).

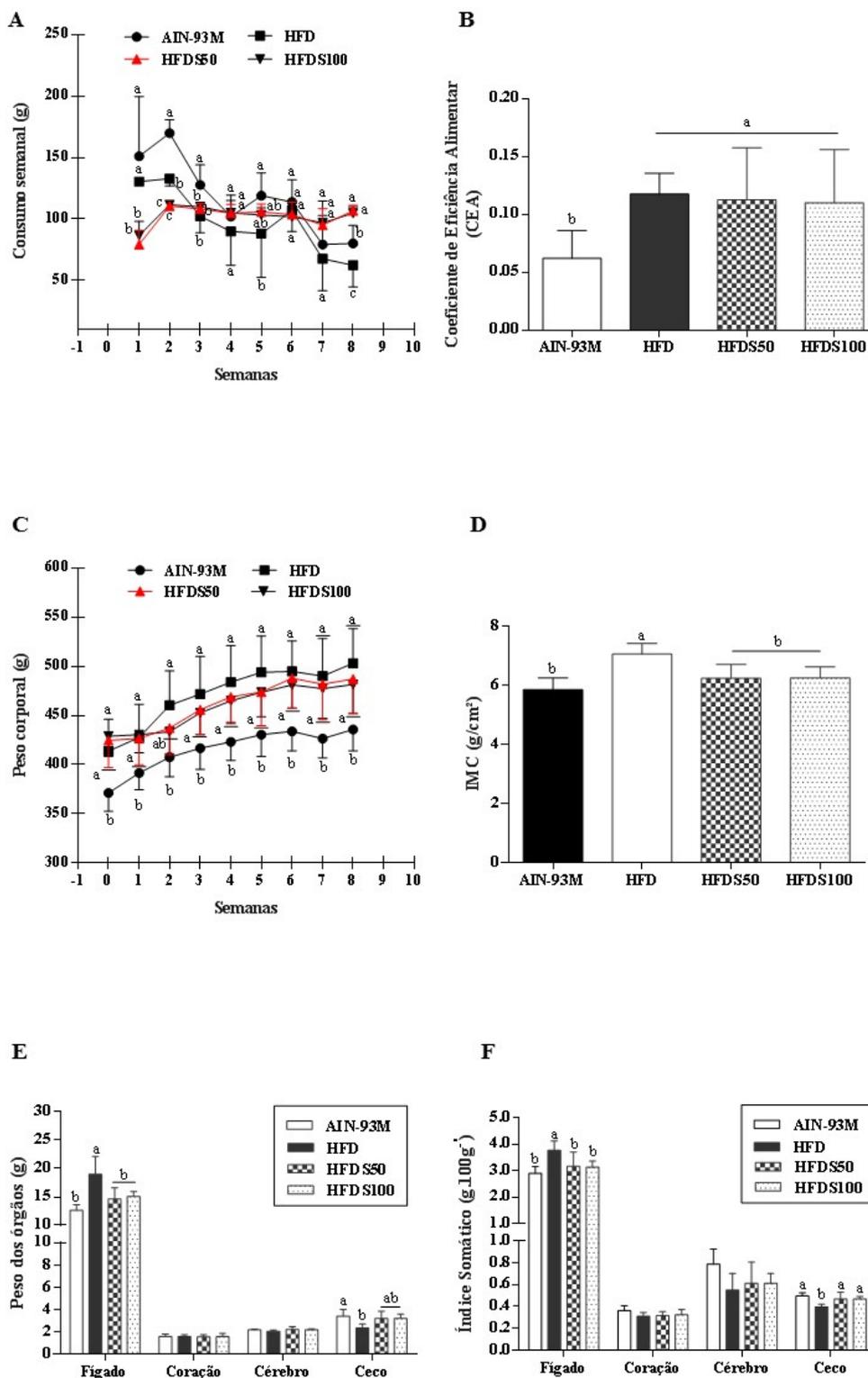


Figura 1. Consumo alimentar e medidas biométricas de ratos Wistar obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por oito semanas.

*Médias seguidas pela mesma letra no mesmo gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle eutrófico; HFD: grupo controle obeso; HFDS50: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; HFDS100: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica.

Efeito da farinha de sorgo extrusado sobre os níveis de adiponectina sérica e na expressão de genes associados a biossíntese e oxidação de ácidos graxos no fígado

Foram investigadas a expressão de genes relacionados à sinalização de adiponectina no processo de lipogênese e oxidação de ácidos graxos. A expressão gênica do receptor de adiponectina hepático (AdipoR2) reduziu no grupo HFD, porém aumentou para 2 vezes no grupo HFDS100 ($p < 0,05$; Figura 2C). Nenhuma diferença nos níveis séricos de adiponectina entre os grupos experimentais foi observada, no entanto, houve uma tendência na redução desta no grupo controle obeso ($p = 0,08$; Figura 2D). Observou-se também que a expressão de PPAR- α , um membro da família de receptores nucleares que regula o metabolismo de lipídios por mediar a captação, ativação e oxidação de ácidos graxos, reduziu no grupo HFD ($p < 0,05$). O tratamento com a farinha de sorgo extrusado aumentou a expressão de mRNA do PPAR- α para 5,56 vezes no grupo HFDS50 e 14,25 vezes em HFDS100 ($p < 0,05$; Figura 2A), porém os níveis proteicos hepáticos de PPAR- α aumentaram apenas no grupo HFDS100 ($p < 0,05$; Figura 2B).

A expressão de genes alvos de PPAR- α , como a carnitina palmitoil transferase (CPT-1 α) diminuiu no grupo HFD em relação ao grupo AIN-93M ($p < 0,05$; Figura 2E). No entanto, nos grupos HFDS50 e HFDS100, a expressão de mRNA de CPT-1 α não diferiu em relação ao grupo controle obeso ($p > 0,05$).

Nos animais do grupo controle obeso, a expressão de mRNA da proteína de ligação do elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c), fator de transcrição nuclear que regula a síntese de ácidos graxos, aumentou quando comparado ao grupo controle eutrófico ($p < 0,05$; Figura 2F). O tratamento com FSE reduziu a expressão de SREBP-1c para 0,26 vezes em HFDS50 e para 0,13 vezes em HFDS100 ($p < 0,05$).

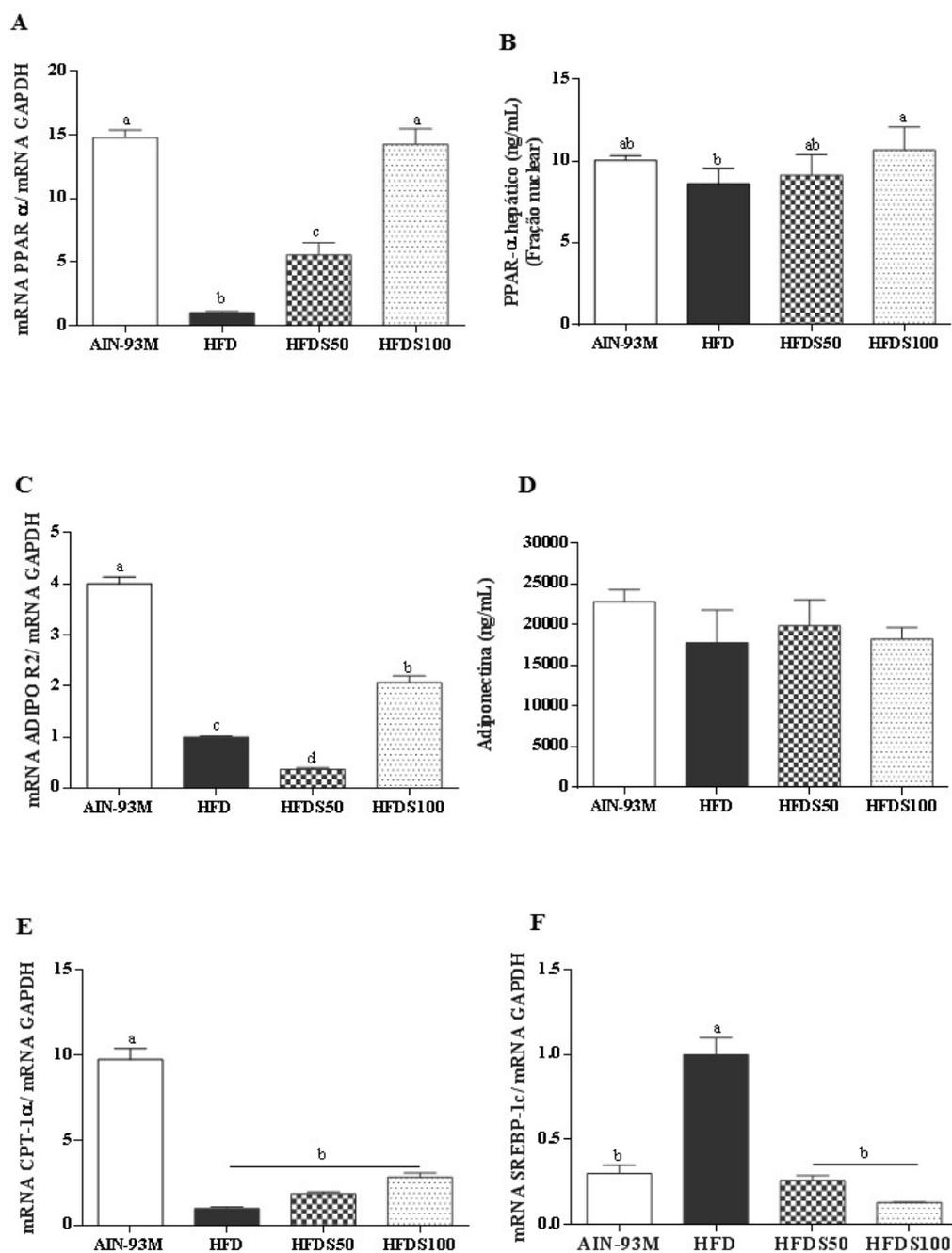


Figura 2. Níveis séricos de adiponectina (ng/mL), níveis hepáticos de PPAR- α (ng/mL) e expressão de genes envolvidos na lipólise e lipogênese hepática de ratos *Wistar* obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por oito semanas.

*Médias seguidas pela mesma letra no mesmo gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle eutrófico; HFD: grupo controle obeso; HFDS50: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; HFDS100: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica.

