

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

ELLEN KAYUMI MARIANO SAWAZAKI

**EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE
FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O
METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS WISTAR MACHOS**

FRANCISCO BELTRÃO – PR

ABRIL, 2020

ELLEN KAYUMI MARIANO SAWAZAKI

**EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE
FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O
METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS WISTAR MACHOS**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador(a): Dra. Luciana Bill Mikito Kottwitz

Coorientador(a): Dra. Sabrina Grassioli

FRANCISCO BELTRÃO – PR

ABRIL, 2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Sawazaki, Ellen Kayumi Mariano

Efeitos positivos da suplementação com farinha de folha de batata-doce biofortificada sobre o metabolismo, adiposidade e estresse oxidativo em ratos Wistar machos / Ellen Kayumi Mariano Sawazaki; orientador(a), Luciana Bill Mikito Kottwitz; coorientador(a), Sabrina Grassioli, 2020. 110 f.

Dissertação (mestrado profissional), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2020.

1. Batata-doce biofortificada. 2. Antioxidantes. 3. Carotenoides. 4. Gordura visceral. I. Kottwitz, Luciana Bill Mikito. II. Grassioli, Sabrina. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELLEN KAYUMI MARIANO SAWAZAKI

**EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE
FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O
METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS WISTAR MACHOS**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Prof (a). Dra. Luciana Bill Mikito Kottwitz

UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). João Paulo de A. Amorim

UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). Silvia Renata M. Coelho

UNIOESTE

FRANCISCO BELTRÃO, PR

ABRIL,2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço grandemente à minha família, que me apoiou desde o início do curso, até sua conclusão, me acolheram e me proporcionaram conforto físico, psicológico e financeiro para que este projeto se tornasse possível. Ao meu ex-marido, Ademar, que me incentivou a iniciar este projeto e me deu forças, mesmo após obstáculos que o motivassem o contrário.

Agradeço minha orientadora Luciana por me orientar em todos os processos da pesquisa, e se fazer presente com sua experiência, dedicação e paciência, demonstrando amor pela profissão escolhida. Também à minha co-orientadora Sabrina, que sempre esteve solícita, contribuiu e foi determinante para conclusão deste trabalho.

Sou grata pelos profissionais que fizeram parte desta caminhada e que foram essenciais em cada passo: Sandra, Diane, Suzana, Leonardo, Rafael, Bruna, Fernanda, Milara, Matheus e Fabio.

Agradeço à administração e equipe de nutrição do Hospital Municipal Padre Germano Lauck de Foz do Iguaçu, que tornou possível a realização deste projeto, possibilitando minha ausência em determinados períodos, imprescindível para a conclusão deste.

Sinto-me lisonjeada por fazer parte do corpo discente do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde desta instituição que, possibilitou à esta realização profissional tão almejada, e que sinto tanto orgulho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplos de flavonóides mais comumente encontrados.A: catequinas e B: antocianinas.....	26
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Comparação dos teores minerais, proteico, lipídico e calórico fornecidos pelo consumo de 100 g da folha de batata-doce em relação ao consumo de 100 g de folhas secas de mandioca, feijão preto cozido e feijão preto cru.....16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AOX – Depleção de Antioxidantes
- BDPA – Batata doce de Polpa Alaranjada
- CAT- Capacidade antioxidante total
- CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular média
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DCNT – Doenças Crônicas Não-transmissíveis
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
- ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
- HB - Hemoglobina
- HCM - Hemoglobina corpuscular média
- HDL – *High Density Lipoprotein* – Lipoproteína de Alta Densidade
- HTC – Hematócrito
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IG- Índice Glicêmico
- LDL - *Low Density Lipoproteins* – Lipoproteína de Baixa Densidade
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- VCM- Volume corpuscular médio
- OMS - Organização Mundial da saúde
- RBC – Red Blood Cells células vermelhas do sangue
- RDW - Red Cell Distribution Width - Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
- WBC – White Blood Cells - células brancas do sangue

EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR MACHOS

A Batata-Doce de Polpa Alaranjada – BDPA, refere-se a uma das culturas alimentares obtidas pela biofortificação. O estudo da folhas da BDPA pode portanto, ampliar a utilização deste e fornecer novos elementos com valores nutricionais agregado para promoção da saúde. No presente estudo foi avaliado o efeito da suplementação da farinha obtida da folha da BDPA sobre a adiposidade e condições metabólicas de ratos Wistar. A pesquisa tem caráter experimental básica sendo realizada com ratos Wistar (n=20) divididos em Grupo Suplementado (n=10) o qual recebeu via gavagem 2g de farinha de BDPA em 2mL de água, administrada durante 6 semanas. Ratos não suplementados receberam mesmo volume de água sem a farinha. Aos 69 dias de vida e após 12h de jejum foram pesados, mensurados o comprimento naso anal para cálculo do índice de Lee e coletados sangue total para análise de: glicose, hemograma, perfil lipídico e capacidade antioxidante total (CAT). Foi realizada histologia do tecido adiposo e hepático. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Teste T de Students para normalidade na distribuição. $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Como resultados principais, obteve-se um menor peso e menor volume adipocitário na gordura visceral e houve redução em VLDL-colesterol no Grupo Suplementado. Pode-se concluir que as folhas de BDPA possuem propriedades anti-inflamatórias, expressa na redução no perfil lipídico e redução do acúmulo de gordura nos adipócitos. Estes efeitos correlacionam-se com o combate aos radicais livres e prevenção de danos relacionados ao estresse oxidativo, como as DCNT.

Palavras-chave: batata-doce biofortificada, antioxidantes, carotenoides, gordura visceral, doenças crônicas não-transmissíveis.

POSITIVE EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH BIOFORTIFIED SWEET POTATO FLOUR ON METABOLISM, ADIPOSITY AND OXIDATIVE STRESS IN WISTAR MACHOS RATS

Orange-fleshed Sweet Potato - OFSP, refers to one of the food crops obtained by biofortification. The study of the OFSP leaves can therefore expand its use and provide new elements with additional nutritional values for health promotion. The present study evaluated the effect of supplementing the flour obtained from the OFSP leaf on the adiposity and metabolic conditions of Wistar rats. The research has a basic experimental character, being performed with Wistar rats (n = 20) divided into Supplemented Group (n = 10), which received 2g of OFSP flour in 2mL of water via gavage, administered during 6 weeks. Unsupplemented rats received the same volume of water without the flour. At 69 days old and after 12 hours of fasting, the rats were weighed, measured the naso-anal length to calculate the Lee index and collected whole blood for analysis of: glucose, blood count, lipid profile and total antioxidant capacity TAC. The histology of the adipose and hepatic tissue was performed. The data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Student's t-test for normal distribution. P <0.05 were considered statistically significant. As main results, lower weight and lower adipocyte volume were obtained in visceral fat and there was a reduction in VLDL-cholesterol in the Supplemented Group. It can be concluded that the OFSP leaves have anti-inflammatory properties, expressed in the reduction in the lipid profile and reduction of the accumulation of fat in the adipocytes. These effects correlate with combating free radicals and preventing damage related to oxidative stress, such as NCDs.

Keywords: biofortified sweet potatoes, antioxidants, carotenoids, visceral fat, chronic non-communicable diseases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 BDPA e biofortificação	17
1.2 A aplicabilidade das folhas de BDPA e fatores nutricionais	19
1.3 Compostos bioativos.....	21
1.4 Dislipidemias	27
1.5 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante	28
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Análise estatística	35
4 REFERÊNCIAS.....	36
5 EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR MACHOS	42
1 Introdução.....	45
2 Material e Métodos.....	48
2.1 Animais	48
2.2 Coleta de órgãos e análises histológicas	50
2.3 Análise estatística	52
3 Resultados	52
4 Discussão	54
5 Referências	61
6 Apêndices	65
ANEXO 1. – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE	69

ANEXO 2. REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA NUTRITION RESEARCH	70
ANEXO 3. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA NUTRITION RESEARCH.....	86
1 Introduction	89
2 Material and methods	91
2.1 Animals	91
2.2 Organ collection and histological analysis.....	93
2.3 Statistical analysis.....	94
3 Results	95
4 Discussion	97
5 References.....	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente a batata-doce, *Ipomoea (L) Lam.*, é a sexta mais importante cultura alimentar mundial seguida do arroz, trigo, batata, milho e mandioca. Milhões de toneladas de batata-doce são produzidas em todo o mundo e 95% das mesmas em países em desenvolvimento, com a China como o principal produtor, alcançando uma produtividade aproximada de 150 milhões de toneladas ao ano (TANUMIHARDJO, 2017; DRAPAL, 2019). Este alimento possui alta produtividade em climas tropicais, inclusive no Brasil, onde há altas temperaturas, chuva e solo fértil, exigindo pouca ou nenhuma tecnologia, portanto, predominantemente presente na produção da agricultura familiar (INFANTE *et al.*, 2017). O Brasil apresenta-se como principal produtor no continente Latino-Americano, com uma produção anual de três milhões de toneladas e os estados de maior produção incluem Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Bahia e Paraná, atingindo um rendimento de 10 toneladas por alqueires (t/ha) (SOARES *et al.*, 2014).

Existem atualmente diferentes ferramentas para melhorar o valor nutricional de diferentes produtos alimentícios, um processo conhecido como biofortificação. O termo “biofortificação”, também conhecido como “fortificação biológica”, refere-se a culturas alimentares melhoradas nutricionalmente aumentando a biodisponibilidade para a população humana que cresceu e se desenvolveu usando técnicas modernas de biotecnologia, cruzamento convencional de plantas e práticas agrônômicas. Trata-se de uma técnica promissora, sustentável e com satisfatório custo-benefício possibilitando o acesso aos micronutrientes em uma população que não possui dieta saudável e diversificada, pelo contrário, as principais culturas alimentares são fontes pobres de micronutrientes necessários para o crescimento humano adequado (GARG *et al.*, 2018).

Neste contexto, é possível a produção de batata-doce biofortificadas, entre as quais destaca-se a *Ipomoea (L) Lam* cultivar *Beauregard* ou batata-doce biofortificada, a Batata-Doce de Polpa Alaranjada – BDPA. Esta variação foi desenvolvida em uma estação experimental agrícola do estado de Louisiana, nos

Estados Unidos, *Louisiana Agricultural Experiment Station* em 1981, e chegou ao Brasil por intermédio de convênios feitos pela Embrapa Hortaliças em Brasília, que passou a recomendar seu cultivo pela eficiente produtividade, ótima aceitação dos consumidores e pela coloração alaranjada da polpa (ALVES *et al*, 2012).

O emprego da BPDA surge como alternativa viável para a suplementação alimentar, objetivando suprir a carência de vitamina A devido à presença e fonte barata e abundante de β -caroteno encontrada nesse alimento, tido como maior precursor da vitamina A, isto é, quanto mais concentrada for à tonalidade da cor interna, maior será a concentração de β -caroteno. Ainda, há pesquisas que comprovam e justificam o consumo das folhas deste tubérculo e estas, frequentemente descartadas, são fontes ricas de macro e micronutrientes essenciais à saúde (MIRASSE, 2010).

As folhas podem ser consumidas como uma hortaliça nas principais refeições. Folhas de batata-doce são fontes ricas em fibras, vitaminas, minerais, proteínas, compostos com propriedades antioxidantes como polifenóis, carotenoides, e vários outros micronutrientes indicando a necessidade de promover o consumo das mesmas, conforme demonstrado na tabela I. E, em algumas regiões do mundo, esse vegetal é consumido normalmente, como no Sudeste Asiático e sua aplicabilidade no preparo de alimentos pode ser eficaz na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à desnutrição, bem como as doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) (ISLAM, 2006; LAURIE, 2017).

Tabela I Comparação dos teores minerais, proteico, lipídico e calórico fornecidos pelo consumo de 100 g da folha de batata-doce em relação ao consumo de 100 g de folhas secas de mandioca, feijão preto cozido e feijão preto cru.

Composição	Batata doce (folhas secas)	Mandioca (folhas secas)	Feijão preto (cozido)	Feijão preto (cru)
Calorias (em 100g) ⁽¹⁾	49,00	91,00	84,80	343,60
Glicídios (g/100g) ⁽¹⁾	10,20	18,30	14,28	62,37
Proteínas (g/100g) ⁽¹⁾	4,60	7,00	6,00	20,74
Lipídios (g/100g) ⁽¹⁾	0,20	1,00	0,42	1,27
Cálcio (mg/100g) ⁽¹⁾	158,00	303,00	46,00	145,00
Fósforo (mg/100g) ⁽¹⁾	84,00	119,00	98,00	471,00
Ferro (mg/100g) ⁽¹⁾	6,20	7,60	2,40	4,30
Glicídios (g/100 cal) ⁽²⁾	20,82	20,11	16,84	18,15
Proteínas (g/100g) ⁽²⁾	9,39	7,69	7,08	6,04
Lipídios (g/100 cal) ⁽²⁾	0,41	1,10	0,50	0,37
Cálcio (mg/100 cal) ⁽²⁾	322,45	332,97	54,25	42,20
Fósforo (mg/100 cal) ⁽²⁾	171,43	130,77	115,57	137,08
Ferro (mg/100 cal) ⁽²⁾	12,65	8,35	2,83	1,25

Fonte: SALASAR et al., 2019.

(1) Nutrição-Composição química e valor energético dos alimentos.

(2) Dados calculados com base em unidades calóricas.

As DCNT como câncer, doenças cardíacas coronarianas, diabetes, dislipidemias, entre outras, são as principais causas de mortalidade mundial. Este cenário vem demonstrando urgência na necessidade de investimentos relacionados à prevenção dessas patologias, o que resulta em melhor qualidade de vida para a população e economia para as instituições de saúde. Entretanto, as pesquisas acerca do aproveitamento das partes não convencionais de alimentos, que possuem propriedades funcionais com propriedades terapêuticas, estão sendo cada vez mais aprofundadas devido às limitações econômicas no país, e concomitantemente, surge uma grande preocupação com a qualidade nutricional dos mais variados produtos. Porém, a maioria destes produtos possui grande valor agregado, o que dificulta a aquisição e consumo frequente na população, sendo este, um fator relevante para que haja a busca de alimentos com propriedades funcionais de maior acessibilidade à população carente, uma

vez que estes auxiliam na prevenção, controle e tratamento de DCNT (PEREIRA, 2007).

Em virtude dos argumentos apresentados, destaca-se a importância do consumo de produtos alimentícios ricos em fibras e antioxidantes, a exemplo de subprodutos como as folhas, cascas e talos, que representam cerca de 30% do desperdício de alimentos hortifrutigranjeiros adquiridos, devido à falta de conhecimento sobre seu valor nutricional ou forma de preparo adequada. Ainda, podem ser utilizadas para elevar o valor nutricional de uma refeição, já que podem representar maior valor nutricional quando comparados à parte nobre do alimento (STORK, 2013).

Assim, estas partes da planta tornam-se atraentes para contínuas pesquisas e futura aplicação na medicina. O aproveitamento integral da batata-doce, além de ser uma prática sustentável, pode auxiliar na prevenção de doenças que acometem grande parte da população, tais como as DCNT por meio da ação dos antioxidantes presentes nas partes que comumente são descartadas, principalmente nas folhas, promovendo melhora na qualidade de vida e longevidade

1.1 BDPA e biofortificação

A fortificação, enriquecimento ou adição é um processo no qual é acrescido ao alimento, dentro dos parâmetros legais, um ou mais nutrientes, presentes ou não naturalmente neste, com o intuito de reforçar seu valor nutricional e prevenir ou corrigir possíveis deficiências nutricionais apresentadas pela população em geral ou de grupos de indivíduos. E, portanto, vem sendo utilizada como um método de baixo custo na prevenção de carências nutricionais em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Diversos alimentos têm sido utilizados na fortificação, mostrando-se eficientes e bem tolerados. A adição de fortificantes deve ocorrer em alimentos que efetivamente participem da rotina da alimentação regional. Seu uso deve ser inserido somente após avaliação do estado nutricional da população alvo (VELLOZO; FISBERG, 2010).

A biofortificação caracteriza-se pelo aumento no conteúdo de nutrientes nos alimentos, por meio de melhoramento genético convencional ou da engenharia genética. É uma técnica da engenharia genética, que consiste em adicionar os micronutrientes na semente dos alimentos no momento do plantio. As sementes biofortificadas podem ser utilizadas para o consumo direto ou na produção de alimentos enriquecidos (CARDOSO *et al.*, 2009).

Do ponto de vista socioeconômico, a biofortificação é um investimento de tempo e oferece rentabilidade a longo prazo, e abordagem sustentável no combate à fome oculta, pois uma vez que as culturas biofortificadas são desenvolvidas; não há custos de comprar os fortificantes e adicioná-los à oferta de alimentos durante o processamento. Contudo, nas próximas décadas, com grande aumento da população no mundo em desenvolvimento e com a mudança das condições climáticas, obter o alcance à segurança alimentar representará um importante desafio. Assim, as organizações, como a Organização Mundial de Saúde incluíram o desenvolvimento de culturas biofortificadas de alto rendimento melhoradas nutricionalmente como um dos seus principais objetivos (GARG *et al.*, 2018).

Conforme Garg *et al.* (2018), a biofortificação de diferentes variedades de culturas, principalmente a batata-doce, oferece uma solução sustentável e de longo prazo no fornecimento de micronutrientes que são benéficos para a população. Além disso, as culturas biofortificadas, com aumento da biodisponibilidade de micronutrientes essenciais, são implantadas para os consumidores por meio de práticas tradicionais utilizadas pela agricultura e comércio de alimentos que fornece uma maneira viável de atingir as famílias com renda desfavorável e subnutridas com acesso limitado a diversas variedades alimentícias, suplementos e alimentos fortificados.

A batata-doce *Beauregard*, também conhecida como BDPA (batata-doce de polpa alaranjada) é uma cultivar americana desenvolvida em 1981 pela *Louisiana Agricultural Experiment Station* (EMBRAPA, 2013). E, esta é considerada biofortificada, por apresentar em sua polpa de coloração alaranjada com elevada concentração de betacaroteno. As cultivares de batata-doce com polpa branca trazem em sua composição, aproximadamente, 10 miligramas por

quilo de betacaroteno, já a *Beauregard*, chega a 115 miligramas por quilo de raiz. Destaca-se pela sua precocidade e pelo rendimento de raízes comerciais, bem como boa aparência do produto e sua alta palatabilidade. Em lavouras experimentais cultivadas pela Embrapa em Canoinhas (SC), superou as demais cultivares por produzir até 50 toneladas de raízes por hectare (RODRIGUES, 2011).