Efeitos da farinha de sorgo extrusado no tecido hepático

Foram observadas alterações significativas na composição do tecido hepático entre os grupos AIN-93M, HFD, HFDS50 e HFDS100 após as oito semanas de tratamento. O percentual de vesículas de gordura no grupo controle obeso foi maior que no grupo controle eutrófico e a FSE, em ambos os grupos, HFDS50 e HFDS100, foi capaz de reverter a esteatose hepática ($p < 0,05$; Figura 3E). O percentual de núcleo e citoplasma no grupo controle obeso foi menor que no grupo controle eutrófico ($p < 0,05$). O consumo de FSE aumentou o conteúdo citoplasmático nos grupos HFDS50 e HFDS100, enquanto que o percentual de núcleos aumentou apenas no grupo HFDS100 ($p < 0,05$; Figura 3E). O grupo controle eutrófico foi classificado com grau 0 de esteatose, o consumo de dieta hiperlipídica pelo grupo controle obeso aumentou a esteatose para grau 3 e o consumo de FSE em ambos os grupos, HFDS50 e HFDS100, reduziu a esteatose para grau 2 ($p < 0,05$; Figura 3A, B, C, D e F).

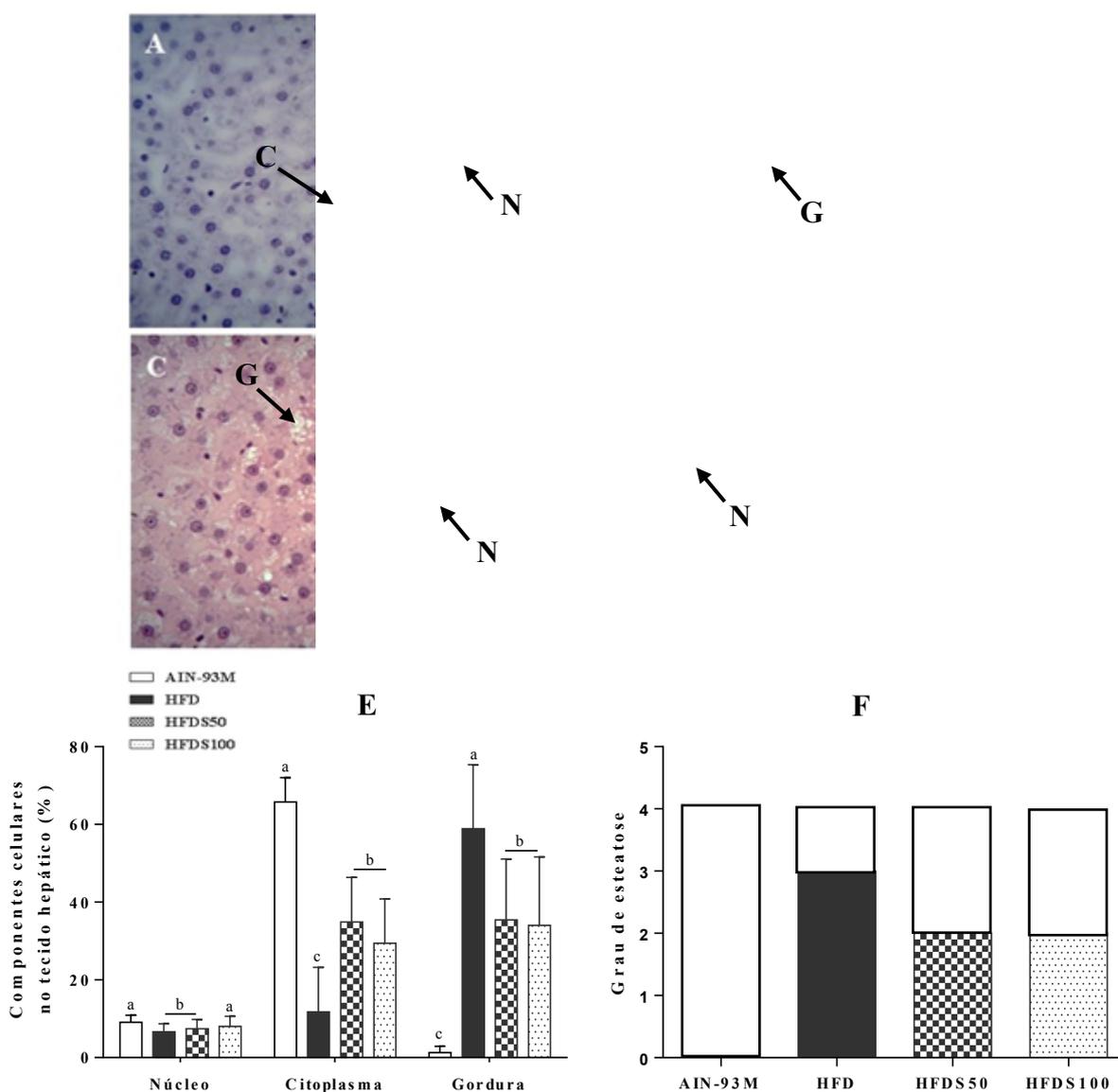


Figura 3. Fenótipo do tecido hepático (A, B, C, D), percentual dos componentes celulares (E) e grau de esteatose (F) de ratos *Wistar* obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por oito semanas.

*Médias seguidas pela mesma letra no mesmo gráfico não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

(A) Grupo controle eutrófico (AIN-93M); (B) Grupo controle obeso (HFD); (C) Grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho (HFDS50); (D) grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho (HFDS100).

N: Núcleo; G: Vesículas de gordura; C: Citoplasma. Coloração HE. Barra: 20 μ m.

Discussão

O presente estudo investigou o potencial benefício da farinha de sorgo (genótipo SC 319) extrusado na biometria e na modulação da lipogênese e lipólise hepática de ratos *Wistar* obesos alimentados com dieta hiperlipídica, devido ao seu elevado conteúdo de compostos bioativos, como as 3-deoxiantocianinas (3-DXAs), proantocianinas (taninos) e fibra alimentar presentes no sorgo SC 319 de pericarpo marrom (CARDOSO et al., 2015).

Verificou-se, neste estudo, que o consumo alimentar do grupo controle obeso foi, em geral, menor que o do grupo controle eutrófico, e isto ocorreu provavelmente em virtude da elevada densidade energética de dietas hiperlipídicas. Por outro lado, o consumo alimentar dos grupos HFDS50 e HFDS100 foi maior que o dos grupos controles eutrófico e obeso, na última semana do experimento. A maior ingestão alimentar pelos animais que consumiram FSE pode ter ocorrido em virtude da extrusão do sorgo SC 319, que reduz o grau de polimerização das proantocianinas de alta massa molecular (oligômeros e polímeros) em compostos de baixa massa molecular (monômeros e dímeros), aumentando a biodisponibilidade desses compostos, e ainda reduzindo o acentuado sabor amargo e adstringente que possuem (CARDOSO et al., 2015). Assim, é possível que houve aceitabilidade do cereal pelos animais e isso favoreceu o maior consumo alimentar.

Além disso, a maior biodisponibilidade das proantocianinas reduz a disponibilidade calórica dos alimentos ingeridos por complexar-se às proteínas e a alguns carboidratos, inibindo a digestão e a absorção desses componentes alimentares (MURIU et al., 2002; QUEIROZ et al., 2011). Portanto, menor disponibilidade calórica nas dietas contendo FSE, manteve o peso e reduziu o índice de massa corporal total (IMC) dos animais dos grupos HFDS50 e HFDS100. Os

efeitos do sorgo rico em proantocianinas no crescimento e redução de peso foram demonstrados previamente (AL-MAMARY et al., 2001; MURIU et al., 2002).

O consumo de dietas hiperlipídicas contribui para o acúmulo de gordura em tecidos, como o fígado, coração, pâncreas e músculo causando a lipotoxicidade e contribuindo para o desenvolvimento de DCNT's (LYONS; KENNEDY; ROCHE, 2016). O presente estudo demonstrou que animais que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram menor peso e índice somático do ceco, enquanto que os animais que consumiram a FSE tiveram aumento no peso e índice somático desse órgão. Por outro lado, aumentou o peso do fígado de animais que consumiram dieta hiperlipídica e reduziu nos animais que consumiram a FSE. O elevado peso do fígado de animais do grupo HFD resultou, provavelmente, do maior acúmulo de gordura encontrado nesse tecido (grau de esteatose 3). Além disso, esses animais também apresentaram menor percentual de componentes celulares, citoplasma e núcleos, em relação ao fígado de animais do grupo controle eutrófico. Em contraste, os animais que consumiram a FSE apresentaram redução do grau de esteatose para 2 refletindo na redução do peso e índice somático desse órgão, além de aumentar o percentual de núcleos e citoplasmas. Esses resultados indicam que apesar do processo apoptótico de células hepáticas observado em animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica, a FSE foi capaz de reverter a injúria hepática causada pela lipotoxicidade. Esses mesmos efeitos foram observados em estudo utilizando pão branco adicionado de compostos bioativos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (POZZO et al., 2015). Portanto, os resultados encontrados em nosso estudo são, provavelmente, em função dos compostos bioativos como taninos, antocianinas e ácidos fenólicos, além da fibra alimentar presentes no sorgo marrom extrusado, cujas atividades de redução de colesterol, TAG plasmáticos e reversão da esteatose hepática, já foram relatados (CRUZ et al., 2016; KIEFFER; MARTIN; ADAMS, 2016).

O fígado é o principal órgão para a lipogênese *de novo*, portanto, o aumento na circulação de ácidos graxos livres em virtude de uma dieta hiperlipídica, promove a ativação de SREBP-1c no fígado. A SREBP-1c é um fator de transcrição, sensível a regulação nutricional e hormonal, que controla a expressão de uma gama de enzimas necessárias para a síntese e estoque de TAG (JEON; OSBORNE, 2012). Neste estudo, os níveis de mRNA SREBP-1c, aumentaram significativamente com a exposição a uma dieta rica em gordura, indicando um processo lipogênico. A adição

de FSE em dietas hiperlipídicas, independentemente da quantidade, reduziu a expressão de mRNA SREBP-1c, e isso pode está associado com a redução efetiva da esteatose hepática nesses animais. Estes achados sugerem um papel da FSE no controle da síntese endógena de ácidos graxos, do acúmulo de lipídios e da lipotoxicidade.

Por outro lado, o PPAR- α é um regulador da expressão de genes envolvidos nas vias de β - oxidação peroxissomal e mitocondrial, além de proteínas transportadoras de ácidos graxos, como a CPT-1, importante para a oxidação de ácidos graxos e redução do acúmulo de TAG (MELLO; MATEROZZI; GALLI, 2016). Evidências científicas demonstram que ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica tendem a desenvolver hipoadiponectinemia associada a menor expressão dos receptores periféricos de adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) e portanto, redução na atividade de sensores críticos de energia como o PPAR- α e genes alvos, como a CPT-1 (YAMAUCHI et al., 2007).

Desde que a atividade do hormônio adiponectina é importante para ativação de PPAR- α , observamos neste estudo que, embora os níveis séricos desse hormônio não tenham diferido significativamente entre os grupos estudados, os animais que receberam 100% da fibra alimentar proveniente da FSE apresentaram aumento na expressão de mRNA do receptor hepático AdipoR2, além de aumento na expressão e atividade de PPAR- α , porém sem alterações na expressão de CPT-1. Por outro lado, os animais que receberam 50% da fibra alimentar proveniente da FSE apresentaram redução do receptor AdipoR2 e embora houve aumento da expressão de mRNA PPAR- α , os níveis dessa proteína permaneceram inalterados. O aumento da expressão quanto dos níveis hepáticos de PPAR- α nos animais tratados com FSE em substituição de 100% da fibra alimentar da dieta, pode ser devido aos compostos presentes no sorgo de pericarpo marrom, as 3-DXA (Luteolinidina, Apigeninidina, 7-Methoxy-apigeninidina, 5-Methoxy-luteolinidina), que foram consumidas em maior quantidade por esse grupo de animais. Estudos científicos apontam que antocianinas isoladas ou extratos ricos em antocianinas, podem se ligar diretamente ao PPAR- α e dessa forma atuar como agonistas favorecendo tanto o aumento da expressão, quanto à atividade desse receptor (SEYMOUR et al., 2008; TSUDA et al., 2003; YANG et al., 2011; JIA et al., 2013).

Os efeitos benéficos observados neste estudo após o consumo da FSE indicam que a extrusão dos grãos de sorgo do genótipo de pericarpo marrom foi eficiente em melhorar os marcadores biométricos e a esteatose hepática em virtude da regulação de fatores de transcrição da via lipogênica. A FSE contribuiu para a redução da esteatose hepática, a medida que inibiu a síntese de AG, reduzindo a expressão de SREBP-1c e possivelmente, bloqueando a produção de enzimas lipogênicas (Acetil coenzima A carboxilase – ACC; ácido graxo sintase – FAS; Esteroil coenzima A dessaturase 1 – SCD1), enquanto promoveu o aumento da β -oxidação por meio da maior sensibilização do receptor AdipoR2 e aumento de PPAR- α (Figura 4).

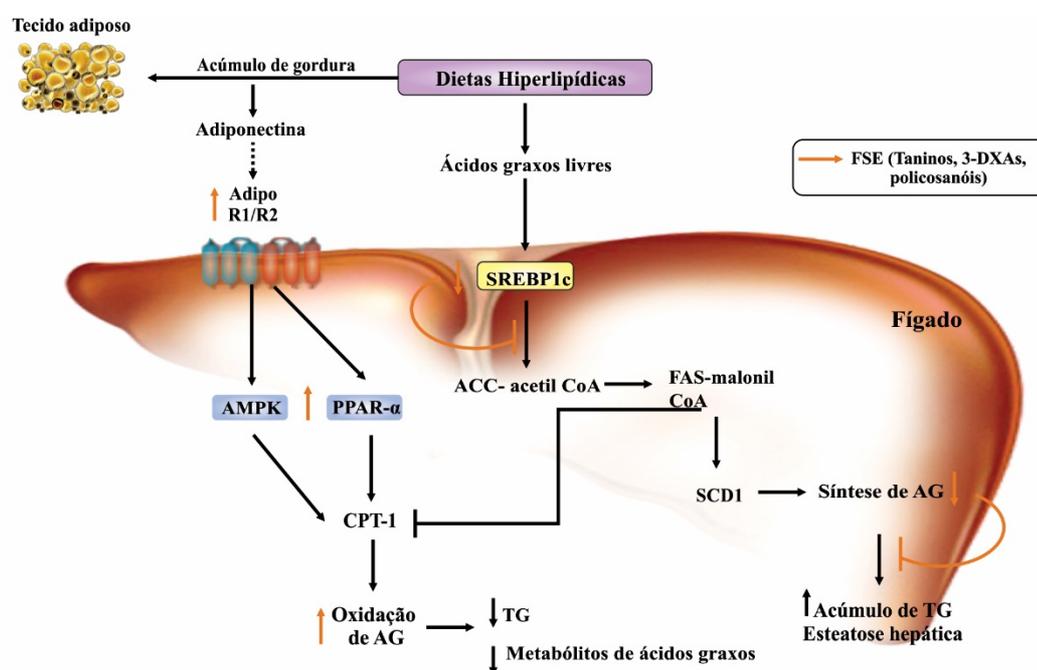


Figura 4. Potencial mecanismo de ação de compostos bioativos presentes na farinha de sorgo extrusado de pericarpo marrom na via lipogênica e lipólise de ácidos graxos no tecido hepático de ratos *Wistar* obesos.

ACC: Acetil coenzima A carboxilase; AMPK: Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; Adipo R1/R2: Receptor de adiponectina tipo 1 e 2; CPT1: Carnitina palmitoil transferase 1; FAS: Ácido graxo sintase; PPAR- α : receptor ativado por proliferador de peroxima α ; SCD1: Esteroil coenzima A dessaturase; SREBP1: Proteína ligada ao elemento regulador de esteroil 1; FSE: farinha de sorgo extrusão; 3-DXAs: 3-deoxiantocianinas

Conclusão

O consumo da FSE rica em compostos bioativos favoreceu o controle da lipogênese hepática, reduzindo o acúmulo de gordura no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Este fato contribuiu para a melhoria de medidas

biométricas de ratos Wistar obesos. Portanto, a FSE pode ser considerada um alimento com potencial funcional na prevenção da obesidade e esteatose hepática.

Referências

AL-MAMARY, M.; et al. In vivo effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. **Nutrition Research**, v. 21, p. 1393–1401, 2001.

ANUNCIACÃO, P. C.; et al. Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. **Food Chemistry**, v. 221, p. 984-989, 2017.

ARBEX, P. M. Potencial do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) na modulação do estresse oxidativo, inflamação e adiposidade em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica. **In: Dissertação** (Mestrado em Ciências da Nutrição). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, 2015.

BELOBRAJDIC, D. P.; et al. Cereal based diets modulate some markers of oxidative stress and inflammation in lean and obese Zucker rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 27, 2011

CARDOSO, L. D. M.; et al. Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven, **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 220-226, 2015.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, n. 5, p. 816–823, 2004.

CHUNG, I.-M.; et al. Antidiabetic effects of three Korean sorghum phenolic extracts in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Research International**, v. 44, p. 127-132, 2011.

CRUZ, A. B.; et al. Assessment of bioactive metabolites and hypolipidemic effect of polyphenolic-rich red cabbage extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3033-3039, 2016.

DAY, C. P.; JAMES, O., F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. **Gastroenterology**, v. 114, p. 842-845, 1998.

GOTO, T.; et al. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese–diabetic mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2012, p. 768–776, 2011.

JEON, T-I.; OSBORNE, T. F. SREBPs: Metabolic Integrators in Physiology and Metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 65-72, 2012.

JIA, Y.; et al. Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- α reducing hepatic lipid. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1831, n.4, p. 698-708, 2013.

KIEFFER, D. A.; MARTIN, R. J.; ADAMS, S. H. Impact of Dietary Fibers on Nutrient Management and Detoxification Organs: Gut, Liver, and Kidneys. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 6, p. 1111-1121, 2016.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DeltaCT Method. **Methods**, v. 25, p. 402-208, 2001.

LYONS, C. L.; KENNEDY, E. B.; ROCHE, H. M. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. **Nutrients**, v. 8, n. 5, 2016.

MELLO, T.; MATEROZZI, M., GALLI, A. PPARs and Mitochondrial Metabolism: From NAFLD to HCC. **PPAR Research**, 2016.

MURIU, J. I.; et al. Evaluation of Sorghum (*Sorghum bicolor*) as replacent for maize in the diet of growing rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 565-569, 2002.

PAIVA, C. L.; et al. Bioactive amines in sorghum: method optimisation and influence of line, tannin and hydric stress. **Food Chemistry**, v. 173, p. 224-230, 2015.

PARK, J. H.; et al. Sorghum extract exerts an anti-diabetic effect by improving insulin sensitivity via PPAR- γ in mice fed a high-fat diet. **Nutrition research and practice**, v. 6, p. 322-327, 2012.

POZZO, L.; et al. Effect of white wheat bread and white wheat bread added with bioactive compounds on hypercholesterolemic and steatotic mice fed a high fat diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 12, p. 2454-61, 2015.

QUEIROZ, V. A. V.; et al. Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) moench], para alimentação humana. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 180-195, 2011.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

SEYMOUR, E. M.; et al. Altered hyperlipidemia, hepatic steatosis, and hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in rats with intake of tart cherry. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 252-259, 2008.

SZCZEPANIAK, L. S.; et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. 462-468, 2005.

TSUDA, T.; et al. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2125-2130, 2003.

TURLIN, B.; et al. Histologic Features of the Liver in Insulin Resistance–Associated Iron Overload. A Study of 139 Patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 116, n. 2, p. 263-270, 2001.

VARGAS-SOLORZANO, J. W.; et al. Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. **Food Research International**, v. 55, p. 37-44, 2014.

YAMAUCHI, T.; et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nature Medicine**, v. 13, p. 332–339, 2007.

YAMAZAKI, T.; et al. Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddY mice. **Hepatology**, v. 46, p. 1779–1790, 2007

YANG, Y.; et al. Anthocyanin Extract from Black Rice Significantly Ameliorates Platelet Hyperactivity and Hypertriglyceridemia in Dyslipidemic Rats Induced by High Fat Diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6759–6764, 2011.

ZHOU, Y.; et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity in high-fat diet-treated mouse model through regulating PPAR- α pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 411, n. 1-2, p. 143-50, 2016.

5.2 ARTIGO 2: Farinha de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) extrusado melhora a microbiota intestinal, reduz a inflamação e o estresse oxidativo em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica

Resumo

Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito do consumo da farinha de sorgo extrusado (FSE) adicionada em uma dieta hiperlipídica na modulação da microbiota intestinal, da inflamação e do estresse oxidativo de ratos *Wistar* obesos. Ratos machos *Wistar* foram divididos em quatro grupos e alimentados com dieta de manutenção de peso (AIN-93M), dieta hiperlipídica (HFD), HFD acrescida de FSE substituindo 50% da fibra alimentar e 100% de amido de milho da dieta (HFDS50) e HFD acrescida de FSE substituindo 100% da fibra alimentar e 100% de amido de milho da dieta (HFDS100) por oito semanas. Os resultados mostraram que a FSE melhorou a composição da microbiota intestinal e reduziu a inflamação por aumentar a proporção do filo *Bacteroidetes* em razão do filo *Firmicutes*, e ainda reduzir as concentrações do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da resistina. A FSE restaurou a capacidade antioxidante total do plasma por reduzir a peroxidação de lipídios e espécies reativas e aumentar a expressão da enzima antioxidante SOD e da proteína de choque térmico HSP72. Conclui-se que a FSE proporcionou melhoria da disbiose intestinal, da inflamação e do estresse oxidativo em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

Palavras-chaves: Microbiota intestinal, Dieta hiperlipídica, Sorgo, Inflamação, Estresse oxidativo.