O consumo de variedades de BDPA e seus subprodutos traz benefícios, particularmente no contexto do aumento do consumo de alimentos ultra processados, ou seja, prontos para o consumo, sendo estes, alimentos que são geralmente de alta densidade energética, gordurosos, açucarados ou salgados, frequentemente consumidos em países de renda média, ameaçando sistemas de saúde pública devido ao aumento das taxas de doenças crônicas relacionadas com a alimentação (MONTEIRO *et al.*, 2013).

1.2 A aplicabilidade das folhas de BDPA e fatores nutricionais

As folhas da BDPA são, na maioria das vezes, descartadas ou fornecidas como ração para animais. Entretanto, em algumas partes do mundo há populações que utilizam suas folhas da mesma forma que se consome outras hortaliças. Diversos estudos têm demonstrado que a parte aérea apresenta componentes químicos capazes de atuar benéficamente sobre o metabolismo de outros organismos, em especial o organismo humano. Dentre as diversas substâncias presentes, as que possuem o maior número de atividades biológicas reconhecidas são os compostos fenólicos, estes se configuram como bons antioxidantes (SOARES *et al.*, 2014).

Em estudo apresentado por Antia *et al.* (2006), foi demonstrado usando métodos analíticos padrão, que as folhas da BDPA detêm uma quantidade *significativa* de nutrientes, vitaminas e elementos minerais e baixos níveis de substâncias tóxicas. Este estudo, também mostra que as folhas de BDPA apresentam oxalato, ou também chamado de ácido oxálico, que compreende em uma substância considerada fator antinutricional por interagir negativamente

com o metabolismo de minerais como o cálcio. Contudo, este pode ser reduzido pela cocção e devem ser inseridas em dietas para suplementar o subsídio diário necessário para o corpo humano.

Conforme as variedades e condições de crescimento, as folhas de batata-doce são comparáveis às do espinafre, em nutrientes, tais como vitaminas e minerais. O teor médio de minerais em uma cultivar desenvolvida recentemente ('Suioh') por Islam (2016) apresenta em torno de 117 mg de cálcio, 1,8 mg de ferro, 3,5 mg de caroteno, 7,2 mg de vitamina C, 1,6 mg de vitamina E e 0,56 mg de vitamina K para cada 100g de peso fresco das folhas. Níveis de ferro, cálcio e caroteno estão entre os principais, equiparado com demais vegetais principais.

Em relação especificamente ao ácido ascórbico, ou seja, vitamina C, também presente na batata-doce, Barrera e Picha (2014), concluíram que as folhas jovens possuem teor mais alto deste nutriente, seguido por folhas e brotos maduros. Em uma pesquisa realizada para correlacionar o teor de ácido ascórbico em peso seco, com outros alimentos, os autores observaram que a quantidade analisada em cada 100g de peso da folha da batata-doce foi superior a do espinafre (31,6 mg), do feijão verde (15,8 mg), da ervilha (30,9 mg), do brócolis frescos (96,7 mg), do repolho fresco (42,3 mg), da couve fresca (92,7 mg) e da batata (11,0 mg), todos classificados como boas fontes de ácido ascórbico na alimentação humana.

Sun *et al.* (2014) avaliaram os componentes nutricionais das folhas de 40 cultivares chineses de batatas-doces das quais relatam uma série de nutrientes e compostos bioativos presentes, preconizando que as folhas de batata-doce deveriam ser consumidas como vegetais de folhas, especialmente por povos que apresentam adversidades relacionadas à desnutrição. A notória importância da batata-doce no contexto humano se torna evidente quando se considera a necessidade nutricional que, deve ser atendida diariamente a fim de se evitar patologias relacionadas à deficiência de nutrientes essenciais, e a conveniência na aplicação da batata-doce como suplemento nutricional na dieta de populações carentes.

É reconhecida a presença significativa de antocianinas na polpa da BDPA e, ainda 15 compostos de antocianinas foram identificados e caracterizados em folhas de batata-doce biofortificada. Portanto, as folhas da batata-doce biofortificada, podem ser usadas para consumo *in natura* (preparo de saladas), preparo de chás, em forma de farinhas na confecção de macarrão, pães, confeitos e como suplemento nutricional de compostos fenólicos. Sua apresentação em pó ou farinha têm se mostrado com maior aceitabilidade por provadores em análise sensorial, uma vez que a farinha obtida a partir deste vegetal pode ser considerada um potencial ingrediente funcional para utilização em produtos alimentícios como sorvetes, sucos, refrigerantes, chá e pães (ISLAM, 2006).

Alves *et al.* (2012), afirmam que as folhas de BDPA representam um alimento fisiologicamente funcional que atuam na proteção de doenças associadas à oxidação, tais como o câncer, alergias, envelhecimento e problemas cardiovasculares. Além da aplicabilidade no enriquecimento nutricional e dietético de alimentos ou, no cotidiano, as folhas de BDPA podem ser consumidas através de suplemento nutricional para obtenção dos benefícios.

1.3 Compostos bioativos

O conceito de nutrição está evoluindo e hoje, a dieta não deve ser somente compreendida como suficiente, no sentido de evitar déficits de nutrientes, mas também deve ser vista como uma nutrição que objetiva a qualidade de vida. Assim, a alimentação recebe um enfoque terapêutico e preventivo e atua na promoção da saúde (VIZZOTO *et al.*, 2010).

Considerando o entendimento de que o alimento não só tem a função de nutrir como também de fornecer outros benefícios ao indivíduo, temos o conceito de alimentos funcionais, que se originou no Japão em 1980, quando foi utilizado pela indústria para descrever alimentos fortificados com ingredientes específicos inferindo-lhes certos benefícios à saúde (CARRATU E SANZINI, 2005).

Os alimentos funcionais possuem compostos bioativos capazes de atuar como moduladores dos processos metabólicos, prevenindo o surgimento precoce de doenças degenerativas. Esses bioativos são também denominados de fitoquímicos. A planta os sintetiza a fim de elaborar um sistema de proteção contra agressores presentes no ambiente, e, portanto, algumas de suas funções podem ser de fungicida, de inseticida e/ ou antibacteriana. A produção destes compostos esta diretamente ligada ao ambiente onde a planta se desenvolve, sendo que as plantas cultivadas naturalmente apresentam uma maior probabilidade de conter esses fitoquímicos (VIZZOTO *et al.*, 2010).

Compostos bioativos são constituintes extra nutricionais, ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos e podem ser obtidos por meio de uma dieta equilibrada. Estão associados à redução do estresse oxidativo e do risco de doenças, especialmente câncer e aterosclerose, pois podem neutralizar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio resultantes dos processos oxidativos intracelulares. Especialistas afirmam que pelo menos um terço dos casos de câncer e cerca da metade das doenças cardiovasculares podem ser prevenidas por meio da dieta (PEIXOTO, 2017)

Os fitoquímicos podem ser classificados como carotenoides, fenólicos, alcaloides, compostos contendo nitrogênio e compostos organosulfurados: Os carotenoides são os pigmentos mais comuns na natureza e possuem grande importância devido sua atividade pró-vitáminica e antioxidante. Fenólicos são classificados em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos. Os flavonoides talvez formem o grupo de compostos fenólicos mais importante das plantas, dentre eles estão consideradas as flavonas, flavonóis, flavanonas, proantocianidinas, antocianinas, catequinas e isoflavonas. Grupos específicos de alimentos são frequentemente fontes de uma ou mais subclasses desses polifenóis, e seus efeitos na saúde dependem da quantidade consumida e de sua biodisponibilidade (CARDOSO *et al.*, 2009).

Os estudos farmacológicos, citados pelos autores Lu *et al* (2019), demonstraram que as folhas de batata-doce biofortificada possuem efeito antioxidante, anti-hipertensivo, hipoglicemiante, imunorreguladores e anticâncer. No entanto, a maioria dessas folhas são descartadas durante o processo de

produção e consumo de batata-doce, resultando em um grave desperdício de recursos biologicamente ativos. Por conseguinte, o conhecimento desses ingredientes farmacologicamente ativos é relevante, pois representam importante perspectiva medicinal.

Os carotenoides são pigmentos presentes nos animais e nas plantas de coloração amarela, laranja, vermelha ou verde. Nas células das plantas, eles são encontrados principalmente em membranas lipídicas ou armazenados nos vacúolos do plasma, sendo sintetizados com a característica principal de absorver luz durante a fotossíntese, e atuar na defesa contra organismos fotossintéticos nas plantas. Entretanto, as concentrações e biossíntese de carotenoides dependem de fatores genéticos e ambientais, que incluem o cultivar, estado de maturidade do fruto, parte utilizada da planta, práticas do cultivo, processamento e armazenamento do produto (MAIANI *et al*, 2009).

Uma das características fisiológicas dos carotenoides é a sua atuação como precursor de vitamina A nos animais. Porém, pelo fato de alimentos de origem animal, que são fornecedores de vitamina A pré-formada, terem acesso limitado às comunidades carentes, os alimentos vegetais fontes de carotenoides apresentam-se como a principal fonte de provitamina A em países em desenvolvimento, onde se registra frequentemente sérias deficiências desta vitamina. Folhas verdes de plantas, óleo de palma, frutas tropicais vermelhas, cenoura, batata, tomate, laranja e abóbora são exemplos de alimentos considerados fontes ricas em carotenoides (MILLS *et al*, 2009).

A vitamina A é referida como responsável por processos biológicos importantes no organismo, sendo essencial na embriogênese, crescimento e diferenciação celular, reprodução, fortalecimento do sistema imunológico e da acuidade visual. Sua deficiência acarreta no aumento das taxas de mortalidade infantil, ocasionadas por patologias infecciosas em função da redução da resposta do sistema imune e complicações visuais que podem levar à cegueira permanente. Além das lesões oculares, a deficiência de vitamina A (DVA) pode ser fator determinante na mortalidade materna, desenvolvimento embrionário prejudicado e falhas na lactação (BALL, 2006).

A DVA é considerada um dos problemas mais importantes de saúde pública no Brasil e em várias regiões do mundo. No continente americano, o Brasil é um dos países mais acometidos pela DVA, alcançando principalmente as crianças e com prevalência de carência de vitamina A marginal substancialmente acima dos níveis considerados aceitáveis (MILAGRES *et al*, 2007).

Muitos efeitos promotores da saúde são atribuídos aos carotenoides, tais como: melhoria da resposta imunológica contra infecções, proteção da mucosa gástrica contra úlceras e redução do risco de desenvolver doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração muscular relacionada à idade e catarata. Ainda, os carotenoides também foram identificados como potenciais inibidores da doença de Alzheimer. Essas atividades fisiológicas não possuem relação com a atividade de vitamina A e têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, especificamente à capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e interagir com os radicais livres (SMIDERLE, 2013).

As propriedades antioxidantes dos carotenoides são associadas à inativação dos radicais livres. Estudos apontam menor incidência de DCNT não transmissíveis, quando há aumento no consumo destes compostos através dos alimentos, concluindo que os carotenoides podem contribuir na prevenção dessas doenças (LEE *et al*, 2009).

Compostos fenólicos em alimentos são originários de uma das principais classes de metabólitos secundários nas plantas derivadas de fenilalanina e em menor proporção de tirosina. As plantas e os alimentos possuem uma grande variedade de derivados fenólicos, dentre eles, fenóis simples, fenilpropanóides, flavonoides, derivados do ácido benzoico, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas, essenciais no crescimento e a reprodução de plantas. Os compostos fenólicos atuam como elementos imunomoduladores, protetores contra a radiação ultravioleta entre outras características que incluem a pigmentação natural dos vegetais (NACZK E SHAHIDI, 2004)

Além dos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerindo que os compostos fenólicos de frutas e vegetais são responsáveis por diversas funções benéficas à saúde,

incluindo a atenuação nos riscos de carcinomas e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Estudos epidemiológicos indicam associações inversas entre ingestão de frutas e legumes e menor risco de doenças cardiovasculares e diferentes tipos de cânceres. A propriedade antioxidante dos compostos fenólicos exerce um papel importante na prevenção das células e tecidos contra o estresse oxidativo e demais efeitos biológicos relacionados com doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (ARTS, 2008; ROSSI *et al*, 2010).

Nos últimos anos foram apresentados diversos estudos que avaliam a composição e função antioxidante de compostos fenólicos em diversos alimentos, especialmente frutas e vegetais, incluindo a batata-doce. Os compostos fenólicos neste tubérculo têm sido avaliados em vários estudos, principalmente nos Estados Unidos e Japão. Extratos polifenólicos de folhas e raízes de batata-doce são evidenciados por possuírem potente atividade antioxidante, antimutagênica, propriedades quimiopreventivas, propriedades antidiabéticas e redução nos efeitos do Alzheimer por neutralizarem o estresse oxidativo no cérebro. Porém, há pouca disponibilidade literária de informações a respeito da concentração e bioatividade antioxidante de compostos fenólicos nas raízes de cultivares de batata-doce produzidas no Brasil (ISLAM, 2006; TRUONG *et al*, 2007; NAGAI *et al*, 2011).

Os flavonoides consistem em um grupo de compostos fenólicos amplamente encontrados nas frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas (Figura 2^a), antocianinas (Figura 2B), isoflavonas e chalconas. Constituem um grupo de compostos aromáticos com quinze carbonos no esqueleto básico. Essas substâncias representam o grupo mais numeroso de polifenóis, sendo relativamente comuns na dieta humana e encontrados, sobretudo em frutas e hortaliças, mais especificamente café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e especialmente chá, que contém sobretudo catequinas em sua composição (GRAHAM, 1992; AHERNE; OBRIEN, 2002).

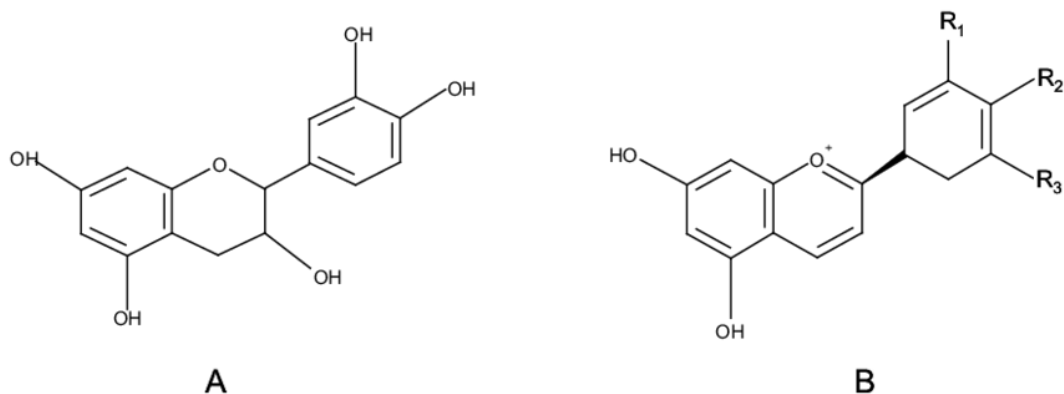


Figura 1- Exemplos de flavonóides mais comumente encontrados.A: catequinas e B: antocianinas

De acordo com Oga *et al* (2014), os flavonoides apresentam ação antioxidante através da quelação de metais de transição, ação direta contra os radicais livres por meio da transferência de átomos de hidrogênio, além da inibição das enzimas cicloxigenase, lipogenase, NADPH-oxidase, xantina oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante, como a catalase e a superóxido dismutase.

Sendo assim, além dos efeitos antioxidantes estes compostos possuem distintas atividades biológicas, incluindo ação anti-inflamatória que podem justificar suas potenciais propriedades cardioprotetoras (FROUMBAUM *et al.*, 2013). Os flavonóides também desempenham a função de regulação gênica de diversas moléculas e enzimas envolvidas na aterogênese, promovem a inibição da oxidação de LDL-c e a redução da peroxidação lipídica e da extensão da lesão aterosclerótica (KALIORA, DEDOUSSIS, SCHMIDT, 2006).

As antocianidinas juntamente com outros compostos fenólicos exercem efeitos benéficos no tratamento da diabetes por aumentar a secreção de insulina, diminuindo a apoptose e promover a proliferação de células β -pancreáticas. Também regulam o metabolismo da glicose em hepatócitos, reduzem a resistência à insulina, à inflamação e estresse oxidativo em tecidos musculares e adiposo (BABU *et al.*, 2013).

As folhas de BDPA, que crescem em abundância em solos pobres, contêm altas concentrações de polifenóis, quando comparado com os principais produtos hortícolas comerciais tais como espinafre, brócolis, couve e alface. Apresentam, pelo menos, 15 tipos diferentes de antocianinas e 6 compostos polifenólicos. Estes compostos biologicamente ativos possuem ação multivariada, incluindo antioxidação, antimutagenicidade, anti- inflamação e anticarcinogênese (ALVES *et al.*, 2012).

1.4 Dislipidemias

As dislipidemias são as desordens na taxa de lipidograma, ou seja, lipídeo (gordura) presente no sangue podem ser o fator de risco para desenvolvimento de doenças crônicas, especialmente doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca, aterosclerose e doenças coronarianas (SCHMIDT *et al.*, 2011).

As dislipidemias consistem em elevadas taxas de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) no sangue e podem surgir através de dieta rica em gorduras saturadas, especialmente gorduras *trans* (gordura hidrogenada). A LDL-oxidada (LDL-ox) compreende um papel chave no desenvolvimento da aterosclerose. O processo de formação da placa aterosclerótica, inicia quando a LDL sofre oxidação gradual até a formação da LDL Minimamente Modificada (LDL-MM), que pode possuir produtos oxidativos de lipídios sem modificação proteica. A LDL somente passa a ser chamada de oxidada quando existe modificação da apolipoproteína B e a LDL sofre a perda de afinidade com o seu receptor, tornando-se reconhecida por outro receptor, o receptor *scavenger* (papel de remoção de pilhas inativas) do macrófago. Como resposta inflamatória, a LDL-ox induz à ativação de monócitos que são convertidos em macrófagos no espaço subendotelial. Conforme os macrófagos começam a fagocitar os lipídios, vão se formando células espumosas, derivadas dos macrófagos, que possuem lipídios principalmente sobre forma de colesterol livre. De maneira geral, a oxidação da LDL-c no plasma sanguíneo é baixa, devido à ação de substâncias antioxidantes (KRÜGER *et al.*, 2015).