Introdução

A obesidade alcança proporções epidêmicas em todo o mundo e é considerada um importante marcador para várias doenças crônicas não transmissíveis (KAUR et al., 2014). São múltiplos os fatores envolvidos na gênese da obesidade, dentre eles destaca-se o sedentarismo associado a uma dieta hipercalórica, rica em gorduras saturadas e pobre em fibras alimentares (CALDER et al., 2011). Além disso, é crescente o número de evidências que demonstram o papel das dietas, especialmente relacionadas ao consumo de gorduras saturadas, afetando de maneira significativa a composição da microbiota intestinal, e esta por sua vez, no desenvolvimento de desordens metabólicas (LAM et al., 2015; ZHOU et al., 2017).

Mudanças na ecologia intestinal, especialmente relacionadas ao consumo de gorduras saturadas, podem afetar as propriedades inflamatórias e metabólicas da microbiota intestinal e, portanto, alterar a fisiologia do hospedeiro (CAESAR et al., 2015). Estudos demonstraram que aumento no número de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* em razão do filo *Bacteroidetes* geralmente é uma característica de indivíduos obesos (ISMAIL et al., 2011; CHAKRABORTI, 2015) e que, ratos livres de germes parecem estar protegidos da obesidade e da inflamação do tecido adiposo (BACKHED et al., 2007; CAESAR et al., 2012). Com isso, sugere-se que componentes microbianos possam aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, alterando a expressão de genes do hospedeiro e, portanto, induzir estado patogênico capaz de facilitar o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's) (KIM et al., 2012).

Considerando o elevado risco para as DCNT's, em especial a obesidade, estratégias nutricionais eficientes têm sido investigadas para o tratamento dessas desordens. Alimentos ricos em compostos bioativos estão sendo amplamente estudados, em virtude desses compostos serem benéficos a saúde, e cuja atividade biológica já foi comprovada (KIM et al., 2015; CHUNG et al., 2011; HAN et al., 2015). Estudos demonstram que os compostos bioativos e seus benefícios funcionais estão associados à sua atuação direta por meio da absorção (e de seus metabólitos) e indireta mediada por compostos não absorvidos que modificam a microbiota colônica e, conseqüentemente, todo o metabolismo com ações antioxidantes, anti-inflamatória, anticâncer e cardioprotetora (SHARMA et al., 2007; FLOEGEL et al., 2010; FERNANDES et al., 2014).

Nesse contexto, o sorgo (*Sorghum bicolor L.*) é uma excelente fonte de compostos bioativos, especialmente as 3-deoxiantocianinas (3-DXAs), taninos e ácido fenólicos, além das fibras alimentares, alguns minerais, lipídios insaturados, vitaminas lipossolúveis e do complexo B que garantem uma boa qualidade nutricional e uma potente ação funcional (CARDOSO et al., 2015). Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* vem demonstrado os benefícios que o sorgo e os seus compostos isolados possuem na microbiota intestinal como também, em variáveis associadas a desordens metabólicas não transmissíveis (BURDETTE, et al., 2010; MORAES et al., 2012; RITCHIE et al., 2015). No entanto, no intuito de viabilizar o consumo do sorgo por humanos e animais, alguns processamentos, como a extrusão de cereais, acabam influenciando na qualidade nutricional do mesmo, promovendo a perda de

compostos bioativos e outros nutrientes importantes (CARDOSO et al., 2015). Portanto, embora os efeitos benéficos à saúde associados ao consumo dos compostos bioativos provenientes do sorgo estejam sendo elucidados, estudos ainda são necessários para determinar os efeitos preventivos e terapêuticos do grão de sorgo na forma extrusada. Diante disso, o objetivo do presente estudo, foi avaliar os efeitos de uma farinha de sorgo de pericarpo marrom extrusado (FSE) na modulação da microbiota intestinal, no perfil inflamatório e no estresse oxidativo de animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

Materiais e Métodos

Farinha de sorgo extrusado

O genótipo de sorgo selecionado foi o SC 319, originário da Uganda de pericarpo marrom, que possui um alto conteúdo de fibra alimentar e compostos bioativos, como proantocianinas (taninos) e 3-DXAs (CARDOSO et al., 2015). As sementes do genótipo de sorgo SC 319 foram plantadas na estação de pesquisa Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Nova Porteirinha, MG, em uma latitude de 15°47'S, longitude 43°18'O e 516 m acima do nível do mar, em junho de 2011. Posteriormente, os grãos foram encaminhados para o Laboratório de Cereais (EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ) e submetidos à extrusão, segundo procedimento descrito por Vargas-Solórzano et al. (2014). Os grãos extrusados foram moídos em farinha e, em seguida, embalados em sacos de polietileno e armazenados a $-20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os dados de composição química da farinha de sorgo extrusado (FSE), incluindo carboidratos, proteínas, lipídios, fibra alimentar e compostos bioativos, foram determinados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARDOSO et al., 2015a) e esses dados foram utilizados para a elaboração das dietas experimentais.

Animais e Dietas experimentais

Ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) (60 dias de idade; $n = 32$) foram alocados em gaiolas individuais de aço inoxidável, mantidos a uma temperatura controlada de $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso à água *ad libitum*.

Inicialmente, os grupos de animais receberam as seguintes dietas: Dieta hiperlipídica (HFD) ($n = 24$) como controle obeso, baseada na composição da dieta

comercial D12079B (Research Diets®) para indução da obesidade e dieta AIN-93M (REEVES et al., 1993) ($n = 8$) como controle eutrófico durante 49 dias, correspondendo a fase I do estudo. Ao final dessa fase, os ratos ficaram em jejum durante 12 h para a coleta de amostras de sangue por punção caudal. Medidas biométricas e análises bioquímicas foram realizadas para confirmação da indução de obesidade nos animais do grupo HFD (dados não apresentados). Na fase II, o grupo AIN-93M foi mantido e os animais do grupo HFD obesos foram redistribuídos em três grupos segundo o peso corpóreo ($303,8 \text{ g} \pm 1,4$; $n = 8$ / grupo). As farinhas de grãos de sorgo do genótipo SC 319 extrusados foram adicionadas às dietas de dois desses grupos em quantidades suficientes para fornecer 50% (HFDS 50) e 100% (HFDS 100) da fibra alimentar recomendada (5g), que substituiu 100% de amido de milho das dietas (Tabela 1). Os demais ingredientes da dieta (caseína, maltodextrina, sacarose e óleo de soja) foram ajustados para fornecer dietas hiperlipídicas isocalóricas com ou sem adição de FSE. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente durante 56 dias.

Ao final da fase II de experimentação, após jejum de 12 horas, os 32 animais foram anestesiados com isoflurano 100% (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos apropriados, $16 \times 100 \text{ mm}$ (BD Vacutainer®) e centrifugados sob refrigeração por 10 minutos a $1006 \times g$, para obtenção de soro e plasma. O fígado dos animais foi retirado, pesado e imediatamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C . As fezes excretadas no dia anterior à eutanásia, foram coletadas e armazenadas a -80°C para extração do DNA fecal e análises microbiológicas pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e também, para quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Todos os procedimentos experimentais deste estudo estão de acordo com o protocolo (Nº 06/2014; data de aprovação: 25 de fevereiro/ 2015) aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Tablea 1. Composição das dietas experimentais (g·100g⁻¹).

Ingredientes	AIN-93M^A	HFD^B	HFDS50^C	HFDS100^D
Caseína	14	19,50	17,67	15,84
Maltodextrina	15,50	10	3,10	0
Amido de milho	46,57	5,32	0	0
Sacarose	10	34,10	34,10	25,04
Óleo de soja	4	1	0,66	0,32
Banha de porco	0	20	20	20
Celulose	5	5	2,5	0
Mix vitamínico	1	1	1	1
Mix mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Colesterol	0	0,15	0,15	0,15
BHT	0,0008	0,0004	0,0004	0,0004
Farinha de sorgo extrusado	nd	nd	16,86	33,72
3- DXAS total (µg)	nd	nd	16,92	33,85
Luteolinidina (µg)	nd	nd	4,45	8,90
Apigeninidina (µg)	nd	nd	2,39	4,78
5-Metoxi-luteolinidina (µg)	nd	nd	6,82	13,65
7-Metoxi-apigeninidina (µg)	nd	nd	3,27	6,54
Proantocianidinas totais (mg EC)*	nd	nd	8,20	16,41
Compostos Fenólicos totais (mg AG)**	nd	nd	0,08	0,16
Calorias (kcal):				
Carboidrato (%)	72,58	42,42	41,09	39,82
Proteína (%)	17,96	16,74	17,12	17,58
Lipídio (%)	9,47	40,85	41,79	42,61
Densidade calórica (kcal/g)	3,80	4,66	4,56	4,44

^A: dieta padrão para roedores; ^B: dieta hiperlipídica; ^C: dieta hiperlipídica com substituição em 50% de celulose e 100% do amido de milho por farinha de sorgo extrusado; ^D: dieta hiperlipídica com substituição em 100% de celulose e amido de milho por farinha de sorgo extrusado; *: equivalente de catequina; **: equivalente de ácido gálico.

nd: Não determinado

Preparação do DNA e análise da microbiota intestinal

O DNA microbiano foi extraído de amostras fecais de ratos utilizando o mini kit QIAamp DNA stool (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. A composição da microbiota intestinal foi avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR; CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad, Berkeley, California). Todas as análises foram realizadas em duplicata utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Promega) contendo em cada poço 2 µL de amostra ou padrão, oligonucleotídeos senso e anti-senso (Tabela 3) a concentrações de 300 nM e água livre de nucleases para um total de 25 µL. As condições térmicas do ciclo de PCR utilizadas foram as seguintes: uma desnaturação inicial do DNA a 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95° C durante 10 segundos, anelamento do oligonucleotídeo à 60° C

durante 20 segundos e extensão a 72° C durante 15 segundos (CASTILLO et al., 2006).

As curvas padrão foram construídas para cada experimento utilizando cinco diluições sequenciais de DNA genômico bacteriano de culturas puras (Tabela 3) variando de 20 ng a 0,032 ng. A abundância dos filos de bactérias de cada amostra fecal foram calculadas segundo o método de quantificação relativa descrito por Stevenson e Weimer (2007). As diferentes cepas utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (*Bacteroides ovatus* ATCC 8483; *Escherichia coli* ATCC 11775) e da Coleção de Culturas Tropical (*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 CCT 3744).

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos específicos para o qPCR

Grupo	Primers (S e A)	DNA genômico padrão	Referências
Bactérias totais	S- GCAGGCCTAACACATGCAAGTC A- CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Escherichia coli.</i>	Castillo et. al., 2006
Bacteriodetes	S- CATGTGGTTTAATTCGATGAT A- AGCTGACGACAACCATGCAG	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Guo et. al., 2008
Firmicutes	S-ATGTGGTTTAATTCGAAGCA A-AGCTGACGACAACCATGCAC	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Guo et. al., 2008
Proteobacteria	S- CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG A- CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	<i>Escherichia coli.</i>	Friswell et. al., 2010

S: Senso; A: Antisenso. Todos os oligonucleotídeos foram obtidos da Alpha DNA e Diagnósticos Moleculares LTDA.

Determinação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta

As amostras de fezes (300 mg: 2,5 mL de água destilada) foram centrifugadas (12 000 × g, 10 minutos) e os sobrenadantes isentos de células foram tratados como descrito por Siegfried et al. (1984). As concentrações de ácidos orgânicos (acético, propiônico e n-butírico) em amostras fecais foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um Dionex Ultimate 3000 HPLC (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) acoplado a um índice de refração (RI) Shodex RI-101 mantido a 40° C utilizando uma coluna de permuta iônica Phenomenex Rezex-ROA Organic Acid, 300 mm × 4,6 mm mantida a 45° C. A fase móvel foi preparada com 5 mM de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o fluxo foi de 0,7 mL / minuto. Os seguintes ácidos orgânicos foram utilizados para a calibração da curva padrão: ácido acético, succínico, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico, butírico e ácido láctico. Todos os ácidos foram preparados com uma concentração

final de 10 mmol / L, exceto ácido isovalérico (5 mmol / L) e ácido acético (20 mmol / L).

Citocina

As concentrações séricas de resistina (Resistin Cat. # SEA847 RA, USCN, USA) foram mensuradas utilizando kit comercial ELISA seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram adicionadas à placa de microtitulação revestida com o anticorpo primário monoclonal Anti-resistina, a qual foi incubada por 2 horas. Acrescentou em seguida o anticorpo conjugado a biotina, a enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP)-Avidina incubando por 1 hora. A reação enzima-substrato terminou com a adição de solução de ácido sulfúrico e a alteração da cor foi determinada espectrofotometricamente (Awareness®, Stat Fax 2100) a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram determinados por comparação da absorbância das amostras com a curva padrão.

Análise da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR) no fígado

O RNA total de amostras de fígado foi extraído utilizando reagente Trizol disponível comercialmente (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando um Kit de transcrição reversa M-MLV (Invitrogen Brasil Ltda.) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos *primers* estão apresentadas na Tabela 2. Os níveis de cada mRNA foram determinados com o sistema de detecção StepOne Plus real-time PCR utilizando SYBR green Fast PCR master mix da Applied Biosystems (Foster City, CA). As condições da PCR foram desnaturação a 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95° C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos, seguidos da curva padrão de dissociação. A expressão gênica foi calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como referência e foi expressa em relação ao grupo controle obeso e normalizado para o valor de 1.

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR

Gene	Senso (5' - 3')	Antisenso (5' - 3')
NF-κB	CTG CGC GCT GAC GGC	TCG TCG TCT GCC ATG TTG AA
HSP72	AGG CCA ACA AGA TCA CCA TC	TAG GAC TCG AGC GCA TTC TT
ZnSOD	GAG CAG AAG GCA AGC GGT GAA	CCA CAT TGC CCA GGT CTC
GAPDH	AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC	CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC

Todos os oligonucleotídeos foram desenhados no programa Primer 3 Plus e obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Western Blotting

O tecido hepático foi homogeneizado utilizando o *Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific Fisher) para separação das proteínas da fração nuclear e citoplasmática, de acordo com as instruções do fabricante. As quantidades conhecidas (15 µg) de proteína das amostras (fração nuclear e citoplasmática) e 5 µL do padrão de referência (Broad Range Markers – Santa Cruz Biotechnology) foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e eletrotransferidas para membrana de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) (BioRad®). As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio a 5% (Blotting-grade blocker, BioRad) e foram incubadas sob agitação *overnight* com o anticorpo primário monoclonal anti-NF-κB-p65 (65 kDa) (ab13594; Abcam, Cambridge, Reino Unido). As membranas, após sucessivas lavagens, foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) (A-9044, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) por 2 h a 4° C. As bandas foram detectadas com tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina.

Marcadores do estresse oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes e capacidade antioxidante total

O estresse oxidativo em nível hepático foi determinado em homogeneizado de fígado por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e concentrações de óxido nítrico (ON) (BUEGE; AUST, 1978; GREEN et al, 1982). A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione-s transferase (GST) foi determinada em tecido hepático segundo métodos descritos por Marklund (1985), Aebi (1984) e Habig (1974), respectivamente. As

concentrações de proteínas nos homogeneizados de fígado foram quantificadas segundo o método de Bradford (1976). A capacidade antioxidante total do plasma (CAT) foi avaliada por meio de método de imunensaio enzimático, utilizando kit específico da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA), segundo as instruções do fabricante.

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em Log10 antes das análises estatísticas paramétricas. Os dados foram expressos em médias \pm desvio padrão (DP). Análise de variância One-way (ANOVA) foi utilizada para analisar variáveis contínuas e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *post-hoc* Tukey, a um nível de significância de 5%. Correlação entre variáveis foi mensurada pela análise de regressão de Pearson, com intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Statical Package for Social Sciences (SPSS) versão 20.0 e os gráficos foram feitos com o auxílio do programa Graphpad Prism versão 6.0.

Resultados

Efeitos da farinha de sorgo extrusado sobre a microbiota intestinal e ácidos graxos de cadeia curta

O filo *Firmicutes* foi mais abundante no grupo controle obeso ($49\% \pm 10$) quando comparado ao grupo controle eutrófico ($24\% \pm 9$) ($p < 0,05$). O consumo de FSE reduziu o percentual do filo *Firmicutes* na microbiota dos animais pertencentes aos grupos HFDS50 ($20\% \pm 10$) e HFDS100 ($18\% \pm 9$) ($p < 0,05$; Fig. 1A).

A proporção do filo *Bacteroidetes* não foi diferente entre os grupos controle obeso ($24\% \pm 7$) e controle eutrófico ($22\% \pm 6$). Em contrapartida, a ocorrência do filo *Bacteroidetes* nos grupos de animais que consumiram a FSE foi superior a ambos os grupos controles ($p < 0,0001$; Fig. 1B). Não houve diferença na ocorrência de *Proteobacterias* ($p > 0,05$; Fig. 1C) e nos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) entre os grupos estudados ($p > 0,05$; Fig. 1D).

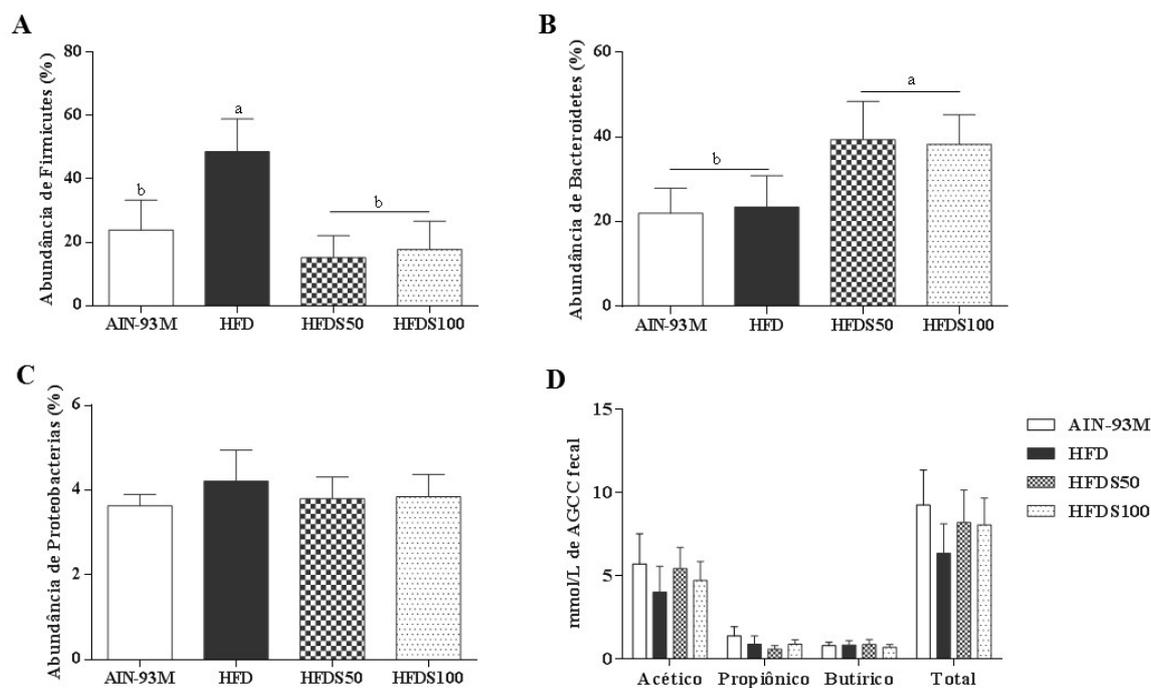


Figura 1: Percentual de filos bacterianos (A, B, C) e concentração de ácidos graxos de cadeia curta (D) de ratos *Wistar* obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por 8 semanas.

*Médias seguidas da mesma letra em um único gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* Tukey a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle eutrófico; HFD: grupo controle obeso; HFDS50: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; HFDS100: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica.

Efeitos da farinha de sorgo extrusado na modulação da via de sinalização do NF- κ B e nos níveis séricos de resistina

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), cuja ativação elicit a expressão e atividade de mediadores pró-inflamatórios, teve sua expressão aumentada no grupo controle obeso em relação ao grupo controle eutrófico ($p < 0,05$; Fig. 2A). O consumo de farinha de sorgo extrusado nos grupos obesos HFDS50 e HFDS100 promoveu redução da expressão de NF- κ B para 0,08 e 0,12 vezes, respectivamente ($p < 0,05$), e isto foi confirmado pela detecção desta proteína no fígado (Fig. 2B).

Os níveis séricos de resistina foram maiores no grupo controle obeso ($56,5 \pm 18,08$) em relação ao grupo controle eutrófico ($36,68 \pm 8,64$) ($p < 0,05$). O tratamento com a FSE (HFDS50 e HFDS100), reduziu estes níveis ($38,67 \pm 11,91$;

35,74 ± 6,60, respectivamente), tornando-se semelhantes ao grupo controle AIN-93M ($p < 0,05$; Fig. 2C).

Uma correlação significativa foi encontrada entre o percentual de Firmicutes e os níveis de resistina ($r = 0,69$; $p < 0,01$) (Fig. 2D) e com a expressão de NF- κ B ($r = 0,62$; $p = 0,014$) (Fig. 2E).