Conforme a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2013), na hipercolesterolemia, ou seja, quando o colesterol sérico está em níveis acima do recomendado, é indicada a ingestão de 20 a 30g/dia de fibra alimentar (5 a 10g solúveis), assim como a ingestão de 3 a 4g/dia de fitosteróis como adjuvante ao tratamento da dislipidemia. No entanto, uma alimentação rica em frutas e vegetais, principalmente vegetais folhosos onde há maior concentração de fibra dietética, e diversificados, fornecendo doses apropriadas de substâncias antioxidantes, deve ser preconizada. Na hipertrigliceridemia, que ocorre quando há elevadas taxas de triglicérides séricos, concomitante à obesidade ou a DM, sugere-se, portanto, uma dieta hipocalórica, adequação do consumo de carboidratos, principalmente refinados, e gordura, controle da hiperglicemia, além da restrição total do consumo de álcool.

Os compostos fenólicos presentes na BDPA e seus componentes têm recebido maior atenção devido aos seus potenciais nas atividades antioxidantes que podem exercer efeitos cardioprotetores em humanos, mantendo o bom equilíbrio no perfil lipídico. Tem sido demonstrado que a ingestão destes compostos foi inversamente relacionada com a mortalidade por doença cardíaca. Compostos fenólicos apresentam diversas funções fisiológicas, portanto, folhas de batata-doce também podem ter propriedades fisiologicamente ativas esperadas por possuírem teores mais elevados destes compostos (ISLAM *et al.*, 2006).

1.5 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante

A produção de radicais livres constitui um processo constante e fisiológico, a partir do processo respiratório e de diversas reações oxidativas, exercendo funções biológicas relevantes. Esta produção é regulada por diferentes processos e vias metabólicas, atuando como interventor na sinalização extra e intracelular. Porém, a produção excessiva pode acarretar em danos oxidativos ou estresse oxidativo, que por sua vez, é caracterizado pelo acúmulo intracelular de compostos reativos ao oxigênio, e ao nitrogênio, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) de nitrogênio (ERN), e normalmente ocorre nas células como

consequência de um desequilíbrio do sistema redox, devido ao excesso do acúmulo de espécies reativas, principalmente EROs, e pela depleção de antioxidantes (AOX) ou ambos. Portanto, o sistema de proteção antioxidante, endógeno e exógeno, interage entre si e age sinergicamente para inativar os radicais livres. Existem dois tipos de mecanismos antioxidantes: o enzimático e o não enzimático, os quais atuam sinergicamente para manter o equilíbrio dos radicais livres no organismo (KALIORA *et al*, 2006). Por isso, as células humanas dependem de certa capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbica (McLEAN *et al.*, 2005).

Os antioxidantes atuam como uma proteção eficiente, ou seja, são um conjunto heterogêneo de substâncias formado por compostos bioativos, como vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais além de enzimas, que bloqueiam a ação nociva dos radicais livres (McLEAN *et al.*, 2005). Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos como flavonoides (antocianinas). Além da ingestão de frutas e vegetais, que são recomendados como fontes de compostos antioxidantes, acredita-se que a suplementação da dieta com ervas, farinhas e derivados contendo elevadas concentrações de compostos capazes de inativar radicais livres, tenha também efeitos benéficos (CAPECKA, MARECZEK, LEJA, 2005).

Considerando que o desenvolvimento de DCNT como as cardiovasculares (hipertensão arterial, aterosclerose), metabólicas como o diabetes e obesidade, e desordens inflamatórias envolve componentes genéticos e ambientais, grande ênfase tem sido dada, atualmente, o esclarecimento a respeito da interação entre genes e fatores ambientais. Vários estudos epidemiológicos apontaram que a ingestão elevada de produtos vegetais está relacionada com a diminuição no risco de DCNT. Portanto, um dos principais fatores ambientais a que o ser humano é exposto diariamente é a alimentação, que pode ter ação preventiva ou indutora na formação dos radicais livres causadores do estresse oxidativo (LOH *et al*, 2009).

O tipo e a qualidade dos alimentos ingeridos são de extrema importância, não apenas pelo seu perfil nutricional, mas também pela capacidade de seus

nutrientes e compostos bioativos em interagirem com o genoma. Assim, a Nutrigenômica representa uma vertente de estudos no âmbito nutricional, que tem como foco estudar a interação gene-nutriente. Essa ocorre de duas formas complementares: nutrientes e compostos bioativos dos alimentos (CBAs) modulam o funcionamento do genoma e, da mesma forma, características do genoma influenciam a resposta à alimentação, necessidade de nutrientes e risco para DCNT (KAPLAN, 1996; MUÑOZ DE CHÁVEZ, 2003).

Os compostos fenólicos da folha da BDPA atraíram atenção especial devido ao fator de proteção ao estresse oxidativo, que por sua vez, pode ser o causador do câncer e de DCNT incluindo doenças cardiovasculares. Elas são excelentes fontes de polifenóis antioxidantes, entre eles as antocianinas e os ácidos fenólicos, como o cafeico, o monocateoilquínico (ácido clorogênico), o dicafeoilquínico e ácidos de tricateoilquínico, superiores ao de outras hortaliças, como espinafre, brócolis, couve e alface, é considerada um alimento funcional que possui atuação na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, doenças hepáticas, alergias, dentre outras. Além desses compostos, há compostos agregados a macromoléculas que influenciam na qualidade sensorial e valor nutritivo, contribuindo positivamente na saúde de seu consumidor (ISLAM, 2006; TRUONG *et al*, 2007; BASTOS, 2009)

De acordo com o estudo de Soares *et al* (2014), as análises por CLAE realizadas com todos os cultivares de batata-doce permitiram identificar constituintes fenólicos importantes em diversas funções biológicas. A multiplicidade de compostos observada, ante o expressivo teor de flavonoides encontrado, remetem à possibilidade de aproveitamento das folhas de batata-doce para aplicações biológicas, considerando que vários estudos *in vitro*, já demonstraram capacidade dos compostos identificados em atuarem sinergicamente na diminuição de riscos associados a várias patologias, como inflamações intestinais, infecções bacterianas, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, entre outras decorrentes da oxidação de moléculas biológicas. Os resultados obtidos no estudo revelaram que os constituintes fenólicos nos extratos das folhas das variedades de batata-doce constituem uma

matriz complexa de compostos na qual, está incluso o ácido elágico, composto de grande importância farmacológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar os efeitos da administração de suplementação da farinha obtida da folha de batata-doce biofortificada, sobre o metabolismo, adiposidade e estresse oxidativo em ratos Wistar machos.

2.2 Específicos

- Investigar os efeitos da suplementação com BDPA sobre o peso corporal e estoques de tecido adiposo branco;
- Avaliar os efeitos da suplementação com BDPA sobre os parâmetros plasmáticos de jejum (glicemia, triglicerídeos, colesterol total e subfrações (HDL e LDL)
- Estudar o impacto da suplementação com BDPA sobre enzimas oxidantes plasmáticas e o perfil hematológico
- Caracterizar a histologia do tecido adiposo branco visceral de ratos suplementados com BDPA
- Investigar o efeito morfológico hepático da suplementação com BDPA

3 MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa de caráter experimental básica, recorte de um projeto maior intitulado Folha de batata doce biofortificada - caracterização e aplicações sob a coordenação da Profa. Dra. Luciana Bill M. Kottwitz – UNIOESTE/PR.

Foram utilizadas na presente pesquisa, folhas da batata-doce biofortificada provenientes de uma área rural localizada na Linha São João, no mês de janeiro, no município de Cascavel/PR (latitude 24°58'15.18"S e longitude 53°14'10.96"O). Onde o clima é considerado Cfa (clima subtropical), com precipitação média anual superior a 1800mm, sem estação seca definida, com possibilidade de geadas durante o inverno. Solo Latossolo Vermelho Distroférico, classificado de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2013). As mesmas foram higienizadas e submetidas ao processo de secagem em estufa com circulação e renovação de ar da marca Tecnal TE-394/2-MP por aproximadamente 5 (cinco) horas.

Para o preparo do suplemento de farinha a ser administrado aos animais, as folhas foram trituradas em processador de alimentos Philco® e misturadas, em proporção 1:1 com água destilada, ou seja, para cada 100g de farinha, utilizou-se 100 mL de água destilada, até a obtenção de um produto suficientemente líquido para aspiração com agulha de gavagem.

Foram utilizados ratos Wistar machos, de aproximadamente 28 dias de vida, cedidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel no mês de fevereiro de 2019. A utilização dos animais foi realizada em concordância com os princípios éticos para manipulação e procedimentos com os animais, após tramitação e parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Anexo I). Estes foram primeiramente pesados e randomicamente distribuídos em dois grupos experimentais (Grupo Controle (n=10) e Grupo Suplementado (n=10) , posteriormente mantidos sob condições controladas em ambiente com temperatura de 24°C (± 2 °C), em caixas de polipropileno, com cama de maravalha, dieta comercial Biobase® Linha Biotec 9301 e água à vontade, com ciclo de 12 horas de claro e escuro no Biotério setorial do Laboratório de Fisiologia (LAFEM), localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) em todo período experimental.

A aferição do peso, registrada no primeiro dia no LAFEM, foi realizada também semanalmente durante as seis semanas. Para tal, os animais receberam marcações na cauda, e foram individualmente pesados em balança digital da

marca Balmak® e os pesos expressos em gramas (g) e posterior análise do ganho de peso dos ratos durante a pesquisa.

O início da suplementação foi realizado 24 horas após a entrada no LAFEM, onde o Grupo Suplementado recebeu diariamente, durante as seis semanas, doses de farinha de BDPA dissolvida em água destilada, correspondente a 1g/mL sendo administrado um volume de 2mL/dia via cânula de gavagem durante as seis semanas de experimento. No mesmo período animais do Grupo Controle recebeu via cânula de gavagem o mesmo volume de líquido sem a farinha de BDPA. A gavagem era feita sempre no período da manhã entre 10:00-12:00h e pelo mesmo pesquisador previamente treinado.

Ao término do período experimental, foi realizada a eutanásia, mediante jejum de 12 horas, os animais aos 69 dias de vida foram pesados, previamente insensibilizados em câmara de CO₂ e decapitados em guilhotina. No momento deste procedimento, foi realizada a coleta de sangue do tronco cerebral, a avaliação do comprimento naso-anal (CNA) necessária para obter o índice de LEE, que é mensurado por meio da seguinte fórmula: [raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000], descrito por Souza *et al.* (2001).

As amostras de sangue coletadas em tubos heparinizados foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga Centribio® modelo 80-2B para a obtenção do plasma, o qual foi separado em tubos tipo microtubos, armazenados a -80^oC em Ultrafreezer (Indrel® IUT 355D) para avaliar capacidade antioxidante total e perfil bioquímico conforme descrito nos itens A e B abaixo.

A) Avaliação da capacidade antioxidante total plasmática e tumoral – TRAP (REPETTO *et al.*, 1996). Neste procedimento, o composto 2,2'azobis (ABAP) reage com lipídeos presentes no plasma formando lipoperóxidos. Esta reação emite fótons em baixas quantidades, os quais são amplificados pela adição de luminol. Assim, as amostras foram diluídas 1:50 em 980 mL de tampão glicina 1M, pH 8,6, adicionadas de 50 mL de solução de luminol (0,0398 mg/mL) e 50 mL de solução de ABAP (54,24 mg/mL) para início da reação. Quanto maior a quantidade de antioxidantes presentes na amostra, maior será o

retardo na subida da curva do ABAP, que corresponde ao impedimento na formação de lipoperóxidos devido ao nível de antioxidantes de baixo peso molecular. Os resultados foram analisados no software OriginLab 7.5.0 e expressos em nM de trolox, com base no perfil de inibição da curva do ABAP de uma solução padrão do análogo hidrossolúvel de vitamina E (Trolox 0,5 mg/mL).

B) Perfil Bioquímico: Hemograma: análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado a partir da eutanásia dos animais em tubos contendo heparina, utilizando um analisador automatizado hematológico ABBOTT, modelo Cell-dyn ruby no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná - HUOP. Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC), amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW), neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas; Perfil lipídico: Parte do soro obtido da coleta total de sangue foi utilizada para dosagem do perfil lipídico, com auxílio do analisador MINDRAY BS240 e kits comerciais (Bioclin). Foram avaliados as concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, colesterol HDL e colesterol VLDL. Os resultados de colesterol LDL foram obtidos por meio da equação de Friedewald [$LDL = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicérides}/5) - HDL$] (Santos *et al*, 2010). A mediana do índice triglicérides-glicemia, também conhecida como índice TyG foi calculado com a fórmula [$TG \text{ (mg/dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)}/2$], conforme descrito por Guerrero-Romero, 2010.

Também, no momento da eutanásia, o fígado e a gordura retroperitoneal de cada animal foram retirados e pesados individualmente em balança analítica (Bel Engineering). O valor obtido do peso absoluto dos órgãos coletados foi dividido individualmente pelo peso de cada animal e posteriormente multiplicado por 100 (g/ 100 g de peso corporal). Os tecidos foram fixados em formaldeído a 10%, por 24 horas em frascos individuais. Após este período foi realizada a

lavagem, em água corrente, do fígado e da gordura retroperitoneal um a um, durante 24 horas e conservados em álcool a 70° para análises histológicas e histopatológicas.

Para histologia, os tecidos adiposos viscerais foram desidratados em condições crescentes de álcool, diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Posteriormente, os exemplares foram seccionados em cortes de 5 µm por micrótomo semiautomático da marca Lupetec, e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histológica por microscopia ótica. As lâminas foram fotografadas e avaliadas com auxílio do Software Image Pro Plus, através do qual foi mensurado número de adipócitos. Similarmente, um segmento do tecido hepático foi submetido às técnicas histológicas e seccionados em cortes de 3 µm, corado em H&E sendo posteriormente avaliado pela análise histológica, conforme descrito por Timm (2005). Foi realizada uma análise histopatológica hepática considerando os seguintes aspectos: presença ou não de esteatose macrovesicular e microvesicular; infiltrado inflamatório e injúria hepatocelular, caracterizada pela balonização dos hepatócitos e pelos hialinos de Mallory; depósitos de ferro; presença de vacuolização glicogênica e da metaplasia ductular e presença de fibrose, que, foi analisada quanto ao seu padrão de deposição e sua concentração. Todas as análises foram realizadas por patologista.

3.1 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Teste T de Students foi usado quando os grupos apresentaram normalidade na distribuição. Mann-Whitney foi usado quando os pressupostos de normalidade não foram aceitos. O teste de normalidade usado, foi o Shapiro-Wilk. Para ambos os testes $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística e os gráficos foram realizados através do programa Prisma, na versão 7.0.

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de fomento público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

4 REFERÊNCIAS

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism CHEMISTRY AND STRUCTURE OF THE FLAVONOIDS. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75–81, 2002. Disponível em: <<https://ac.els-cdn.com>>.

ALVES, R. M. V. *et al.* Estabilidade de farinha de batata-doce biofortificada TT - Stability of biofortified sweet potato flour. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 59–71, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232012000100007&lang=pt%5Cnhttp://www.scielo.br/pdf/bjft/v15n1/07.pdf>.

ANTIA, B. S. *et al.* Nutritive and anti-nutritive evaluation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 166–168, 2006.

ARTS, I. C. W. A Review of the Epidemiological Evidence on Tea, Flavonoids, and Lung Cancer. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 8, p. 1561S-1566S, 2008.

BABU, P. V. A.; LIU, D.; GILBERT, E. R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1777–1789, nov. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286313001277>>.

BALL, G.F.M. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. **Boca Raton: CRC Press**, p. 785, 2006.

BARRERA, W. A.; PICHA, D. H. Ascorbic acid, thiamin, riboflavin, and vitamin B6 contents vary between sweetpotato tissue types. **HortScience**, v. 49, n. 11, p. 1470–1475, 2014.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq. Bras. de Endocrinol. e Metab.**, v. 53, n. 5, p. 646–656, 2009.

CARDOSO, R. M.; BARRERE, A. P. N.; TROVAO, F. C. S. . Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. **Einstein. Educação Continuada em Saúde**, v. 7, p. 106–109, 2009.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 223–226, 2005.

CARRATU, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 41, n. 1, p. 7–16, 2005.

DRAPAL, M. *et al.* Metabolic diversity in sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam.) leaves and storage roots. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41438-018-0075-5>>.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. BATATA DOCE BEAUREGARD, A BATATA DOCE VITAMINADA. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Brasília, 2013. 353 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/602/batata-doce---beauregard>. Acesso em: 10 jan. 2020.

GARG, M. *et al.* Biofortified Crops Generated by Breeding, Agronomy, and Transgenic Approaches Are Improving Lives of Millions of People around the World. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. February, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2018.00012/full>>.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. **J. Agric. Food Chem**, v. 40, p. 801–805, 1992.

INFANTE, R. A. *et al.* Enriched sorghum cookies with biofortified sweet potato carotenoids have good acceptance and high iron bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 89–99, 2017.

ISLAM, S. N. *et al.* Carotenoids and β -carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to Vitamin A deficiency. **Food Chemistry**, v. 199, p. 628–631,

2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.057>>.

ISLAM, S. R: Concise Reviews / Hypotheses in Food Science Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L .) Leaf: Its Potential Effect on Human Health and Nutrition. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. 13–21, 2006.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p. 1–17, 2006.

KAPLAN, M. M. Management of Thyroxine Therapy During Pregnancy. **Endocrine Practice**, v. 2, n. 4, p. 281–286, 1996.