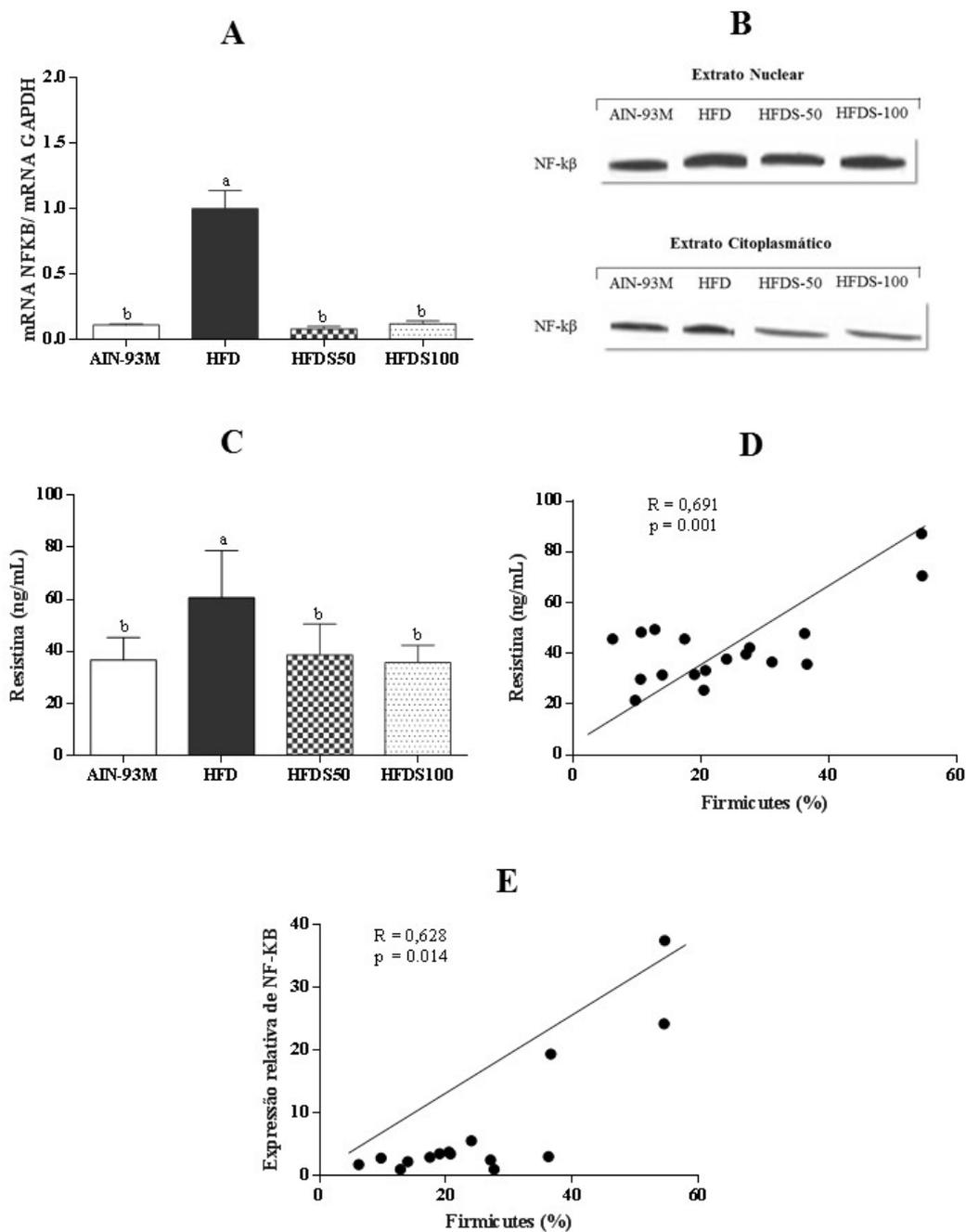


Figura 2: Expressão gênica e protéica de NF- κ B (A, B), níveis da proteína resistina (C) e correlações desses marcadores inflamatórios com a abundância do filo Firmicutes (D, E) de ratos *Wistar* obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por 8 semanas.

*Médias seguidas da mesma letra em um único gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* Tukey a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle eutrófico; HFD: grupo controle obeso; HFDS50: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; HFDS100: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica.

Efeitos da farinha de sorgo extrusado sobre os marcadores do estresse oxidativo:

O desequilíbrio entre a produção e eliminação de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, promovem a oxidação de biomoléculas com a consequente perda de função biológica. Para avaliar a presença de produtos provenientes da peroxidação de lipídios foram determinados os níveis de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (ON) no fígado. Os ratos *Wistar* obesos do grupo HFD apresentaram maiores níveis de MDA e ON quando comparados ao grupo controle eutrófico ($p < 0,0001$; Fig. 3A e 3B). O consumo de FSE reverteu os efeitos da dieta HFD reduzindo os níveis dos marcadores de peroxidação lipídica MDA e ON nos grupos HFDS50 e HFDS100, equiparando-os ao grupo controle eutrófico ($p < 0,05$).

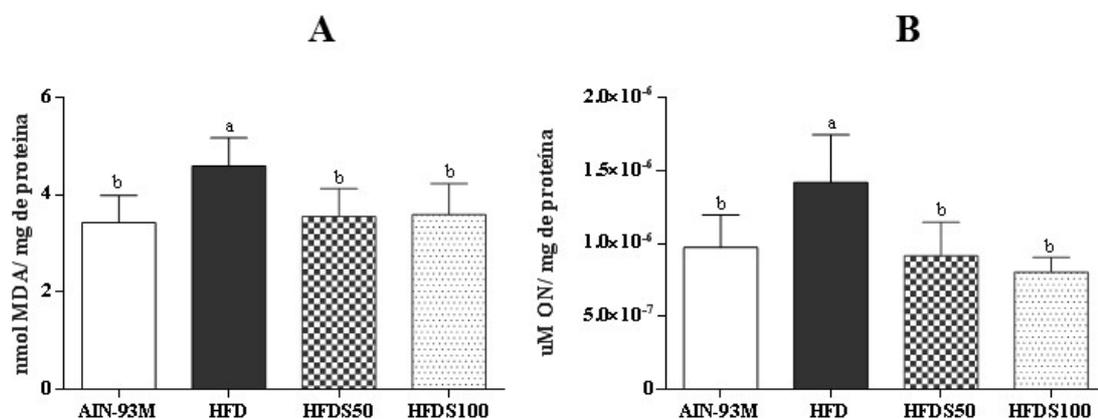


Figura 3: Marcadores de estresse oxidativo (A, B) de ratos *Wistar* obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por 8 semanas.

*Médias seguidas da mesma letra em um único gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* Tukey a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle eutrófico; HFD: grupo controle obeso; HFDS50: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; HFDS100: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; MDA: Malondialdeído; ON: Óxido Nítrico.

Efeitos da farinha de sorgo extrusado na atividade antioxidante

A expressão da enzima antioxidante Zn-SOD no grupo controle obeso não diferiu do grupo controle eutrófico (AIN-93-M). Porém, o consumo de FSE

proporcionou aumento na expressão de Zn-SOD em 13,59 e 5,61 vezes nos grupos HFDS50 e HFDS100, respectivamente, em relação ao grupo controle obeso ($p < 0,05$; Fig 4A). No entanto, as enzimas SOD e Catalase apresentaram maior atividade hepática nos animais do grupo HFD, enquanto que o consumo de FSE promoveu redução na atividade dessas enzimas tanto no grupo HFDS50 quanto no HFDS100, equiparando-os ao grupo controle eutrófico (Fig. 4B e 4C). A atividade da GS-T não diferiu significativamente entre os grupos (Fig. 4D).

A expressão de HSP72 no fígado, uma proteína de choque térmico com ação anti-inflamatória, que atua no reparo ou degradação de proteínas, reduziu no grupo controle obeso em comparação com o grupo controle eutrófico ($p < 0,05$). O consumo de FSE aumentou a expressão de HSP72 para 1,19 vezes e 12,19 vezes nos grupos HFDS50 e HFDS100, respectivamente, no entanto, o aumento foi significativo apenas em HFDS100 ($p < 0,05$) (Fig. 4E).

A capacidade antioxidante total (CAT) no plasma dos animais obesos foi menor comparado aos animais do grupo AIN-93M ($p < 0,05$), porém, o consumo de FSE, por ambos os grupos, HFDS50 e HFDS100 aumentou a CAT ($p < 0,05$; Fig. 4F).

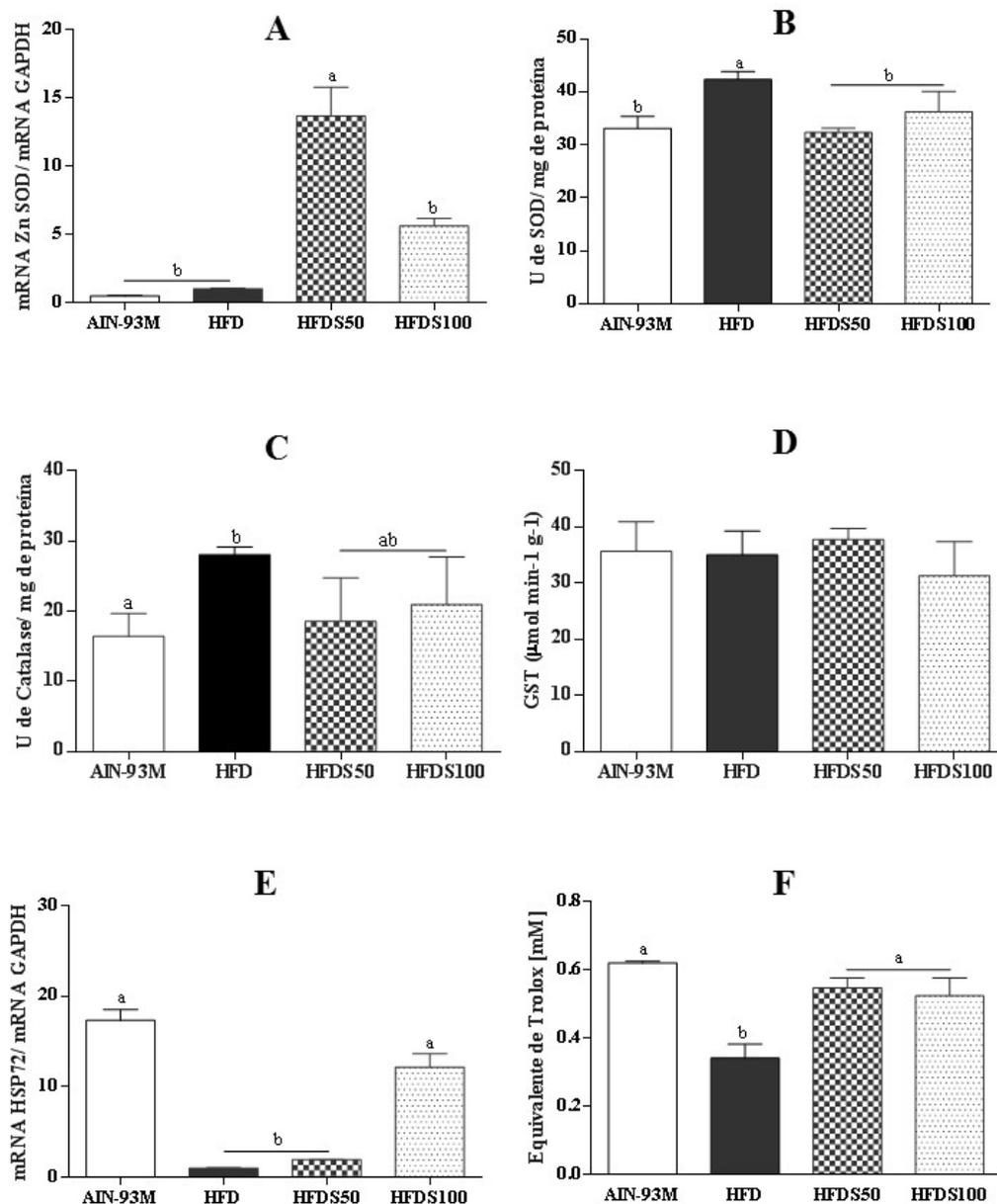


Figura 4: Expressão gênica de antioxidantes endógenos (A, E), atividade de enzimas antioxidantes (B, C, D) e capacidade antioxidante total (F) de ratos *Wistar* obesos alimentados com farinha de sorgo extrusado adicionado em dieta hiperlipídica por 8 semanas.

*Médias seguidas da mesma letra em um único gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* Tukey a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle eutrófico; HFD: grupo controle obeso; HFDS50: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 50% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; HFDS100: grupo teste com farinha de sorgo extrusado substituindo 100% de celulose e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica; SOD: Superóxido Dismutase; GST: Glutathione S-Transferase; HSP72: proteína de choque térmico 72; CAT: Capacidade antioxidante total

Discussão

O sorgo extrusado de pericarpo marrom é um cereal rico em fibras alimentares e uma excelente fonte de compostos bioativos como, as 3-deoxiantocianinas, taninos e ácidos fenólicos (CARDOSO et al., 2015). Diante disso, a proposta deste estudo foi investigar o impacto da farinha deste sorgo (genótipo SC 319) extrusado na modulação da microbiota intestinal, na inflamação e no estresse oxidativo de ratos *Wistar* obesos alimentados com uma dieta hiperlipídica.

As populações microbianas intestinais agrupadas por filos, que foram analisadas neste estudo, demonstraram um aumento na razão de *Bacteroidetes* para *Firmicutes* nos animais obesos alimentados com a farinha de sorgo extrusado (FSE). Embora não haja consenso na literatura acerca do perfil de filos, gêneros e espécies de bactérias na microbiota de indivíduos obesos e eutróficos, a disbiose intestinal na obesidade tem sido amplamente correlacionada com o aumento do filo *Firmicutes* em razão de *Bacteroidetes* e além disso, essa razão associa-se a consideráveis distúrbios metabólicos (LEY et al., 2006; HILDEBRANDT et al., 2009; ISMAIL et al., 2011). Por outro lado, a maior razão de *Bacteroidetes* para *Firmicutes* é apontada por regular o balanço energético e reduzir a adiposidade (BERVOETS et al., 2013; WOTING et al., 2014). Estes achados, portanto, sugerem o papel da FSE na modulação da composição e atividade metabólica da microbiota do intestino, que por sua vez pode afetar positivamente a saúde.

Os resultados de pesquisas demonstram que fibras alimentares são capazes de induzir o equilíbrio microbiano e contribuir para a manutenção da saúde intestinal (GIBSON et al., 2004). Além das fibras, outros componentes alimentares, tais como os polifenóis, também contribuem para o equilíbrio intestinal por promover o crescimento de bactérias benéficas e inibir bactérias patogênicas (CARDONA, et al., 2013; CLEMENTE, et al., 2012; SHEN et al., 2014). A maior parte de polifenóis, como taninos, antocianinas e ácidos fenólicos presentes na FSE, em virtude da ausência de enzimas digestivas que os degradem, passam inalterados para o intestino grosso onde são catabolizados pela microbiota do cólon, afetando a composição, a diversidade e os produtos metabólicos das bactérias como, os AGCC (SELMA, et al., 2009; HOLE, et al., 2012; RITCHIE et al., 2015). Embora não tenha sido observado, neste estudo, diferenças nas concentrações de AGCC nas fezes, vale ressaltar que a absorção desses metabólitos no ceco e cólon é um processo muito eficiente, sendo

que apenas 5 a 10% (19 – 50 mmolL) são excretados nas fezes e o restante utilizado pelos colonócitos, tecido hepático e muscular (ROEDIGER; MOORE, 1981). Outros estudos que avaliaram a produção de AGCC em material cecal encontraram maior produção desses metabólitos após o consumo de fibra alimentar, taninos e outros compostos fenólicos (FREJNAGEL; JUSKIEWICZ, 2011; FOTSCHK et al., 2015; GOVERSE et al., 2017).

Neste estudo, os animais do grupo obeso, apresentaram aumento dos marcadores inflamatórios, NF- κ B e resistina, e ambos foram positivamente associados com o filo *Firmicutes*. Esses resultados eram esperados uma vez que, o aumento de *Firmicutes* associa-se à disbiose intestinal em obesos e esta, por sua vez, com o aumento da permeabilidade intestinal (KIM, K. et al., 2012). O aumento no influxo de endotoxinas (lipopolissacarídeos, flagelinas, peptidoglicanos), em virtude da maior permeabilidade intestinal, favorece a ativação da via de sinalização inflamatória do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), o qual induz a expressão e a secreção de diversas citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), resistina, interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e outros, responsáveis por aumento do estado inflamatório e estresse oxidativo (CAESAR et al., 2015; SAAD; SANTOS; PRADA, 2016).

Por outro lado, os animais obesos que consumiram a FSE apresentaram redução da expressão e níveis protéicos de NF- κ B, bem como menores níveis séricos de resistina. Esses resultados podem ser atribuídos aos efeitos dos compostos fenólicos encontrados na FSE, em especial, às antocianinas, capazes de inibir a ativação de NF- κ B e conseqüentemente a produção e liberação de citocinas inflamatórias e moléculas oxidantes, como já demonstrado anteriormente (RAHMAN et al., 2006; BURDETT et al., 2010; ZHANG et al., 2010; DOMITROVIC, 2011).

As moléculas oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (ERO), causam danos ao DNA, oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios, necrose e apoptose celular (STAMLER et al., 1997). Os animais obesos que consumiram a FSE apresentaram menores concentrações hepáticas de ERO's como o óxido nítrico (ON) e de produtos da peroxidação de lipídios, como o malondialdeído, quando comparados aos animais do grupo controle obeso. Estudos anteriores demonstram a associação entre compostos fenólicos do sorgo e capacidade antioxidante, sugerindo que esse efeito se deve a presença de ácidos fenólicos capazes de inibir a via de

ativação do NF- κ B e conseqüentemente, a produção de iNOS e ON, como dito anteriormente (KIM, E. et al., 2012; LOPEZ et al., 2016). Embora o procedimento de extrusão promova uma variação na composição de compostos fenólicos, com significativa redução de flavona, flavanonas e 3-DXAs no sorgo de pericarpo marrom investigado neste estudo, já foi demonstrado que a extrusão não afeta a capacidade antioxidante desse genótipo (CARDOSO et al., 2015a; LOPEZ et al., 2016). O processamento por extrusão parece aumentar a retenção de proantocianidinas de baixo peso molecular (monômeros e dímeros), favorecendo a maior biodisponibilidade desses compostos e, portanto, maior eficácia contra o estresse oxidativo (CARDOSO et al., 2015a).

O consumo de compostos fenólicos pelos animais que consumiram a FSE refletiu na maior capacidade antioxidante total (CAT) no plasma, bem como, apresentaram maior expressão gênica da enzima SOD (antioxidante endógeno) e da proteína de choque térmico HSP72 (no grupo HFDS100), chaperona celular que atua no reparo ou degradação de proteínas prejudicadas (KIANG; TSOKOS, 1998). No entanto, as atividades de enzimas antioxidantes hepáticas reduziram (SOD) ou não foram diferentes (Catalase e GS-T) nos animais que consumiram FSE comparados aos animais do grupo controle obeso. Desde que os polifenólicos do sorgo são capazes de eliminar ERO's por promover aumento das enzimas antioxidantes endógenas ou por atuarem diretamente na detoxificação de radicais oxidantes (KHAN et al., 2015; AJIBOYE et al., 2016; LOPEZ et al., 2016), sugere-se que, no nosso estudo, houve uma importante contribuição dos antioxidantes não enzimáticos presentes na FSE, que juntamente com a fibra alimentar funcionaram diretamente como *scavengers* de radicais, promovendo o reequilíbrio redox celular de animais obesos.

Os efeitos benéficos observados neste estudo após o consumo da FSE indicam que a extrusão dos grãos de sorgo do genótipo de pericarpo marrom foi eficiente em melhorar a disbiose intestinal, o perfil inflamatório e o estado antioxidante associados com a obesidade. No entanto, em virtude da complexidade da microbiota intestinal, esse estudo aponta a necessidade de outros ensaios avaliarem as alterações na comunidade microbiana após o consumo de FSE, em um espectro mais amplo, a nível de gêneros e espécies de bactérias e associá-las com outros parâmetros relacionados à obesidade.

Conclusão

O consumo da FSE melhorou a disbiose intestinal por aumentar a razão *Bacteroidetes/Firmicutes* em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Isso foi acompanhado por redução de marcadores inflamatórios como o fator de transcrição NF- κ B e da proteína resistina. Além disso, a FSE reduziu o estresse oxidativo por inibir a produção de espécies reativas e contribuir para uma maior capacidade antioxidante total. Portanto, esse estudo indica o potencial efeito protetor dos compostos bioativos presentes na FSE obtida do genótipo de sorgo extrusado de pericarpo marrom, para melhorar a disbiose intestinal, o perfil inflamatório e o estado antioxidante na obesidade (Figura 5).