LAURIE, S. M.; FABER, M.; CLAASEN, N. Incorporating orange-fleshed sweet potato into the food system as a strategy for improved nutrition: The context of South Africa. **Food Research International**, v. 104, n. April 2017, p. 77–85, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.016>>.

LEE, E. J. et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, vol. 16, n. 6, 2009.

LOH, J. A. et al. The magnitude of increased levothyroxine requirements in hypothyroid pregnant women depends upon the etiology of the hypothyroidism. **Thyroid**, v. 19, n. 3, p.269–275, 2009.

LU, X. F. *et al.* Improved sample treatment for the determination of flavonoids and polyphenols in sweet potato leaves by ultra performance convergence chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 169, p. 245–253, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.003>>.

MAIANI, G. *et al.* Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. SUPPL. 2, p. 194–218, 2009.

MCLEAN, J. A. et al. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian

intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and*

Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, v. 141, n. 3, p. 366–372, 2005.

MILAGRES, R. C. R. M.; NUNES, L. C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 12, n. 5, p. 1253–1266, 2007.

MILLS, J. P. *et al.* Sweet Potato β -Carotene Bioefficacy Is Enhanced by Dietary Fat and Not Reduced by Soluble Fiber Intake in Mongolian Gerbils. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 44–50, 2009.

MIRASSE, J.J.O consume de batata-doce de polpa alaranjada entre famílias tutaís no nordeste de Moçambique: um estudo sobre percepções de comida e Segurança Alimentar na província de Nampula. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – Faculdade de Ciências Econômicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MONTEIRO, C.A *et al.* Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obes Rev**, vol. 14 (Suppl 2), p. 21-28, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NAGAI, M. *et al.* Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves suppressed oxidation of low density lipoprotein (LDL) in vitro and in human subjects. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 48, n. 3, p. 203–8, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562639>>.

OGA, S. *et al.* **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014.

PEIXOTO, N. M. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DAS SEMENTES DE *ADENANTHERA PAVONINA* L. UTILIZANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ENZIMAS. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) –

Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PEREIRA, M. C. D. A. Casca De Banana E Do Fermentado. **Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras**, p. 147, 2007.

ROSSI, M. *et al.* Flavonoids, proanthocyanidins, and cancer risk: A network of case-control studies from Italy. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 7, p. 871–877, 2010.

SALASAR *et al.* Propriedades Nutricionais E Benefícios Do Consumo Da Polpa E Folha De Batata Doce. **Desenvolvimento Agropecuário Sustentável**, v.1, n.8, p.149-163, 2019.

SMIDERLE, L. A. S. M. Atividade Antioxidante , Polifenóis Totais , Carotenoides Totais , α - e β - carotenos e Isômeros trans (E) e cis (Z) em Cultivares de Abóbora (Cucurbita moschata) Cruas e Cozidas. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, p. 114, 2013.

SCHMIDT, M. I. *et al.* Chronic non-communicable diseases in Brazil: Burden and current challenges. *The Lancet*, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, 2011.

SOARES, I. M. *et al.* Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de diferentes cultivares de ipomoea batatas (L.) lam. obtidas por melhoramento genético para produção industrial de etanol. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 479–488, 2014.

STORK C.R., *et al.* Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. **Ciência Rural**, vol 43, n. 3, 2013.

SUN, H. *et al.* The In Vitro Antioxidant Activity and Inhibition of Intracellular Reactive Oxygen Species of Sweet Potato Leaf Polyphenols. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 11, 2018.

TANUMIHARDJO, S. A. *et al.* The research and implementation continuum of biofortified sweet potato and maize in Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1390, n. 1, p. 88–103, 2017.

TRUONG, V. D. *et al.* Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 6, p. 343–349, 2007.

VELLOZO, E. P.; FISBERG, M. A contribuição dos alimentos fortificados na prevenção da anemia ferropriva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 140–147, 2010.

VIZZOTTO M., KROLOW, F. C. T. Documentos 312. Alimentos Funcionais : Conceitos. **Embrapa**, 2010.

5 EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR MACHOS

Artigo científico a ser submetido à Revista NUTRITION RESEARCH

(normas ANEXO 3)

Ellen Kayumi Mariano Sawazaki^{a, *}, Sabrina Grassioli^b, Diane Maschio de Souza^b, Mateus Ricardo Garbim^b, Fábio Negretti^c, Maria Elisabete Fagundes^a, Ademar Pinezi Junior^b, Rafael Andrade Menolli^b, Leonardo Paixão da Silva^d, Suzana Bender^b, Luciana Bill Mikito Kottwitz^b

^a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

^bUniversidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

^c Laboratório Prevenção e Diagnose – Anatomia Patológica e Citopatológica, Cascavel, Paraná, Brasil.

^d Laboratório de Análises Clínicas – Posto Médico de Guarnição de Cascavel, PMGU/CSC, Cascavel, Paraná, Brasil.

*Autor correspondente. Tel: +55 49 99820 5370.

Endereço de e-mail: ellen.kms@gmail.com (E.K.M. Sawazaki), sgrassioli@gmail.com (S. Grassioli), dianemaschio6@gmail.com (D. Maschio), matheusgarbim@gmail.com (M. R. Garbim), fnegretticascavel@hotmail.com (F. Negretti), bethy_fg@hotmail.com (M. E. Fagundes), pinezijr@gmail.com (A. Pinezi Junior), ramenolli@hotmail.com (R.A.MENOLLI), leopaixao78@gamil.com (L.P.SILVA), suzanabender@hotmail.com (S. Bender), lukottwitz@yahoo.com.br (L. B. M. Kottwitz).

Abreviaturas

AOX; Depleção de Antioxidantes

BDPA; Batata doce de Polpa Alaranjada

CAT; Capacidade antioxidante total

CHCM; Concentração da hemoglobina corpuscular média

DCNT; Doenças Crônicas Não-transmissíveis

EMBRAPA; Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária

FAO; Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

HB; Hemoglobina

HCM; Hemoglobina corpuscular média

HDL; *High Density Lipoprotein* – Lipoproteína de Alta Densidade

HTC; Hematócrito

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IG;Índice Glicêmico

LDL; *Low Density Lipoproteins* – Lipoproteína de Baixa Densidade

MAPA; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

VCM;Volume corpuscular médio

OMS; Organização Mundial da saúde

RBC; Red Blood Cells células vermelhas do sangue

RDW; Red Cell Distribution Width - Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos

WBC; White Blood Cells - células brancas do sangue

EFEITOS POSITIVOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DE FOLHA DE BATATA-DOCE BIOFORTIFICADA SOBRE O METABOLISMO, ADIPOSIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR MACHOS

A Batata-Doce de Polpa Alaranjada – BDPA, refere-se a uma das culturas alimentares obtidas pela biofortificação. O estudo da folhas da BDPA pode portanto, ampliar a utilização deste e fornecer novos elementos com valores nutricionais agregado para promoção da saúde. No presente estudo foi avaliado o efeito da suplementação da farinha obtida da folha da BDPA sobre a adiposidade e condições metabólicas de ratos Wistar. A pesquisa tem caráter experimental básica sendo realizada com ratos Wistar (n=20) divididos em Grupo Suplementado (n=10) o qual recebeu via gavagem 2g de farinha de BDPA em 2mL de água, administrada durante 6 semanas. Ratos não suplementados receberam mesmo volume de água sem a farinha. Aos 69 dias de vida e após 12h de jejum foram pesados, mensurados o comprimento naso anal para cálculo do índice de Lee e coletados sangue total para análise de: glicose, hemograma, perfil lipídico e capacidade antioxidante total (CAT). Foi realizada histologia do tecido adiposo e hepático. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Teste T de Students para normalidade na distribuição. $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Como resultados principais, obteve-se um menor peso e menor volume adipocitário na gordura visceral e houve redução em VLDL-colesterol no Grupo Suplementado. Pode-se concluir que as folhas de BDPA possuem propriedades anti-inflamatórias, expressa na redução no perfil lipídico e redução do acúmulo de gordura nos adipócitos. Estes efeitos correlacionam-se com o combate aos radicais livres e prevenção de danos relacionados ao estresse oxidativo, como as DCNT.

Keywords: batata-doce biofortificada, antioxidantes, carotenoides, gordura visceral, doenças crônicas não-transmissíveis.

1 Introdução

A batata-doce, também chamada de *Ipomoea (L) Lam.*, é a sexta mais importante cultura alimentar mundial, e um alimento básico significativo em vários países, incluindo o Brasil. Milhões de toneladas deste tubérculo são produzidos em todo o mundo, sendo a China o principal produtor mundial (1)(2). Este alimento possui alta produtividade em climas tropicais, inclusive no Brasil, onde há altas temperaturas, chuva e solo fértil, exigindo pouca ou nenhuma tecnologia, portanto, predominantemente presente na produção da agricultura familiar (3). Por estas razões, o Brasil, é destaque na produção de batata- doce no continente Latino-Americano (4).

A biofortificação é uma ferramenta importante que pode agregar valor nutricional ao produto por meio do manejo agrônomo e melhoramento genético convencional. E assim ampliar seus efeitos sobre a saúde dos indivíduos. Neste contexto, a biofortificação causou impacto positivo no sentido de prevenir e/ou reverter quadros de deficiências nutricionais (5).

Ipomoea (L) Lam, cultivar *Beauregard* ou batata-doce biofortificada, a Batata-Doce de Polpa Alaranjada – BDPA, é uma cultivar americana desenvolvida em 1981 pela *Louisiana Agricultural Experiment Station*(5). A BDPA é considerada biofortificada por apresentar elevada concentração de β -caroteno ou vitamina A, o que fornece a polpa do tubérculo uma coloração alaranjada. Assim, a BDPA tem-se apresentado como alternativa viável para a suplementação alimentar, em especial para suprir a carência de vitamina A. Ainda, outras partes

da BDPA parecem apresentar componentes nutricionais importantes para a saúde (6).

As folhas de BDPA podem ser consumidas como uma hortaliça nas principais refeições, sendo fontes ricas em proteínas, vitaminas, minerais, fibras, compostos com propriedades antioxidantes como polifenóis, antocianinas, carotenoides, e vários outros micronutrientes. Deste modo, o estímulo ao consumo das folhas da BDPA é ferramenta importante na melhora do aporte de nutrientes benéficos à saúde, podendo ser coadjuvante no tratamento de comorbidades comuns na sociedade moderna, tais como a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (DCNT) (7)(8). Neste contexto, o consumo das folhas deste tubérculo, frequentemente descartadas, são fontes ricas de macro e micronutrientes essenciais à saúde (9).

No Brasil, a batata-doce e seus componentes representam um recurso natural renovável com indicativo etnográfico medicinal que, a ser validado, poderá diminuir a pressão de consumo sobre as substâncias medicinais de síntese química (7). Deste modo, pesquisas acerca do aproveitamento das partes não convencionais de alimentos, que possuem componentes funcionais com propriedades terapêuticas, estão sendo cada vez mais aprofundadas devido às limitações econômicas no país, e concomitantemente, surge uma grande preocupação com a qualidade nutricional dos mais variados produtos. Porém, a maioria destes produtos possui grande valor agregado, o que dificulta a aquisição e consumo frequente na população, sendo este, um fator relevante para que haja a busca de alimentos com propriedades funcionais de maior acessibilidade à população carente (10).

Assim, estas partes da planta tornam-se atraentes para contínuas pesquisas e futura aplicação na medicina. O aproveitamento integral da batata-doce, além de ser um método sustentável, pode atuar na prevenção de doenças que acometem grande parte da população, tais como as DCNT (doenças coronarianas, câncer) através da ação dos antioxidantes presentes nas partes que comumente são descartadas, principalmente nas folhas, promovendo melhora na qualidade de vida e longevidade.

O presente estudo avaliou os efeitos da suplementação da farinha obtida da folha da BDPA sobre o metabolismo, adiposidade e estresse oxidativo em ratos Wistar machos.

2 Material e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, de aproximadamente 28 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Cascavel. Em concordância com os princípios éticos para manipulação e procedimentos com os animais, conforme o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Anexo I). Assim que recebidos no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia (LAFEM), os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em grupos (2): 10 animais no Grupo Controle e 10 animais no Grupo Suplementado com farinha da folha de BDPA. Os animais ficaram acomodados durante todo o estudo em caixas de polipropileno, com cama de maravalha, em ambiente com temperatura de 24°C (\pm 2 °C), com ciclo de 12 horas de claro e escuro, dieta comercial Biobase 9301 e água à vontade.

Durante o estudo, os animais receberam:

- Grupo Controle – tratados diariamente com 2 mL de água via gavagem;
- Grupo Suplementado – tratados diariamente com 2 mL de suplementação, via gavagem, com a concentração de 1g/ml.

As folhas da BDPA foram adquiridas no município de Cascavel/PR (latitude 24°58'15.18"S e longitude 53°14'10.96"O). O clima é considerado Cfa (clima subtropical), com precipitação média anual superior a 1800mm, sem estação seca definida, com possibilidade de geadas durante o inverno. Solo Latossolo

Vermelho Distroférico, classificado de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (11)

Ao completar seis semanas de experimento, mediante jejum de 12 horas, os animais foram pesados, e previamente insensibilizados em câmara de CO₂ e decapitados em guilhotina. Imediatamente, após decaptação foi coletado sangue do tronco cerebral, em tubos heparinizados, foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga CentriBio® modelo 80-2B para a obtenção do plasma, o qual foi separado em tubos tipo microtubos, armazenados a -80°C em Ultrafreezer (Indrel® IUT 355D) para avaliar capacidade antioxidante total e perfil bioquímico.. A avaliação da capacidade antioxidante total plasmática e tumoral – TRAP. Os resultados foram analisados no software OriginLab 7.5 e expressos em nM de trolox (Trolox 0,5 mg/mL)

- a) Perfil Bioquímico: Hemograma: análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado a partir da eutanásia dos animais em tubos contendo heparina, utilizando um analisador automatizado hematológico ABBOTT, modelo Cell-dyn ruby. Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC), amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW), neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas; Perfil lipídico: Parte do soro obtido da coleta total de sangue foi utilizada para dosagem do perfil lipídico, com auxílio do analisador MINDRAY BS240 e kits

comerciais (Bioclin). Foram avaliados as concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, colesterol HDL e colesterol VLDL. Os resultados de colesterol LDL foram obtidos por meio da equação de Friedewald [LDL= Colesterol total – (Triglicérides/5) - HDL] (Santos *et al*, 2010). A mediana do índice triglicérides-glicemia, também conhecida como índice TyG foi calculado com a fórmula [TG (mg/dL) x *glicemia de jejum* (mg/dL)/2]. (12)

2.2 Coleta de órgãos e análises histológicas

Ao completar seis semanas de experimento, mediante jejum de 12 horas, os animais foram pesados, e previamente insensibilizados em câmara de CO₂ e decapitados em guilhotina. Foi realizada a coleta de sangue do tronco cerebral, a avaliação do comprimento naso-anal (CNA) para obtenção do índice de LEE, que é mensurado por meio da seguinte fórmula: [raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000] (13).

O fígado e a gordura retroperitoneal de cada animal foram retirados, submetidos ao procedimento de corte e pesados individualmente em balança analítica (Bel Engineering). O valor obtido dos órgãos coletados foi dividido individualmente pelo peso de cada animal e multiplicado por 100, para se obter um valor da gramagem por 100g.

Os tecidos do fígado e gordura retroperitoneal foram fixados em formaldeído a 10%, por 24 horas em frascos individuais e lavados em água corrente um a um durante 24 horas e conservados em álcool a 70°.

Para análise histológica, os tecidos adiposos viscerais foram desidratados, embebidos em parafina, seccionados em cortes de 5 μm por micrótomo semiautomático da marca Lupetec, e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histológica por microscopia ótica. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas e com auxílio do Software Image Pro Plus foram mensurados a área e o número de adipócitos.

Os tecidos hepáticos foram seccionados em cortes de 3 μm pelo mesmo micrótomo utilizado para a secção do tecido adiposo retroperitoneal e submetidos igualmente ao processo para análise histológica(14).

Os parâmetros histológicos que foram utilizados para avaliar o tecido hepático (13), que consistem em utilizar a coloração hematoxilina e eosina para averiguação de: Presença ou não de esteatoses macrovesicular e microvesicular; Infiltrado inflamatório e injúria hepatocelular, caracterizada pela balonização dos hepatócitos e pelos hialinos de Mallory; Depósitos de ferro; Presença de vacuolização glicogênica e da metaplasia ductular; Presença de fibrose, que, foi analisada quanto ao seu padrão de deposição e sua concentração. Se há dano hepatocelular, este é classificado como leve, levemente moderado, moderado e grave .

Para a determinação do tamanho das células adiposas do tecido gorduroso retroperitoneal já descrito na literatura (15).

2.3 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Teste T de Students foi usado quando os grupos apresentaram normalidade na distribuição. Mann-Whitney foi usado quando os pressupostos de normalidade não foram aceitos. O teste de normalidade usado, foi o Shapiro-Wilk. Para ambos os testes $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística e os gráficos foram realizados através do programa Prisma, na versão 7.0.

3 Resultados

Aos sessenta e nove dias de vida dos animais, observou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso corporal nos Grupos Controle e Grupo Suplementado. Já os dados de CNA nos ratos do Grupo Suplementado, apresentaram-se com redução significativa ($p < 0,05$) em relação aos ratos do Grupo Controle conforme demonstrados na Tabela I.

Para obtenção do índice de Massa Corpórea (IMC) em animais de experimentação, utiliza-se o Índice de Lee a partir dos dados de CNA, que é a razão da raiz cúbica do peso corporal (em gramas) sobre o CNA (em centímetros) multiplicado por 1000 (13). Entretanto, observou-se alteração significativa ($p < 0,05$) no Índice de Lee, demonstrando maiores níveis no Grupo Suplementado em relação ao Grupo Controle (Tabela I).

Níveis séricos de VLDL apresentaram-se significativamente inferiores nos ratos Wistar do Grupo Suplementado em relação ao Grupo Controle, o qual foi

suplementado com farinha de BDPA durante seis semanas. Os parâmetros sobre o ganho peso corporal, colesterol Total, HDL, Triglicerídeos, Tyg Índice, não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela I).

A avaliação de níveis de triglicerídeos, observada na tabela I não reflete diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos, porém, os valores obtidos indicam menor concentração de triglicerídeos séricos no grupo que recebeu a suplementação com a farinha da folha batata-doce biofortificada . Também não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no índice de TYG.

Os parâmetros hematológicos, observados na tabela II, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no RDW, nas plaquetas e no VPM entre os grupos estudados. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados entre o Grupo Controle e Grupo Suplementado.

Considerando os resultados obtidos, observa-se uma redução significativa na contagem de plaquetas e no volume globular médio no Grupo Suplementado. Além disso, a Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW), apresenta aumento significativo ($p < 0,05$) no Grupo Suplementado.

Foi demonstrado uma tendência a maiores níveis de CAT no Grupo suplementado com BDPA em relação ao Grupo Controle, conforme tabela 2 (TRAP - nM TROLOX).

O peso de tecido hepático apresentou-se significativamente ($p < 0,05$) mais elevado em ratos suplementados com folha de BDPA em relação ao grupo não suplementado (Controle).

De acordo com análises histopatológicas hepáticas, não foi encontrado efeitos na deposição de ferro e quaisquer alterações que indicassem infiltrados e/ou injúria hepatocelular, vacuolização ou ainda fibrose nos animais.

O peso de tecido adiposo visceral retroperitoneal foi maior em ratos do Grupo Controle, quando comparados aos animais do Grupo Suplementado, porém não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Outro parâmetro utilizado para averiguação da composição corporal em ratos, foi a massa dos depósitos de tecido adiposo visceral, utilizando-se a gordura retroperitoneal. Na figura 1d pode-se observar, através da análise histológica, que há uma menor quantificação dos adipócitos, decorrente de um maior volume celular no Grupo Controle também demonstrado na figura 4e. Os gráficos 1b e 1c conferem estatisticamente as imagens histológicas, corroborando para o resultado analisado de maior quantificação de adipócitos por área analisada e menor volume celular observado no Grupo Suplementado.

4 Discussão

A diferença entre o crescimento, expresso através do CNA, dos dois grupos do estudo pode ter sido resultante da alteração metabólica e redução de consumo da dieta comercial pelo Grupo Suplementado.

A presença de fatores antinutricionais nas folhas de BDPA como os oxalatos podem afetar o metabolismo de micronutrientes como cálcio e magnésio, essenciais à saúde óssea, pois estes compostos ligam estes minerais e

interferem em sua absorção (16).

Dentre os nutrientes presentes nas folhas de BDPA, destaca-se o elevado teor de fibras dietéticas. A fibra produz saciedade devido à distensão mecânica do estômago e aumenta o trânsito intestinal, contribuindo na diminuição da ingestão alimentar. Portanto, a presença de fibra dietética na suplementação com farinha da BDPA, pode acarretar na alteração do apetite, e em excesso, interferir no consumo de macro e micronutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento (17).

Na presente pesquisa, houve aumento significativo na Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW), no Grupo Suplementado. Efeito que pode ser atribuído ao teor de tanino presentes nas folhas de BDPA. Taninos, assim como os oxalatos, são metabólitos vegetais complexos que fazem parte de polifenóis e que podem, no entanto, ser considerados como antinutrientes que ligam minerais essenciais como ferro e reduzem significativamente sua biodisponibilidade (16).

As plaquetas sanguíneas possuem papel predominante na patogenia de doenças. O tamanho das plaquetas pode ser um indicador sensível de sua reatividade e sua magnitude é determinante na formação do trombo intracoronariano em presença de ruptura da placa aterosclerótica. Plaquetas grandes são metabólicas e enzimaticamente mais ativas que as pequenas e são refletidas pela elevação do volume plaquetário médio (VPM), levam a maior agregação e facilitam a formação do trombo, mostrando ser um fator de risco na angina instável (18).

Conforme achados neste estudo, o VPM encontrou-se aumentado nos animais suplementados e a contagem de plaquetas reduzidas. Há necessidade otimizar investigações a respeito da dosagem segura da folha de BDPA e correlacionar com a ativação plaquetária.

Os resultados demonstram melhora no perfil lipídico dos ratos suplementados com farinha da folha de BDPA, que podem ser relacionados com a presença de conteúdos fenólicos e fibras conforme asseguram achados na literatura.

Considerando que as folhas de BDPA apresentam em média 29% de fibras e que estes macronutrientes são importantes para prevenção de dislipidemias, aterosclerose e diabetes, espera-se que, a longo prazo, o consumo destes alimentos venha a contribuir para o controle de DCNT(18). Ainda, os compostos fenólicos presentes na BDPA e seus componentes representam potencial nas atividades antioxidantes que podem exercer efeitos cardioprotetores em humanos. Tem sido demonstrado que a ingestão destes compostos foi inversamente relacionada com a mortalidade por doença cardíaca. Compostos fenólicos apresentam diversas funções fisiológicas, portanto, folhas de batata-doce também podem ter propriedades fisiologicamente ativas esperadas por possuírem teores mais elevados destes compostos (20).

Na avaliação da eficácia do suco de folhas de *Aegle marmelos* (L), também conhecida como “marmeleiro da Índia”, por 60 dias entre indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 por quatro semanas obtiveram resultado semelhante a esta pesquisa quanto à redução de triglicéridos e LDL-colesterol, além de melhora na atividade antioxidante. Os autores atribuem tais resultados também devido à

presença de antioxidantes presentes na folha (21) .

Um estudo realizado com os efeitos hipolipidêmicos de uma mistura de folhas e flores de trigo sarraceno em pó em ratos machos alimentados com uma dieta rica em gordura. As concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos foram significativamente menores no grupo suplementado com mistura de folhas e flores de trigo sarraceno do que no grupo não suplementado. Sugeriu-se que tais efeitos foram obtidos através do aporte de compostos fenólicos e fibras com a suplementação com folhas e flores de trigo sarraceno (22).

A tendência na elevação das concentrações séricas de antioxidantes no Grupo Suplementado deste estudo, coaduna com a literatura que indica a importância do consumo de alimentos com elevada CAT.

O plasma sanguíneo constitui a fração líquida do sangue. Aproximadamente 90% do mesmo é composto por água, na qual estão dissolvidas substâncias existentes no sangue. Além de vitaminas antioxidantes, outros compostos bioativos, como polifenóis, podem ser absorvidos e prevenir a oxidação das LDL plasmáticas (23). Há elevada capacidade antioxidante em folhas de batata-doce e também correlação positiva entre esta característica e o elevado conteúdo de polifenóis presente nas folhas (20).

Outras pesquisas também já evidenciaram que o teor de antioxidantes e atividade antioxidante encontrados em folhas de variedades de batata-doce é significativamente superior ao encontrado em toda a raiz, polpa, e cascas deste

tubérculo, bem como comparado a outros vegetais comerciais mais comuns (24) (25) (26).

Marcadores importantes da síndrome metabólica, condição clínica caracterizada pela obesidade central, dislipidemias (hipertrigliceridemia por exemplo), resistência à insulina e hipertensão arterial sistêmica, como a proteína C-reativa (PCR), estão elevados nesta doença e apresentam correlação inversa com os níveis de CAT presente no plasma (27). A ingestão de alimentos contendo antioxidantes pode aumentar a CAT do sangue e dos fluidos biológicos. Neste sentido, (27) a ingestão de uma refeição com alimentos ricos em compostos fenólicos pode aumentar a CAT plasmática de indivíduos saudáveis(28).

A prática de consumo de alimentos com elevada CAT está associada à diminuição das reações oxidativas cerebrais, e melhoria das funções neurocognitivas em ratos idosos., os mecanismos para este efeito protetor são a remoção direta de radicais livres e a estabilização funcional das mitocôndrias neuronais. Em outras pesquisas, a ingestão de alimentos com elevada CAT esteve associada à redução dos valores plasmáticos de biomarcadores da inflamação crônica (proteína C reativa) e do dano hepático, e à redução dos níveis séricos de CAT em ratos cirróticos (29).

As análises histopatológicas descartam efeitos relacionados à lesão hepática ou alterações no depósito de ferro. Assim, pode-se inferir que não há efeito da adição de farinha de folhas de batata-doce biofortificada sobre a integridade do parênquima hepático.

A redução do volume dos adipócitos no Grupo Suplementado, observados neste estudo, sinalizam menor acúmulo de gordura visceral promovido pela suplementação com farinha da folha de BDPA. Este efeito pode ser atribuído aos compostos fenólicos presentes na folha da BDPA, especialmente as antocianinas, que exercem efeitos benéficos, pois reduzem a resistência à insulina, à inflamação e estresse oxidativo em tecidos musculares e tecido adiposo (30).

Em um estudo utilizando a suplementação alimentar com *Spirulina platensis*, nas doses de 50 e 100mg/kg para avaliar resultados quanto à mudança da dieta, simulando um processo de reeducação alimentar, observou-se que o composto, que possui compostos bioativos, teve a capacidade de reverter a obesidade, através da peroxidação lipídica no tecido adiposo em ratos Wistar, resultando na redução na gordura retroperitoneal em relação ao Grupo Controle (31).

Na avaliação da associação do uso da polpa de camu-camu (*Myrciaria Dúbia HBK McVaugh*) com tratamento da obesidade, os autores verificaram menor depósito de gordura visceral em ratos Wistar, redução significativa de perfil lipídico e controle glicêmico. Os autores sugerem que o camu-camu podem ter contribuído para a redução dos depósitos de gordura resultante da peroxidação lipídica através da ação antioxidante do ácido ascórbico e, associam com efeitos anticâncer e prevenção de danos hepáticos e cerebrais (32).

A partir dos dados encontrados neste estudo, pode-se concluir que as folhas de BDPA podem influenciar positivamente na melhora da resposta inflamatória, sendo expressa através da redução no perfil lipídico e redução do acúmulo de gordura nos adipócitos. Assim, por apresentar compostos bioativos, a adição da

folha de BDPA na dieta humana é capaz de contribuir para a saúde, especialmente no combate aos radicais livres e conseqüentemente prevenção de danos relacionados ao estresse oxidativo, como as DCNT (diabetes, câncer e doenças coronarianas). Além de utilizar uma parte do vegetal que comumente é descartada, devido à ausência de informações a respeito dos seus benefícios e contribuir na redução do desperdício de recursos naturais e financeiros. Faz-se necessária a prática de inativação de compostos antinutricionais a fim de evitar comprometimento na absorção de minerais essenciais à saúde.

Reconhecimento

Esta pesquisa foi realizada graças ao Programa de pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. Contou com o auxílio de colaboradores e pesquisadores da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus de Cascavel, Paraná, Brasil, principalmente do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo e Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde por se prestarem sempre solícitos e pacientes. Luciana Kottwitz, Sabrina Grassioli, Milara Moi, Fábio Negretti, Rafael Andrade Menolli, Leonardo Paixão da Silva, Diane Maschio de Souza, Mateus Ricardo Garbim e Ademar Pinezi Junior, contribuíram para análise de dados e interpretação dos resultados. Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de fomento público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

5 Referências

1. Tanumihardjo SA, Ball AM, Kaliwile C, Pixley K V. The research and implementation continuum of biofortified sweet potato and maize in Africa. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1390(1):88–103.
2. Drapal M, Rossel G, Heider B, Fraser PD. Metabolic diversity in sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam.) leaves and storage roots. *Hortic Res* [Internet]. 2019;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41438-018-0075-5>
3. Infante RA, Natal DIG, Moreira ME de C, Bastiani MID, Chagas CGO, Nutti MR, et al. Enriched sorghum cookies with biofortified sweet potato carotenoids have good acceptance and high iron bioavailability. *J Funct Foods.* 2017;38:89–99.
4. Soares IM, Bastos EGP, Da Silva Peixoto Sobrinho TJ, Da Costa Alvim T, Da Silveira MA, De Souza Aguiar RW, et al. Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de diferentes cultivares de *ipomoea batatas* (L.) lam. obtidas por melhoramento genético para produção industrial de etanol. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2014;35(3):479–88.
5. Nutti MR, Carvalho JLV De, Watanabe E. A biofortificação como ferramenta para combate a deficiências em micronutrientes [Internet]. Vol. 3, Embrapa Agroindústria de Alimentos. 2010. p. 43–63. Available from: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/994883/1/2006026.pdf>
6. Islam S. R : Concise Reviews / Hypotheses in Food Science Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L .) Leaf : Its Potential Effect on Human Health and Nutrition. *J Food Sci.* 2006;71(2):13–21.
7. José AE, Carvalho HHC, Wiest JM. Avaliação do efeito antibacteriano de extratos de folhas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) frente a bactérias de interesse em alimentos e correlação com os compostos fenólicos. *Rev Ceres.* 2015;62(5):421–9.
8. Laurie SM, Faber M, Claasen N. Incorporating orange-fleshed sweet potato into the food system as a strategy for improved nutrition: The context of South Africa. *Food Res Int* [Internet]. 2018;104:77–85. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.016>

9. Michels JP. O CONSUMO DE BATATA-DOCE DE POLPA ALARANJADA ENTRE FAMÍLIAS RURAIS DO NORDESTE DE MOÇAMBIQUE: um estudo sobre percepções de comida e Segurança Alimentar na província de Nampula. Diss apresentada ao Programa Pós- Grad em Desenvolv Rural da Univ Fed do Rio Gd do Sul. 2010;178.
10. PEREIRA MCDA. Casca De Banana E Do Fermentado. Tese apresentada à Univ Fed Lavras. 2007;147.
11. Cerdà a., Brazier RE, Nearing M, Vente J. Calendario_De_Solos_2013.Pdf. 2013.
12. Guerrero-Romero F, Simental-Mendia LE, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Ramos-Zavala MG, Hernández-González et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity, Comparasion with the euglycemichyperinsulinemic clamp. J Clin Endocrinol Metab. 2010; 95(7): 3347-51
13. Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Bitencurt JL, Resende-Neto JM, Barreto AS, et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus novergicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Sci Plena [Internet]. 2010;6(10):106101. Available from: <http://www.scienciaplenua.org.br/sp/article/view/144>
14. Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R. Capítulo 3 - Técnicas Histológicas. Conceitos e Métodos para Formação Profissionais em Laboratórios Saúde Vol 2. 2010;89–188.
15. Hirsch J, Gallian E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. J Lipid Res. 1968;9(1):110–9.
16. Ooko Abong' G, Muzhingi T, Wandayi Okoth M, Ng'Ang'A F, Ochieng' PE, Mahuga Mbogo D, et al. Phytochemicals in Leaves and Roots of Selected Kenyan Orange Fleshed Sweet Potato (OFSP) Varieties. Int J Food Sci. 2020;2020.
17. Piedade J, Canniatti-Brazaca SG. Comparação entre o efeito do resíduo do

- abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2003;23(2):149–56.
18. Skalski B, Stochmal A, Żuchowski J, Grabarczyk Ł, Olas B. Response of blood platelets to phenolic fraction and non-polar fraction from the leaves and twigs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2020;124(October 2019).
 19. Conrad KB, Louis ENJ, Beatrice ND, Festus AN, Nelson NN, Geneva ON, et al. Sweet potatoes in Cameroon: Nutritional profile of leaves and their potential new use in local foods. *African J Agric Res.* 2014;9(18):1371–7.
 20. Islam S. Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf: Its Potential Effect on Human Health and Nutrition. *J Food Sci* [Internet]. 2006;71(2):R13–121. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08912.x>
 21. Nigam V, Nambiar VS. Aegle marmelos leaf juice as a complementary therapy to control type 2 diabetes – Randomised controlled trial in Gujarat, India. *Adv Integr Med* [Internet]. 2019;6(1):11–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2018.03.002>
 22. Jung EL, Männistö S, Spiegelman D, Hunter DJ, Bernstein L, Van Den Brandt PA, et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: A pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009 Jun 1;18(6):1730–9. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-09-0045>
 23. GIADA M de LR. Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada. 2006;83:28–31.
 24. Truong VD, McFeeters RF, Thompson RT, Dean LL, Shofran B. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. *J Food Sci.* 2007;72(6):343–9.
 25. Sun H, Mu B, Song Z, Ma Z, Mu T. The In Vitro Antioxidant Activity and Inhibition of Intracellular Reactive Oxygen Species of Sweet Potato Leaf Polyphenols. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:11.

26. Jang Y, Koh E. Antioxidant content and activity in leaves and petioles of six sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and antioxidant properties of blanched leaves. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2019;28(2):337–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0481-3>
27. Brighenti F, Valtueña S, Pellegrini N, Ardigò D, Del Rio D, Salvatore S, et al. Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *Br J Nutr*. 2005;93(5):619–25.
28. Prior RL, Gu L, Wu X, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, et al. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(2):170–81.
29. Ferrari CKB. Functional foods, herbs and nutraceuticals: Towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*. 2004;5(5):275–89.
30. Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2013 Nov;24(11):1777–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286313001277>
31. FERREIRA, E. S. O Introdução. 2017;0–139.
32. do Nascimento OV, Boleti AP de A, Schwertz M, Lima ES. Dietary supplementation with Camu-camu and continuous exercises in the treatment of obesity. *Rev Nutr*. 2018;31(1):25–33.

6 Apêndices

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros antropométricos e metabólicos em ratos suplementados ou não com folha da BDPA.

Parameter	Control (N=10)	Supplemented (N=9)	P-value
Wheight gain	101.4±34.05	98.67±32.12	0.8597
HGT	99,91± 4,65	118,6± 20,02	0,8867
CNA	2251 ± 1.233	21.54±0.6167	0.0208*
Index Lee	293.1 ± 9.508	305.7±4.234	0.0019*
Total Cholesterol (mg/dL)	48.32 ± 3.005	48.72 ± 1.935	0.9157
HDL (mg/dL)	36.14 ± 2.410	37.28 ± 2.341	0.7414
VLDL (mg/dL)	21.35 ± 2.541	15.61 ± 2.332	0.0329*
Triglycerides (mg/dL)	87.30 ± 13.35	58.25±5.82	0.0671
Index Tyg	4.57±0.083	4,66±0.11	0.519

Valores médios ± desvios-padrão. Valores seguido pelo símbolo () na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste t student; O símbolo de duplo-hífen (--) representa o dado que não foi possível obter devido ineligibilidade em valores obtidos em mensuração de LDL. Peso corporal, Hemoglicoteste (HGT), Comprimento naso-anal (CNA), Valores correspondentes ao ganho de peso, CNA, Índice de Lee, perfil lipídico e Tyg Índice em ratos Wistar machos do Grupo Controle, que foram alimentados com dieta comercial e água "ad libitum", e Grupo Suplementado, alimentados com dieta comercial e água "ad libitum" e suplementados com farinha da folha da BDPA. HDL = High Density Lipoprotein; LDL = Low Density Lipoprotein; VLDL = Very Low Density Lipoprotein; Tyg Índice = relação entre triglicerídeos e glicose;

Tabela 2 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos (hemograma) dos ratos submetidos ou não à suplementação com farinha da folha da BDPA

Blood Count	Control (n=10)	Supplemented (n=9)	p-value
Neutrophils (%)	0,251± 0,653	0,264± 0,149	0,7881
Lymphocytes (%)	0,157±0,078	0,148±0,118	0,5363
Monocytes (%)	0,044±0,041	0,034±0,036	0,645
Eosinophils (%)	0,009±0,008	0,006±0,006	0,1799
Basophils (%)	0,076±0,112	0,030±0,025	0,589
Red Cells (mm ³)	3,369±0,555	3,578±0,366	0,353
Hemoglobin (g/dL)	5,907±0,958	6,241±0,597	0,588
Hematócrito (%)	18,55±03,119	19,86±2,015	0,299
VGM (fL)	54,99±1,075	55,54±0,719	0,067
HGM (pg)	17,54±0,490	17,47±0,269	0,696
CHCM (g/dL)	31,91±0,511	31,43±0,424	0,611
RDW (%)	9,49±0,272	10,22±1,288	0,017*
Platelets (mm ³)	33,3± 22,00	12,13±7,378	0,0016*
Mean Platelet Volume	5,285±0,558	6,511±1,497	0,027*
TRAP (nM TROLOX)	1115±153,2	1526±166,5	0,08

Valores médios ± desvios-padrão. Valores seguidos pelo símbolo (*) na mesma linha diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste *t student*. VGM = Volume Globular Médio; HGM = hemoglobina globular média; CHCM: concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW=Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos; VPM= Volume Plaquetário Médio;

Figura 1. Peso e adipócitos da gordura retroperitoneal de ratos Wistar machos suplementados ou não com farinha da folha de BDPA

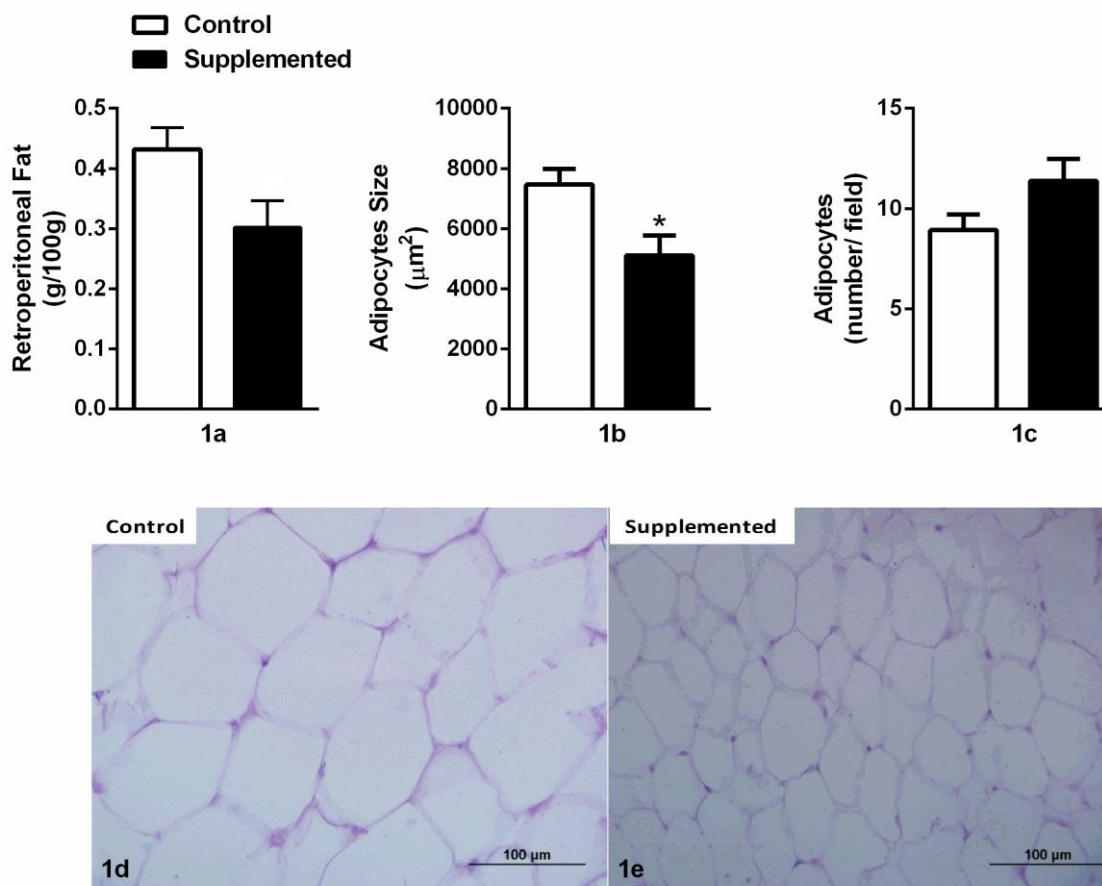


Figura 1- Peso e adipócitos da gordura retroperitoneal de ratos Wistar machos suplementados ou não com farinha da folha de BDPA: 1a) Peso do tecido hepático do Grupo Controle e Grupo Suplementado de ratos Wistar machos 1b.) adipócitos da gordura retroperitoneal dos animais do Grupo Controle; 1c) adipócitos da gordura retroperitoneal dos animais do Grupo Suplementado; 1d) gráfico comparativo referente ao número de adipócitos dos ratos do Grupo Suplementado e Grupo Controle; 1e) gráfico comparativo referente ao tamanho dos adipócitos dos ratos do Grupo Suplementado e Grupo Controle. Valores representados pelo gráfico em barra seguido pelo símbolo (*) diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste t student.

Figura 2. Peso do tecido hepático (fígado) do Grupo Controle e Grupo Suplementado de ratos Wistar machos

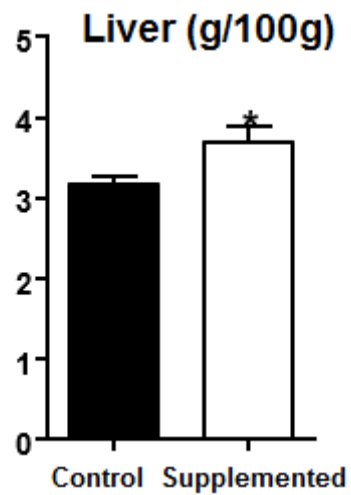


Figura 2 Peso do tecido hepático (fígado) do Grupo Controle e Grupo Suplementado de ratos Wistar machos. Valores representados pelo gráfico em barra seguido pelo símbolo (*) diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste t student.

ANEXO 1. – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Autorização

O protocolo intitulado “**Avaliação de folha da batata doce biofortificada no controle glicêmico em ratos wistar portadores de diabetes tipo 2**”, sob a responsabilidade de **Luciana Bill Mikito Kottwitz** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 07/12/2018.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/02/2019 - 01/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos: <i>Rattus norvegicus</i> , Wistar
N. de animais	40
Peso/Idade	200-300g/adultos
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Cascavel.

Cascavel, 10/12/2018


Prof. Dr. Dirceu Baumgartner Vice-

Coordenador do CEUA Portaria nº

3730/2016 – GRE

ANEXO 2. REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA NUTRITION RESEARCH



NUTRITION RESEARCH

An International Publication for Nutrition to Advance Food and Life Science Research

AUTHOR INFORMATION PACK



ISSN: 0271-5317

DESCRIPTION

Nutrition Research publishes original research articles, communications, and reviews on basic and applied nutrition. The mission of Nutrition Research is to serve as the journal for global communication of nutrition and life sciences research on diet and health. The field of nutrition sciences includes, but is not limited to, the study of nutrients during growth, reproduction, aging, health, and disease. Original research articles must declare a research hypothesis and include aspects of mechanisms. Reviews are open to systematic reviews and meta-analyses but the review must provide a critical analysis of existing nutrition evidence, identify gaps in knowledge, and include recommendations for future research. Communications are limited in length and preliminary data that addresses a potential mechanism is acceptable. Authors are encouraged to read and follow the Guide for Authors and Author Submission Checklist.

Articles covering basic and applied research on all aspects of nutrition sciences are encouraged, including: nutritional biochemistry and metabolism; metabolomics, nutrient gene interactions; nutrient requirements for health; nutrition and disease; digestion and absorption; nutritional anthropology; epidemiology; the influence of socioeconomic and cultural factors on nutrition of the individual and the community; the impact of nutrient intake on disease response and behavior; the consequences of nutritional deficiency on growth and development, endocrine and nervous systems, and immunity; nutrition and gut microbiota; food intolerance and allergy; nutrient drug interactions; nutrition and aging; nutrition and cancer; obesity; diabetes; and intervention programs.

Another focus of the Journal is to publish research that advances the understanding of nutrients and health protectants in food for improving the human condition. Of interest are manuscripts on the development of biomarkers for assessing how dietary components influence health status in the human. A further publishing goal of Nutrition Research is to bridge the gap between clinicians working in nutrition and health and biomedical scientists engaged in areas of biochemistry and molecular and cell biology to improve health. Investigators doing research in these areas are urged to submit articles.

The Journal also encourages submission of manuscripts describing investigations in animal models and cell cultures that utilize methodologic approaches or techniques in biochemistry, immunology, molecular biology, toxicology, and physiology. Such investigations must include clear research objectives for hypothesis testing and elucidating mechanisms. Nutrient intakes in human populations and novel analytical techniques for bioactive compounds are within the scope of the mission for Nutrition Research.

Nutrition Research is the sponsor for the David Kritchevsky Graduate Student Award, which recognizes graduate and professional students that publish outstanding articles in the Journal. Two awards are presented annually, with a US \$1,000 stipend presented to the recipient young scientists. Use of human subjects should include information about the subjects such as registered with clinicaltrials.gov. Please refer to <https://clinicaltrials.gov>. Use of first person language should be used with regard to people with obesity. Please refer to <https://academic.oup.com/ajcn/article/108/1/201/5049689>. All animal studies that utilize dietary treatments must provide a table listing the ingredients in g/kg to total 1000. Please refer to the editorial <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531719302441>.

Benefits to authors: Article-based publishing, rapid review, no page charges, free color images online, and other author services.

AUDIENCE: Nutrition Scientists, Dietitians, Physicians, Biochemists, Epidemiologists.

IMPACT FACTOR: 2018: 2.627 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Web of Science

Index to Scientific Reviews

BIOMED

Science Citation Index

Elsevier BIOBASE

Reference Update

Current Contents - Life Sciences

PubMed/Medline

PubMed/Medline

Embase

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: **Bruce A. Watkins**, University of California Davis Department of Nutrition, California, United States

Regional Editors: **Philip Calder**, University of Southampton, United Kingdom, Region: United Kingdom. **Young-Hee Kang**, Hallym University, South Korea, Region: South Korea. **Brenda J. Smith**, Oklahoma State University Stillwater, Stillwater, Oklahoma, United States. Region: North America. **Helen Truby**, Monash University, Victoria, Australia, Region: Australia. **Mark Wahlqvist**, Monash University, Australia and Zhejiang University, Hangzhou, China, Regions: China, Hong Kong, and Taiwan. **Hope A. Weiler**, McGill University, Canada, Region: Canada

Editorial Advisory Board: **Donald Beitz**, Iowa State University, Ames, Iowa, United States. **Kevin L. Fritsche**, University of Missouri, Columbia, Missouri, United States **Ruth S. MacDonald**, Iowa State University, Ames, Iowa, United States. **Sue A. Shapses**, Rutgers The State University of

New Jersey, New Brunswick, New Jersey, United States **Cornelia M. Ulrich**, German Cancer Research Centre, Salt Lake City, Utah, USA **Hope A. Weiler**, McGill University, Montréal, Quebec, Canada

Board of Review Editors: **G. Harvey Anderson**, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada. **John Anderson**, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States **Bradley Bolling**, University of Wisconsin Madison, Madison, Wisconsin, United States. **Jennie Brand-Miller**, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia **Richard S. Bruno**, OHIO STATE UNIVERSITY, Columbus, Ohio, United States **Wayne Campbell**, Purdue University, West Lafayette, Indiana, United States **Gemma Casadesus Smith**, Kent State University, Kent, Ohio, United States **Wendy Dahl**, University of Florida, Gainesville, Florida, United States. **Mario G. Ferruzzi**, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, United States **Emma Foster**, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom **Philippe Frank**, University of Tours, Tours, France. **William S. Harris**, University of South Dakota, Vermillion, South Dakota, United States **Kate Huggins**, Monash University, Clayton, Victoria, Australia. **Amanda B. Hummon**, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, United States **Catherine Itsiopoulos**, La Trobe University, Melbourne, Victoria, Australia. **Darshan S. Kelley**, USDA-ARS, Western Human Nutrition Research Center, Immunity and Disease Prevention Research, Davis, California, United States. **Jennifer Kerns**, Washington DC VA Medical Center, Washington, District of Columbia, United States **Marlena Kruger**, Massey University, Palmerston North, New Zealand **Christel Lamberg-Allardt**, University of Helsinki, Helsinki, Finland. **Alessandro Laviano**, University of Rome La Sapienza, Rome, Italy **David Ma**, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. **Kenneth N. Maclean**, University of Colorado Denver School of Medicine, Aurora, Colorado, United States **Maria L. Marco**, University of California Davis, Davis, California, United States. **Denis Medeiros**, University of Missouri Kansas City, Kansas City, Missouri, United States **Nancy E. Moran**, BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE, Houston, Texas, United States. **John W. Newman**, US Department of Agriculture, Washington, District of Columbia, United States **Nora O'Brien**, University College Cork National University of Ireland, Cork, Ireland **Aifric O'Sullivan**, University College Dublin, Dublin, Ireland. **Jung Han Yoon Park**, Hallym University, Chuncheon, Korea, Republic of **Sunmin Park**, Hoseo University, Asan, Korea, Republic of. **Yongsoo Park**, Hanyang University Department of Food and Nutrition, Seongdong-gu, Korea, Republic of **Kristina Rother**, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, Maryland, United States. **Satoshi Sasaki**, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan **Chwan-Li (Leslie) Shen**, TEXAS TECH UNIVERSITY, Lubbock, Texas, United States **Vivian M.M. Suen**, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil. **Susanne U. Talcott**, Texas A&M University College Station, College Station, Texas, United States **Stella L. Volpe**, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania, United States. **Dayong Wu**, Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Boston, Massachusetts, United States. **Steven H. Zeisel**, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States **Angela Zivkovic**, University of California Davis, Davis, California, United States

Editorial Manager

Angela Ranalli-Curtis, University of California Davis, Davis, California, United States

INTRODUCTION

Nutrition Research publishes research articles, communications, and reviews on all aspects of basic and applied **nutrition**. The mission of Nutrition Research is to serve as the journal for global communication of nutrition and life sciences research on **diet** and **health**. The field of **nutritional sciences** includes, but is not limited to, the study of nutrients during growth, reproduction, aging, and disease.

Articles covering basic and applied research on all aspects of nutritional sciences are encouraged, including: nutritional biochemistry and metabolism; metabolomics, nutrient and gene interactions; nutrient requirements in health and disease; digestion and absorption; nutritional anthropology and epidemiology; the influence of socioeconomic and cultural factors on nutrition of the individual and the community; the impact of nutrient intake on disease response, work performance and behavior; the consequences of nutritional deficiency on growth and development, endocrine and nervous

systems, and immunity; food intolerance and allergy; nutrient drug interactions; nutrition and aging; nutrition and cancer; obesity; diabetes; and intervention programs.

A principal focus of the journal is to publish research that advances the understanding of **nutrients** and **health protectants** in food for improving the human condition. Of interest are manuscripts on the development of biomarkers for assessing how dietary components influence health status in the human.

The journal also encourages submission of manuscripts describing investigations in animal models and cell cultures that utilize methodologic approaches or techniques in biochemistry, immunology, molecular biology, toxicology, and physiology. Epidemiologic studies on nutrient and phytochemical intakes in human populations and novel analytical techniques for these compounds are within the scope of the mission for Nutrition Research.

Dr. Bruce A. Watkins, Editor-in-Chief (baw@purdue.edu or bawatkins@ucdavis.edu)

Angela Ranalli-Curtis, Managing Editor (alrcurtis@gmail.com)

Nutrition Research

Department of Nutrition

University of California, Davis

One Shields Avenue

3135 Meyer Hall

Davis, CA 95616-5270, USA

BEFORE YOU BEGIN

Submission Checklist

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Nutrition Research has a policy to follow all aspects of publication ethics and depends on the authors of submitted manuscripts to provide complete information on conflict of interests for the execution of research and data collection. The editorial office and publishers of Nutrition Research rely on the authors and their respective institutions to follow the policies to preserve scientific integrity in research and support publication ethics. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which

forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints: Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language: Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions: For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Authorship: All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights:As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.Elsevier supports responsible sharing.Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source:You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access:Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information. Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services): Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Informed consent and patient details:Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission:Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article:Please submit your article via our online system, EVISE

Referees:Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Research articles and Reviews should generally not exceed 6000 words and Communications should not exceed 2,500.

Each manuscript submitted must provide a title page, list of abbreviations, abstract page, introduction, methods and materials, results, discussion, list of references, and appropriate presentation of data in tables and figures. In some cases, the results and discussion sections can be combined (e.g., communications).

Text must be in 12-point font (Times New Roman or Arial), double-spaced, with 1-inch margins. Consecutive line numbers must be included in the left margin, starting with the title page and

ending with the reference section. Page numbers must be included in the bottom right-hand corner of each page. Text must be aligned to the left only and include 2 hard returns at the end of each paragraph, heading, and subheading.

Text should be clear and concise. Tables, figures and references must be cited in sequence in the text. Past tense should be used in reference to the work on which the paper is based, while present tense is normally limited to existing knowledge and prevailing concepts. Previous knowledge and new contributions should be clearly differentiated.

Peer review:This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software:It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Embedded math:If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information

(https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/). Displayed formulae should be numbered consecutively throughout the manuscript as (1), (2), etc. against the right-hand margin of the page. In cases where the derivation of formulae has been abbreviated, it is of great help to the referees if the full derivation can be presented on a separate sheet not to be published.

Article structure

Subdivision - numbered sections:Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Glossary:Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Abbreviations and Symbols:Use only standard abbreviations (Scientific Style and Format, The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th ed. Council of Biology, Chicago IL 1994). Abbreviations should not be used in the title or major headings. The full term for which an abbreviation stands for should precede its first use in the text.

Appendices:If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Is responsible for ensuring that all research protocols were approved and for ethical execution of the research. Will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date. The requirements for the corresponding author are detailed in the Author Submission Checklist which must be completed for manuscript submission.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights: Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights. Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract: A concise and factual abstract is required. The abstract (limited to 250 words) should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Experimental Diets: All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds

Statistical Methods: Tests of statistical analysis must be fully described. Statements about statistical significance of results must be accompanied by indications of the level of significance. This information must be included where numerical and graphic presentation of data is made in the manuscript in footnotes to tables and in the captions of figures rather than in the text only. Also in the statistical methods section of the manuscript, indicate how the data are presented. For example, means - standard deviation must be shown. Always take special care to present only the significant figures for a measurement and appropriate sample size relevant to a power analysis

Acknowledgements: Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units: Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes: Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.
Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services: Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions: Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each table on its own page.
- Use minimal horizontal lines and no vertical lines.
- Must have a description so that reader can understand the table without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data and properly referenced.
- Tables must be in an editable (word) file.

* All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds.

References

Citation in text: Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links: Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/nutrition-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples: Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also *Samples of Formatted References*).

Journal abbreviations source: Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to

make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please

note an open access fee of 600 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Submission Checklist

- Please refer to the Author Submission Checklist which needs to be completed and included when submitting your manuscript to the journal
- The checklist must be completed and signed by the Corresponding Author and uploaded as a "supporting file" during the submission process.

Document File

- Title page - page 1

Title - single, declarative statement, stating the major finding of the work.

First name, Middle initial, and Last name of each author (no titles such as MD or PhD).

The affiliations of each author noted with superscripts.

Complete contact information for corresponding author.

Running heads, word counts, and any other information other than that stated above should not be included.

- Abbreviations page - page 2

Must include 1 abbreviation with meaning per line.

Abbreviations should be listed first followed by a semicolon and then the meaning.

Abbreviations must be spelled out when used in the text for the first time.

- Abstract page - page 3

A single, double-spaced paragraph (250 word limit) that includes the hypothesis for the study, experimental design, use of the model for the study, major results, and conclusion. Do not include subheadings in this section.

It must follow the same format as the rest of the text (alignment, spacing, line numbering, etc.).

- List of at least 5 keywords/phrases taken from the medical subject headings of the Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) below the abstract. The model used in the study must be included in the keywords.
- Manuscript text
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- Main headings and subheadings must be numbered with Arabic numerals.
- Text must start on a new page and include the following main headings:

Introduction - must state the hypothesis for the research and the supporting objectives to test the hypothesis. Must also state how this study advances human nutrition.

Methods and materials - must explain the experimental design, control and treated groups; details of ingredient composition of diets should be presented in a table; all procedures and techniques must be explained and referenced; method of euthanasia for experimental animals must be stated; statistical analyses section must be complete with information on data presentation; must contain statistical tests and appropriate references; and must include an institutional statement of protocol approval for animal or human subjects (human consent is required). Results - must thoroughly describe the data presented in tables and figures.

Discussion- should contain a specific description of the literature findings relevant to the results of the current investigation but not go beyond the data presented in the results. The limitations of the study should be included in this section.

Acknowledgment (note spelling).

- Technical or editorial assistance must be acknowledged.
- Financial (grants or gifts) and other support as deemed as appropriate for the study must be indicated.

Do not include author contributions or individual titles (i.e., Dr., PhD, etc..) in this section. If there is a conflict of interest, that must be stated in this section.

- References

Number consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. In-text citations and reference list numbers must be enclosed within brackets, e.g., [1,2].

The author should make certain that there is a strict one-to-one correspondence between references cited in the text and those in the reference list.

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative

methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES: Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier>

ANEXO 3. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA NUTRITION RESEARCH

POSITIVE EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH BIOFORTIFIED SWEET POTATO LEAF FLOUR ON METABOLISM, ADIPOSITY AND OXIDATIVE STRESS IN MALE WISTAR RATS

Scientific article to be submitted to the NUTRITION RESEARCH Magazine

Ellen Kayumi Mariano Sawazaki^{a, *}, Sabrina Grassioli^b, Diane Maschio de Souza^b, Matheus Ricardo Garbim^b, Fábio Negretti^c, Maria Elisabete Fagundes^a, Ademar Pinezi Junior^b, Rafael Andrade Menolli^b, Leonardo Paixão da Silva^d, Suzana Bender^b, Luciana Bill Mikito Kottwitz^b

^a State University of Western Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.

^bState University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil.

^c Laboratório Prevenção e Diagnose – Anatomia Patológica e Citopatológica, Cascavel, Paraná, Brasil.

^d Laboratório de Análises Clínicas – Posto Médico de Guarnição de Cascavel, PMGU/CSC, Cascavel, Paraná, Brasil.

*Corresponding author. Tel: +55 49 99820 5370.

E-mail address: ellen.kms@gmail.com (E.K.M. Sawazaki), sgrassioli@gmail.com (S. Grassioli), dianemaschio6@gmail.com (D. Maschio), matheusgarbim@gmail.com (M. R. Garbim), fnegretticascavel@hotmail.com (F. Negretti), bethy_fg@hotmail.com (M. E. Fagundes), pinezijr@gmail.com (A. Pinezi Junior), ramenolli@hotmail.com (R.A.MENOLLI) leopaixao78@gamil.com (L.P.SILVA), suzanabender@hotmail.com (S. Bender), lukottwitz@yahoo.com.br (L. B. M. Kottwitz).

Abbreviations

AOX; Depletion of Antioxidants

OFSP; Orange Fleshed Sweet Potato

TAC(CAT); Total Antioxidant Capacity

MCHC; Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

CNCD; Chronic Non-Communicable Diseases

EMBRAPA; Brazilian Agricultural Research Corporation

FAO; Food and Agriculture Organization of the United Nations

HB; Hemoglobin

MCH; Mean Corpuscular Hemoglobin

HDL; High Density Lipoprotein

HTC; Hematocrit

IBGE; Brazilian Institute of Geography and Statistics

GI; Glycemic Index

LDL; Low Density Lipoproteins

MAPA; Ministry of Agriculture, Livestock and Supply

MCV(VCM); Mean Corpuscular Volume

WHO(OMS); World Health Organization

RBC; Red Blood Cells

RDW; Red Cell Distribution Width

WBC; White Blood Cells

POSITIVE EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH BIOFORTIFIED SWEET POTATO LEAF FLOUR ON METABOLISM, ADIPOSITY AND OXIDATIVE STRESS IN MALE WISTAR RATS

Orange-fleshed Sweet Potato - OFSP, refers to one of the food crops obtained by biofortification. The study of the OFSP leaves can therefore expand its use and provide new elements with additional nutritional values for health promotion. The present study evaluated the effect of supplementing the flour obtained from the OFSP leaf on the adiposity and metabolic conditions of Wistar rats. The research has a basic experimental character, being performed with Wistar rats (n = 20) divided into Supplemented Group (n = 10), which received 2g of OFSP flour in 2mL of water via gavage, administered during 6 weeks. Unsupplemented rats received the same volume of water without the flour. At 69 days old and after 12 hours of fasting, the rats were weighed, measured the naso-anal length to calculate the Lee index and collected whole blood for analysis of: glucose, blood count, lipid profile and total antioxidant capacity TAC. The histology of the adipose and hepatic tissue was performed. The data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Student's t-test for normal distribution. P <0.05 were considered statistically significant. As main results, lower weight and lower adipocyte volume were obtained in visceral fat and there was a reduction in VLDL-cholesterol in the Supplemented Group. It can be concluded that the OFSP leaves have anti-inflammatory properties, expressed in the reduction in the lipid profile and reduction of the accumulation of fat in the adipocytes. These effects correlate with combating free radicals and preventing damage related to oxidative stress, such as NCDs.

Keywords: biofortified sweet potatoes, antioxidants, carotenoids, visceral fat, chronic non-communicable diseases.

1 Introduction

Sweet potato, also called *Ipomoea batatas* (L) Lam., is the sixth most important food culture in the world, and a significant staple food in several countries, including Brazil. Millions of tons of this tuber are produced worldwide, with China being the world's largest producer (1) (2). Sweet potatoes can be easily grown in tropical climates, as in Brazil, where there are high temperatures, rain and fertile soil, requiring little or no technology, therefore, it is predominantly present in the production of family farming (3). For these reasons, Brazil stands out in the production of sweet potatoes in the South American continent (4).

Biofortification is an important tool that can add nutritional value to the product through agronomic management and conventional genetic improvement, expanding its effects on the health of individuals. In this context, biofortification caused a positive impact in the sense of preventing and / or reversing nutritional deficiencies (5).

Ipomoea (L) Lam, Beauregard cultivar or biofortified sweet potato, the Orange-fleshed Sweet Potato - OFSP, is an American cultivar developed in 1981 by the Louisiana Agricultural Experiment Station (5). OFSP is considered biofortified because it has a high concentration of beta-carotene or vitamin A, which gives the tuber flesh an orange color. Thus, OFSP has been presented as a viable alternative for dietary supplementation, especially to supply vitamin A deficiency. Still, other parts of OFSP seem to have important nutritional components for health (6).

OFSP leaves can be consumed as a vegetable in the main dishes, being rich sources of proteins, vitamins, minerals, fibers, antioxidant compounds such as

polyphenols, anthocyanins, carotenoids, and several other micronutrients. Hence, stimulating the consumption of OFSP leaves is an important tool in improving the supply of beneficial nutrients to health, and can be an adjunct in the treatment of common comorbidities in modern society, such as obesity, diabetes and cardiovascular diseases (CNCD) (7) (8). In this context, the consumption of this tuber's leaves, which are often discarded, is a rich source of macro and micronutrients essential to health (9).

In Brazil, sweet potatoes and their components represent a renewable natural resource with a medical ethnographic indication that, if validated, may reduce the pressure of consumption on medicinal substances of chemical synthesis (7). Therefore, research on the use of non-conventional parts of food, which have functional components with therapeutic properties, have been increasingly deepened due to economic limitations in the country, and concomitantly, there is a great concern with the nutritional quality of the most varied products. However, most of these products have great added value, which makes it difficult to purchase and consume them frequently in the population, which is a relevant factor for the search for foods with functional properties that are more accessible to the needy population (10).

Thereby, these parts of the plant become attractive for continuous research and future application in medicine. The full use of sweet potatoes, in addition to being a sustainable method, can act to prevent diseases that affect a large part of the population, such as CNCDs (coronary heart disease, cancer) through the action of antioxidants present in the parts that are commonly discarded, mainly in leaves, promoting improvement in quality of life and longevity.

The present study evaluated the effects of supplementing the flour obtained from the OFSP leaf on metabolism, adiposity and oxidative stress in male Wistar rats.

2 Material and methods

2.1 Animals

Twenty male Wistar rats, approximately 28 days old, from the Central Bioterium of the State University of Western Paraná, Cascavel campus, were used. In accordance with the ethical conduct in the care and use of animals, according to the Research Ethics Committee of the State University of Western Paraná - UNIOESTE (Annex). As soon as they were received at the sectoral bioterium of the Physiology Laboratory (LAFEM), the animals were weighed and randomly divided into groups (2): 10 animals in the Control Group and 10 animals in the Supplemented Group with OFSP leaf flour. The animals were accommodated throughout the study in polypropylene boxes, with wood shavings, in an environment with a temperature of 24 ° C (± 2 ° C), with a 12-hour light-dark cycle, commercial diet Biobase 9301 and room temperature water will.

During the study, the animals received:

- Control Group - treated daily with 2 mL of water via gavage;
- Supplemented Group - treated daily with 2 mL of supplementation, via gavage, with a concentration of 1g / ml.

OFSP leaves were acquired in the municipality of Cascavel / PR (latitude 24 ° 58'15.18"S and longitude 53 ° 14'10.96"O). The climate is considered Cfa

(subtropical climate), with average annual precipitation above 1800mm, without defined dry season and the possibility of frosts during the winter. Distrophic Red Latosol, classified according to the Brazilian Agricultural Research Corporation (11).

At the end of the period of six weeks of the experiment, after a 12-hour fast, the animals were weighed and previously stunned in a CO₂ chamber to be beheaded in guillotine. Immediately, after decapitation, blood was collected from the brain stem, in heparinized tubes, and centrifuged at 3000 rpm, for 10 minutes, in a CentriBio® model 80-2B centrifuge to obtain the plasma, which was separated into microtube tubes, stored at -80°C in Ultrafreezer (Indrel® IUT 355D) to evaluate total antioxidant capacity and biochemical profile. The assessment of total plasma and tumor antioxidant capacity - TRAP. The results were analyzed using the OriginLab 7.5 software and expressed in nM of trolox (Trolox 0.5 mg / mL).

- a) Biochemical Profile: Hemogram: hematological analyzes were performed on samples of whole blood collected from the animals' euthanasia in tubes containing heparin, using an automated hematological analyzer ABBOTT, model Cell-dyn ruby. The following parameters were evaluated: red blood cell count (RBC), hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell count (WBC), red blood cell distribution width (RDW), neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and platelets; Lipid profile: Part of the serum obtained from the total blood collection was used to measure the lipid profile, with the aid of the MINDRAY BS240 analyzer and commercial kits (Bioclin).

Plasma concentrations of total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol and VLDL cholesterol were evaluated. The LDL cholesterol results were obtained using the Friedewald equation [LDL = total cholesterol - (Triglycerides / 5) - HDL] (Santos et al, 2010). The triglyceride-glucose index, also known as the TyG index, was calculated with the formula [TG (mg / dL) x fasting glucose (mg / dL) / 2].

2.2 Organ collection and histological analysis

At the end of the period of six weeks of the experiment, after a 12-hour fasting, the animals were weighed and previously stunned in a CO₂ chamber to be beheaded in guillotine. Blood was collected from the brain stem and the naso-anal length (CNA) assessment was performed to obtain the LEE index, which is measured using the following formula: [cube root of body weight (g) / naso-anal length (cm) x 1000] (12).

The liver and retroperitoneal fat of each animal were removed, subjected to the cutting procedure and weighed individually on an analytical balance (Bel Engineering). The value obtained from the collected organs was divided individually by the weight of each animal and multiplied by 100, to obtain a grammage value per 100g.

The liver tissues and retroperitoneal fat were fixed in 10% formaldehyde, in individual bottles, for 24 hours and washed in running water one by one for 24 hours and preserved in alcohol at 70 °.

For histological analysis, visceral adipose tissues were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned in 5 μm sections by a semiautomatic microtome of the Lupetec brand, and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) for histological analysis by optical microscopy. Subsequently, the slides were photographed and with the aid of the Image Pro Plus Software, the area and the number of adipocytes were measured.

The hepatic tissues were sectioned in 3 μm sections by the same microtome used for the section of the retroperitoneal adipose tissue and also submitted to the process for histological analysis (13).

The histological parameters that were used to assess the liver tissue (13), which consist of using hematoxylin and eosin staining to examine: Presence or not of macrovesicular and microvesicular steatosis; Inflammatory infiltrate and hepatocellular injury, characterized by the ballooning of hepatocytes and Mallory's hyaline; Iron deposits; Presence of glycogenic and metaplasia ductular vacuolization; Presence of fibrosis, which was analyzed for its deposition pattern and concentration. If there is hepatocellular damage, it is classified as mild, mildly moderate, moderate and severe.

For the determination of the size of the adipose cells of the retroperitoneal fatty tissue already described in the literature (14).

2.3 Statistical analysis

The data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Student's t-test was used when the groups showed normal distribution. The Mann-

Whitney test was used when the assumptions of normality were not accepted. The normality test used was the Shapiro-Wilk. For both tests, $P < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analysis and graphs were performed using the Prisma program, version 7.0.

3 Results

At the animals sixty-nine days of life, it was observed that there was no significant difference ($p < 0.05$) in body weight gain in the Control and Supplementary Groups. The CNA data in the rats from the Supplemented Group, on the other hand, showed a significant reduction ($p < 0.05$) in relation to the rats from the Control Group as shown in Table I.

To obtain the Body Mass Index (BMI) in experimental animals, the Lee Index is used based on the CNA data, which is the cube root of body weight ratio (in grams) to the CNA (in centimeters) multiplied by 1000 (12). However, there was a significant change ($p < 0.05$) in the Lee Index, showing higher levels in the Supplemented Group compared to the Control Group (Table I).

Serum levels of VLDL were significantly higher in Wistar rats in the Control Group than in the Supplemented Group, which was supplemented with OFSP flour for six weeks. The parameters on body weight gain, Total cholesterol, HDL, Triglycerides, Tyg Index, showed no significant difference between the groups studied (Table 1).

The triglyceride levels evaluation, observed in Table 1 does not reflect a significant difference ($p < 0.05$) between the two groups, however, the values obtained indicate a lower concentration of serum triglycerides in the group that

received supplementation with biofortified sweet potato leaf flour. There was also no significant difference ($p < 0.05$) in the TyG index, as shown in Table I.

The hematological parameters, observed in Table 2, indicate a significant difference ($p < 0.05$) in RDW, platelets and VPM between the groups studied. The other parameters showed no significant difference ($p < 0.05$) when compared between the Control Group and the Supplemented Group.

Considering the results obtained, a significant reduction in platelet count and mean globular volume is observed in the Supplemented Group. In addition, the red blood cell distribution width (RDW), presents a significant increase ($p < 0.05$) in the Supplemented Group as shown in Table 2.

A tendency towards higher TAC levels was demonstrated in the Group supplemented with OFSP in relation to the Control Group, as shown in Table 2 (TRAP - nM TROLOX).

The weight of liver tissue was significantly ($p < 0.05$) higher in rats supplemented with OFSP leaf compared to the non-supplemented group (Control).

According to liver histopathological analyzes, there were no effects on iron deposition or any changes that indicated infiltrates and/or hepatocellular injury, vacuolization or fibrosis in the animals.

The weight of retroperitoneal visceral adipose tissue was higher in rats from the Control Group, when compared to animals from the Supplemented Group, but there was no significant difference ($p < 0.05$).

Another parameter used to verify body composition in rats was the visceral adipose tissue mass, using retroperitoneal fat. In figure 1d, it can be seen, through histological analysis, that there is less quantification of adipocytes, due to a greater cell volume in the Control Group, also shown in figure 4e. Graphs 1b and 1c statistically check the histological images, corroborating the analyzed result of greater quantification of adipocytes by area analyzed and less cell volume observed in the Supplemented Group.

4 Discussion

The difference between the growth, expressed through the CNA, of the two studied groups may have resulted from the metabolic alteration and reduction in consumption of the commercial diet by the Supplemented Group.

The presence of antinutritional factors in OFSP leaves such as oxalates can affect the metabolism of micronutrients such as calcium and magnesium, which are essential for bone health, as these compounds bind these minerals and interfere with their absorption (15).

Among the nutrients present in the OFSP leaves, the high content of dietary fibers stands out. Fiber has sacietogen potential due to mechanical distention of the stomach and increases intestinal transit, contributing to a decrease in food intake. Therefore, the presence of dietary fiber in supplementation with OFSP flour, can lead to altered appetite, and in excess, interfere with the consumption of macro and micronutrients essential for growth and development (16).

In the present study, there was a significant increase in the red blood cell distribution width (RDW), in the Supplemented Group. Effect that can be attributed to the tannin content present in OFSP leaves. Tannins, like oxalates, are complex plant metabolites that are part of polyphenols and that can, however, be considered as anti nutrients that bind essential minerals like iron, significantly reducing its bioavailability (15).

Blood platelets have a predominant role in the pathogenesis of diseases. Platelet size can be a sensitive indicator of its reactivity and its magnitude is determinant in the formation of intracoronary thrombus in the presence of rupture of the atherosclerotic plaque. Large platelets are metabolistically and enzymatically more active than small ones and are reflected by the increase in mean platelet volume (MPV). They also lead to greater aggregation and facilitate the formation of the thrombus, showing to be a risk factor in unstable angina (17).

As discovered in this study, increased VPM was found in supplemented animals, as well as reduced platelet count. There is a need to optimize investigations regarding the safe dosage of the OFSP sheet and correlate with platelet activation.

The results show an improvement in the lipid profile of the rats supplemented with OFSP leaf flour, which can be related to the presence of phenolic contents and fibers, according to findings in the literature.

Considering that OFSP leaves have an average of 29% fibers and that these macronutrients are important for the prevention of dyslipidemia, atherosclerosis and diabetes, it is expected that, in the long term, the consumption of this food will contribute to the control of NCDs (18). Still, the phenolic

compounds present in OFSP and its components show potential antioxidant activities that can exert cardioprotective effects in humans. The ingestion of these compounds has been shown to be inversely related to mortality from heart disease. Phenolic compounds have several physiological functions, therefore, sweet potato leaves can also have physiologically active properties, as they have higher levels of these compounds (19).

In the 60 days long evaluation of the effectiveness of *Aegle quinice* (L), also known as “Bengal quince”, leaf juice, among individuals with type 2 diabetes mellitus, similar results to this research were obtained for four straight weeks, regarding the reduction of triglycerides and LDL-cholesterol, in addition to improvement in antioxidant activity. The authors also attribute such results due to the presence of antioxidants in the leaf (20).

A study carried out with the hypolipidemic effects of a mixture of powdered buckwheat leaves and flowers on male rats fed a high-fat diet. Plasma concentrations of total cholesterol and triglycerides were significantly lower in the group supplemented with the mixture of buckwheat leaves and flowers than in the group not supplemented. It was suggested that such effects were obtained through the supply of phenolic compounds and fibers with supplementation with buckwheat leaves and flowers (21).

The tendency in the increase in serum concentrations of antioxidants in the Supplemented Group of this study, is consistent with the literature that indicates the importance of consuming foods with high TAC.

Blood plasma is the liquid component of whole blood. Approximately 90% of it is composed of water, in which substances in the blood are dissolved. In addition

to antioxidant vitamins, other bioactive compounds, such as polyphenols, can be absorbed and prevent oxidation of plasma LDL (22). There is a high antioxidant capacity in sweet potato leaves and also a positive correlation between this characteristic and the high content of polyphenols present in the leaves (19).

Other researches have also shown that the content of antioxidants and antioxidant activity found in sweet potato varieties leaves is significantly higher than that found throughout the root, flesh, and skin of this tuber, as well as compared to other more common commercial vegetables (23) (24) (25).

Important markers of metabolic syndrome, a clinical condition characterized by central obesity, dyslipidemia (hypertriglyceridemia, for example), insulin resistance and systemic arterial hypertension, such as C-reactive protein (CRP), are elevated in this disease and have an inverse correlation with levels of TAC present in the plasma (26). Eating foods containing antioxidants can increase the TAC in blood and biological fluids. In this sense, (27) eating a meal with foods rich in phenolic compounds can increase the plasma TAC of healthy individuals (27).

The practice of consuming food with high TAC is associated with a decrease in brain oxidative reactions, and an improvement in neurocognitive functions in elderly rats. The mechanisms for this protective effect are the direct removal of free radicals and the functional stabilization of neuronal mitochondria. In other studies, food intake with high TAC was associated with a reduction in the plasma values of biomarkers of chronic inflammation (C-reactive protein) and liver damage, and a reduction in serum TAC levels in cirrhotic rats (28).

Histopathological analyzes rule out effects related to liver damage or changes in iron deposition. Thus, it can be inferred that there is no effect of the

addition of biofortified sweet potato leaf flour on the integrity of the liver parenchyma.

The reduction in the volume of adipocytes in the Supplemented Group, observed in this study, indicates less accumulation of visceral fat promoted by supplementation with OFSP leaf flour. This effect can be attributed to the phenolic compounds present in the OFSP leaf, especially anthocyanins, which have beneficial effects, as they reduce insulin resistance, inflammation and oxidative stress in muscle tissues and adipose tissue (29).

In a study using food supplementation with *Spirulina platensis*, in doses of 50 and 100 mg/kg to evaluate results regarding the change of diet, simulating a process of food reeducation, it was observed that the compound, which has bioactive compounds, had the capacity to reverse obesity through lipid peroxidation in adipose tissue in Wistar rats, resulting in a reduction in retroperitoneal fat compared to the Control Group (30).

In assessing the association of the use of camu-camu pulp (*Myrciaria Dúbia* HBK McVaugh) in the treatment of obesity, the authors found a lower deposit of visceral fat in Wistar rats, a significant reduction in the lipid profile and glycemic control. The authors suggest that camu-camu may have contributed to the reduction of fat deposits resulting from lipid peroxidation through the antioxidant action of ascorbic acid and, they are associated with anticancer effects and prevention of liver and brain damage (31).

From the data found in this study, it can be concluded that OFSP leaves can positively influence the improvement of the inflammatory response, being expressed through the reduction in the lipid profile and reduction of fat

accumulation in the adipocytes. Therefore, because it contains bioactive compounds, the addition of OFSP leaf to the human diet can contribute to health, especially in combating free radicals and consequently preventing damage related to oxidative stress, such as NCDs (diabetes, cancer and coronary heart disease). In addition to using a part of the vegetable that is commonly discarded, due to the lack of information about its benefits, contributing to reduce the waste of natural and financial resources. It is necessary to practice inactivation of antinutritional compounds in order to avoid compromising the absorption of minerals essential to health.

Acknowledgment

This research was carried out thanks to the Post-Stricto Sensu graduation in Sciences Applied to Health- Master's degree, State University of Western Paraná - UNIOESTE, Francisco Beltrão campus, Paraná, Brazil. The work had the help of collaborators and researchers from the State University of the West of Paraná - UNIOESTE, Campus of Cascavel, Paraná, Brazil, mainly from the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism and the Laboratory of Food Technology of the Center for Biological and Health Sciences for always being helpful and patient. Luciana Kottwitz, Sabrina Grassioli, Milara Moi, Fábio Negretti, Rafael Andrade Menolli, Leonardo Paixão da Silva, Diane Maschio de Souza, Mateus Ricardo Garbim and Ademar Pinezi Junior, contributed to data analysis and interpretation of results. This research did not receive any specific subsidies from public, commercial or non-profit sectors.

5 References

1. Tanumihardjo SA, Ball AM, Kaliwile C, Pixley K V. The research and implementation continuum of biofortified sweet potato and maize in Africa. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1390(1):88–103.
2. Drapal M, Rossel G, Heider B, Fraser PD. Metabolic diversity in sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam.) leaves and storage roots. *Hortic Res* [Internet]. 2019;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41438-018-0075-5>
3. Infante RA, Natal DIG, Moreira ME de C, Bastiani MID, Chagas CGO, Nutti MR, et al. Enriched sorghum cookies with biofortified sweet potato carotenoids have good acceptance and high iron bioavailability. *J Funct Foods.* 2017;38:89–99.
4. Soares IM, Bastos EGP, Da Silva Peixoto Sobrinho TJ, Da Costa Alvim T, Da Silveira MA, De Souza Aguiar RW, et al. Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de diferentes cultivares de ipomoea batatas (L.) lam. obtidas por melhoramento genético para produção industrial de etanol. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2014;35(3):479–88.
5. Nutti MR, Carvalho JLV De, Watanabe E. A biofortificação como ferramenta para combate a deficiências em micronutrientes [Internet]. Vol. 3, Embrapa Agroindustria de Alimentos. 2010. p. 43–63. Available from: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/994883/1/2006026.pdf>
6. Islam S. R: Concise Reviews / Hypotheses in Food Science Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L .) Leaf: Its Potential Effect on Human Health and Nutrition. *J Food Sci.* 2006;71(2):13–21.
7. José AE, Carvalho HHC, Wiest JM. Avaliação do efeito antibacteriano de extratos de folhas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) frente a bactérias de interesse em alimentos e correlação com os compostos fenólicos. *Rev Ceres.* 2015;62(5):421–9.
8. Laurie SM, Faber M, Claasen N. Incorporating orange-fleshed sweet potato into the food system as a strategy for improved nutrition: The context of South Africa. *Food Res Int* [Internet]. 2018;104:77–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.016>

9. Michels JP. O CONSUMO DE BATATA-DOCE DE POLPA ALARANJADA ENTRE FAMÍLIAS RURAIS DO NORDESTE DE MOÇAMBIQUE: um estudo sobre percepções de comida e Segurança Alimentar na província de Nampula. Diss apresentada ao Programa Pós- Grad em Desenvol Rural da Univ Fed do Rio Gd do Sul. 2010;178.
10. PEREIRA MCDA. Casca De Banana E Do Fermentado. Tese apresentada à Univ Fed Lavras. 2007;147.
11. Cerdà a., Brazier RE, Nearing M, Vente J. Calendario_De_Solos_2013.Pdf. 2013.
12. Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Bitencurt JL, Resende-Neto JM, Barreto AS, et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Sci Plena [Internet]. 2010;6(10):106101. Available from: <http://www.scienciaplenu.org.br/sp/article/view/144>
13. Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R. Capítulo 3 - Técnicas Histológicas. Conceitos e Métodos para Formação Profissionais em Laboratórios Saúde Vol 2. 2010;89–188.
14. Hirsch J, Gallian E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. J Lipid Res. 1968;9(1):110–9.
15. Ooko Abong' G, Muzhingi T, Wandayi Okoth M, Ng'Ang'A F, Ochieng' PE, Mahuga Mbogo D, et al. Phytochemicals in Leaves and Roots of Selected Kenyan Orange Fleshed Sweet Potato (OFSP) Varieties. Int J Food Sci. 2020;2020.
16. Piedade J, Canniatti-Brazaca SG. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sangüíneo em ratos. Ciência e Tecnol Aliment. 2003;23(2):149–56.
17. Skalski B, Stochmal A, Żuchowski J, Grabarczyk Ł, Olas B. Response of blood platelets to phenolic fraction and non-polar fraction from the leaves and twigs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson in vitro. Biomed Pharmacother. 2020;124(October 2019).

18. Conrad KB, Louis ENJ, Beatrice ND, Festus AN, Nelson NN, Geneva ON, et al. Sweet potatoes in Cameroon: Nutritional profile of leaves and their potential new use in local foods. *African J Agric Res*. 2014;9(18):1371–7.
19. Islam S. Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf: Its Potential Effect on Human Health and Nutrition. *J Food Sci* [Internet]. 2006;71(2):R13–121. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08912.x>
20. Nigam V, Nambiar VS. Aegle marmelos leaf juice as a complementary therapy to control type 2 diabetes – Randomised controlled trial in Gujarat, India. *Adv Integr Med* [Internet]. 2019;6(1):11–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2018.03.002>
21. Jung EL, Männistö S, Spiegelman D, Hunter DJ, Bernstein L, Van Den Brandt PA, et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: A pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009 Jun 1;18(6):1730–9. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-09-0045>
22. GIADA M de LR. Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada. 2006;83:28–31.
23. Truong VD, McFeeters RF, Thompson RT, Dean LL, Shofran B. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. *J Food Sci*. 2007;72(6):343–9.
24. Sun H, Mu B, Song Z, Ma Z, Mu T. The In Vitro Antioxidant Activity and Inhibition of Intracellular Reactive Oxygen Species of Sweet Potato Leaf Polyphenols. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:11.
25. Jang Y, Koh E. Antioxidant content and activity in leaves and petioles of six sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and antioxidant properties of blanched leaves. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2019;28(2):337–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0481-3>
26. Brighenti F, Valtueña S, Pellegrini N, Ardigò D, Del Rio D, Salvatore S, et al. Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently

- related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *Br J Nutr.* 2005;93(5):619–25.
27. Prior RL, Gu L, Wu X, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, et al. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(2):170–81.
 28. Ferrari CKB. Functional foods, herbs and nutraceuticals: Towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology.* 2004;5(5):275–89.
 29. Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem [Internet].* 2013 Nov;24(11):1777–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286313001277>
 30. FERREIRA, E. S. 0 Introdução. 2017;0–139.
 31. do Nascimento OV, Boleti AP de A, Schwertz M, Lima ES. Dietary supplementation with Camu-camu and continuous exercises in the treatment of obesity. *Rev Nutr.* 2018;31(1):25–33.

Table 1. Evaluation of anthropometric and metabolic parameters in rats supplemented or not with OFSP leaf.

Parameter	Control (N=10)	Supplemented (N=9)	P-value
Weight gain	101.4±34.05	98.67±32.12	0.8597
HGT	99,91± 4,65	118,6± 20,02	0,8867
CNA	2251 ± 1.233	21.54±0.6167	0.0208*
Lee Index	293.1 ± 9.508	305.7±4.234	0.0019*
Total Cholesterol (mg/dL)	48.32 ± 3.005	48.72 ± 1.935	0.9157
HDL (mg/dL)	36.14 ± 2.410	37.28 ± 2.341	0.7414
VLDL (mg/dL)	21.35 ± 2.541	15.61 ± 2.332	0.0329*
Triglycerides (mg/dL)	87.30 ± 13.35	58.25±5.82	0.0671
Tyg Index	4.57±0.083	4,66±0.11	0.519

* Mean values ± standard deviations. Values followed by the symbol (*) on the same line differ significantly ($p < 0.05$) by the student's t-test; The double-hyphen symbol (--) represents data that could not be obtained due to ineligibility in values obtained in LDL measurement. Body weight, Hemoglycotest (HGT), Nasal-anal length (CNA), Values corresponding to weight gain, CNA, Lee index, lipid profile and Tyg Index in male Wistar rats from the Control Group, which were fed with commercial diet and water "Ad libitum", and Supplemented Group, fed with commercial diet and water "ad libitum" and supplemented with OFSP leaf flour. HDL = High Density Lipoprotein; LDL = Low Density Lipoprotein; VLDL = Very Low Density Lipoprotein; Tyg Index = relationship between triglycerides and glucose;

Table 2 - Evaluation of biochemical parameters (blood count) of rats submitted or not to the OFSP leaf flour supplementation

Blood Count	Control (n=10)	Supplemented (n=9)	p-value
Neutrophils (%)	0,251± 0,653	0,264± 0,149	0,7881
Lymphocytes (%)	0,157±0,078	0,148±0,118	0,5363
Monocytes (%)	0,044±0,041	0,034±0,036	0,645
Eosinophils (%)	0,009±0,008	0,006±0,006	0,1799
Basophils (%)	0,076±0,112	0,030±0,025	0,589
Red Cells (mm ³)	3,369±0,555	3,578±0,366	0,353
Hemoglobin (g/dL)	5,907±0,958	6,241±0,597	0,588
Hematocrit (%)	18,55±03,119	19,86±2,015	0,299
VGM (fL)	54,99±1,075	55,54±0,719	0,067
HGM (pg)	17,54±0,490	17,47±0,269	0,696
MCHC (g/dL)	31,91±0,511	31,43±0,424	0,611
RDW (%)	9,49±0,272	10,22±1,288	0,017*
Platelets (mm ³)	33,3± 22,00	12,13±7,378	0,0016*
Mean Platelet Volume	5,285±0,558	6,511±1,497	0,027*
TRAP (nM TROLOX)	1115±153,2	1526±166,5	0,08

Mean values ± standard deviations. Values followed by the symbol (*) on the same line differ significantly ($p > 0.05$) by the student's t-test. VGM = Mean Globular Volume; HGM = mean globular hemoglobin; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin concentration; RDW = Range of Distribution of Red Blood Cells; MPV = Mean Platelet Volume;

Figure 1. Weight and adipocytes of retroperitoneal fat from male Wistar rats supplemented or not with OFSP leaf flour