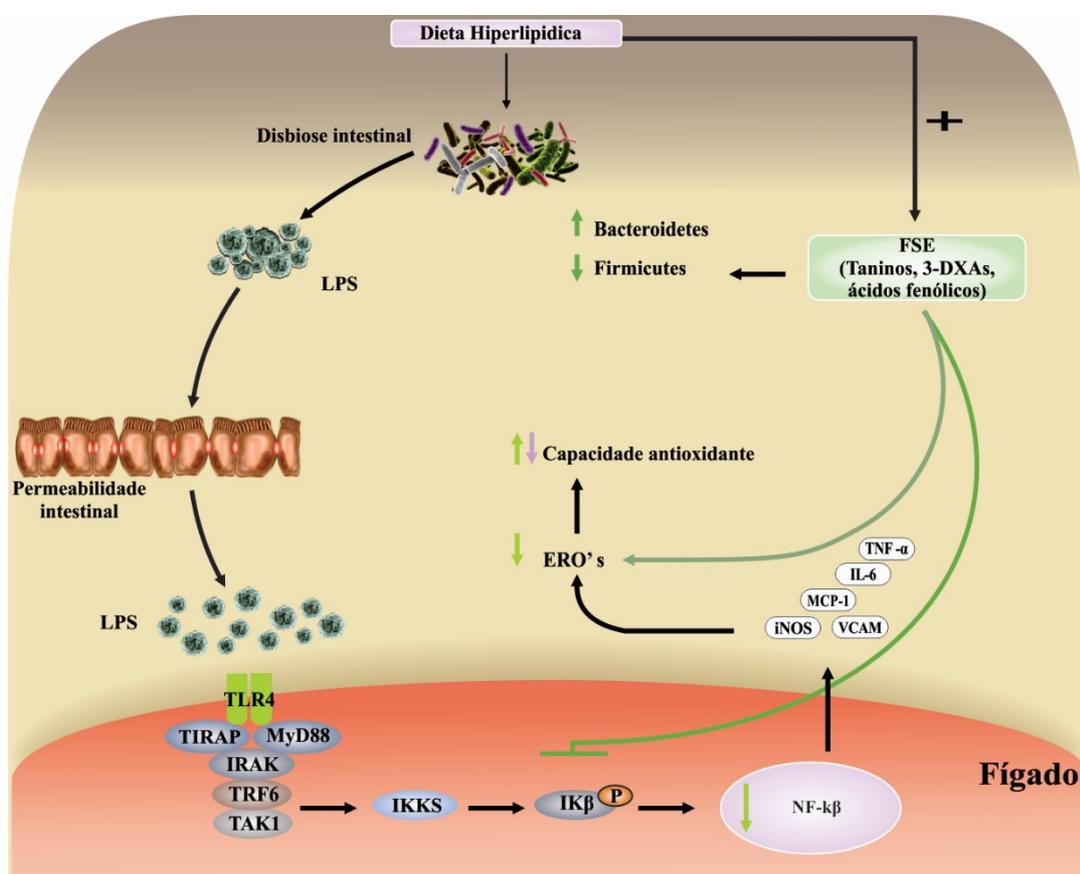


Figura 5. Atuação das gorduras saturadas e dos compostos bioativos da FSE na modulação da microbiota intestinal, da inflamação e do estresse oxidativo.

LPS: lipopolissacarídeos; TLR4: receptor tipo *toll* 4; NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B; iNOS: óxido nítrico sintase indutível; VCAM: molécula de adesão vascular; MCP-1: proteína atrativa de monócitos; IL-6: Interleucina 6; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; ERO's: espécies reativas de oxigênio; FSE: farinha de sorgo extrusado; 3-DXAs: 3-deoxiantocianinas

→ Efeito da farinha de sorgo extrusado

→ Efeito da dieta hiperlipídica

Referências

AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 105, p. 121–126, 1984.

AJIBOYE, T. O.; et al. A fermented sorghum/millet-based beverage, Obiolor, extenuates high-fat diet-induced dyslipidaemia and redox imbalance in the livers of rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 791-797, 2016.

BACKHED, F.; et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 104, n. 3, p. 979–984, 2007.

BERVOETS, L.; et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 10, 2013.

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n. 1-2, p. 248, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURDETTE, A.; et al. Anti-inflammatory activity of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 879-887, 2010.

CAESAR, R.; et al. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 658–668, 2015.

CAESAR, R.; et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v. 61, n. 12, p.1701–1707, 2012.

CALDER, P. C.; et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106 (Suppl 3), p. S5–S78, 2011.

CARDONA, F.; et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415-1422, 2013.

CARDOSO, L. M.; et al. Effects of processing with dry heat and wet heat on the antioxidant profile of sorghum. **Food Chemistry**, v. 152, p. 210-217, 2014.

CARDOSO, L. M.; et al. Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 220-226, 2015a.

CARDOSO, L. M.; et al. Sorghum (*sorghum bicolor* L.): Nutrients, Bioactive Compounds, and Potential Impact on Human Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 372-390, 2015b.

CASTILLO, M.; et al. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 1-2, p. 165-170, 2006.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110–119, 2015.

CLEMENTE, J. C.; et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

DOMITROVIC, R. The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. **Current Medicinal Chemistry Journal**, v. 18, n. 29, p. 4454-4469, 2011.

ETXEBERRIA, U.; et al. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9517– 9533, 2013.

FERNANDES, I.; et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 54–66, 2014.

FLOEGEL, A. et al. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 600-623, 2010.

FOTSCHKI, B.; et al. Ellagitannins and Flavan-3-ols from Raspberry Pomace Modulate Caecal Fermentation Processes and Plasma Lipid Parameters in Rats. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22848-22862, 2015.

FREJNAGEL, S.; JUSKIEWICZ, J. Dose-dependent effects of polyphenolic extracts from green tea, blue-berried honeysuckle, and chokeberry on rat caecal fermentation processes. **Planta Medica**, v. 77, n. 9, p. 888-93, 2011.

FRISWELL, M. K., et al. Site and strain- specific variation in gut microbiota profiles and metabolism in experimental mice. **PLoS One** v. 5, p. 8584, 2010.

GIBSON, G. R.; et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Review**, v. 17, p. 259–275, 2004.

GOVERSE, G.; et al. Diet-Derived Short Chain Fatty Acids Stimulate Intestinal Epithelial Cells To Induce Mucosal Tolerogenic Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 3, 2017.

GREEN, L. C.; et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUO, X., et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 367-373, 2008.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HAN, S.; et al. Dietary fiber prevents obesity-related liver lipotoxicity by modulating sterol-regulatory element binding protein pathway in C57BL/6J mice fed a high-fat/cholesterol diet. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5, p. 15256, 2015.

HILDEBRANDT, M. A.; et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1716–1724, 2009.

HOLE, A. S.; et al. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 25, p. 6369-6375, 2012.

ISMAIL, N. A.; et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science**, v. 3, n. 3, p. 501–507, 2011.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiology Research and Practice**, 2014.

KHAN, I.; et al. Acute effect of sorghum flour-containing pasta on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and oxidative stress markers in healthy subjects: A randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 415–421, 2015.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 2 p. 183-201, 1998.

KIM, E. O.; et al. Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharidestimulated Raw 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1309–1316, 2012.

KIM, E.; KIM, S.; PARK, Y. – Early online 1-6 - Sorghum extract exerts cholesterol-lowering effects through the regulation of hepatic cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 3, p. 308-313, 2015.

KIM, K. A.; et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PloS One**, v. 7, n 10, e47713, 2012.

LAM, Y. Y.; et al. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. **Obesity** (Silver Spring), v. 23, n. 7, p. 1429-39, 2015.

LEY, R. E.; PETERSON; D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837-848, 2006.

LOPEZ, N. J. S.; et al. The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p. 243-247, 1985.

MORAES, É. A.; et al. Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 553-559, 2012.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemistry Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 1439-1452, 2006.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n.11, p. 1939-1951, 1993.

RITCHIE, L. E.; et al. Polyphenol-rich sorghum brans alter colon microbiota and impact species diversity and species richness after multiple bouts of dextran sodium sulfate-induced colitis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 3, 2015

RODIGER, W. E.; MOORE, A. Effect of short-chain fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 26, n. 2, p. 100-106, 1981.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. **Physiology**, v. 31, p. 283–293, 2016.

SELMA, M. A. V.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6485-6501, 2009.

SHARMA, S. D., MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 995-1005, 2007.

SHEN, R. L. et al. Sorghum resistant starch reduces adiposity in high-fat diet-induced overweight and obese rats via mechanisms involving adipokines and intestinal flora. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, n. 1, p. 120-130, 2014.

SIEGFRIED, B. R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, n. 6, p. 298–304, 1984.

STAMLER, J. S.; et al. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron**, v. 18, p. 691–696, 1997.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 165–174, 2007.

TURNBAUGH, P. J.; et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 6, p. 6ra14, 2009.

VARGAS-SOLORZANO, J. W.; et al. Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. **Food Research International**, v. 55, p. 37-44, 2014.

WOTING, A.; et al. Clostridium ramosum promotes high-fat diet-induced obesity in gnotobiotic mouse models. **Mbio**, v. 5, n. 5, p. 1530-1514, 2014.

ZHANG, Y.; et al. Cyanidin-3-O-beta-glucoside inhibits LPS-induced expression of inflammatory mediators through decreasing IkappaB alpha phosphorylation in THP-1 cells. **Inflammation Research**, v. 59, n. 9, p. 723-730, 2010.

ZHOU, D. et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 60-75, 2017.

6. CONCLUSÃO GERAL

O consumo da FSE (genótipo de sorgo SC 319) substituindo 50% e 100% da fibra alimentar e 100% de amido de milho em uma dieta hiperlipídica contribuiu para a melhoria da esteatose hepática e das medidas biométricas de ratos obesos, por induzir a expressão de marcadores do processo de oxidação de ácidos graxos, como o PPAR- α e o receptor AdipoR2, associado a redução de fatores de transcrição de genes lipogênicos, como SREBP-1c.

Além disso, a FSE também proporcionou a melhora da disbiose intestinal por aumentar a razão *Bacteroidetes/Firmicutes* em animais alimentados com dieta hiperlipídica, acompanhado por redução de marcadores inflamatórios como o fator de transcrição NF- κ B e da proteína resistina. Associado a isso, a FSE reduziu o estresse oxidativo por inibir a produção de espécies reativas e contribuiu para uma maior capacidade antioxidante total.

Portanto, esse estudo indica que o consumo da FSE e seus compostos bioativos apresentou um potencial benéfico à saúde, sugerindo que pode ser utilizada como um alimento funcional na prevenção da obesidade e outras comorbidades.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio dos resultados obtidos, o consumo de farinha de sorgo extrusado pode ser recomendado na proporção de 280 mg a 570 mg/ kg de peso, sendo que o consumo de maior quantidade de sorgo (570 mg/kg de peso) apresentou efeito biológico mais significativo na promoção de alterações metabólicas em animais obesos.

Como uma limitação desse estudo, nós podemos mencionar que o efeito do consumo da farinha de sorgo extrusado na composição da microbiota intestinal, limitou-se a determinar apenas alguns dos principais filos de bactérias, e em virtude da variedade do ecossistema intestinal não foi possível obter resultados mais contundentes. Assim, a realização de novas análises, como a determinação da microbiota intestinal com foco em gêneros e espécies de bactérias relacionando-as com outros parâmetros da obesidade, além de análise das proteínas de junção do intestino e fatores microbianos, como o LPS, podem ser interessantes no intuito de complementar os resultados encontrados nesse estudo, a partir do consumo de farinha de sorgo extrusado.

ANEXO

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 06/2014, intitulado “Potencial do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em ratos com síndrome metabólica”, coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 25/02/2015, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 06/2014, named “Potential of sorghum (*Sorghum Bicolor* L.) in the modulation of oxidative stress and inflammation in rats with metabolic syndrome”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 25, 2014 valid for 12 months.


Prof. Cláudio César Fonseca

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV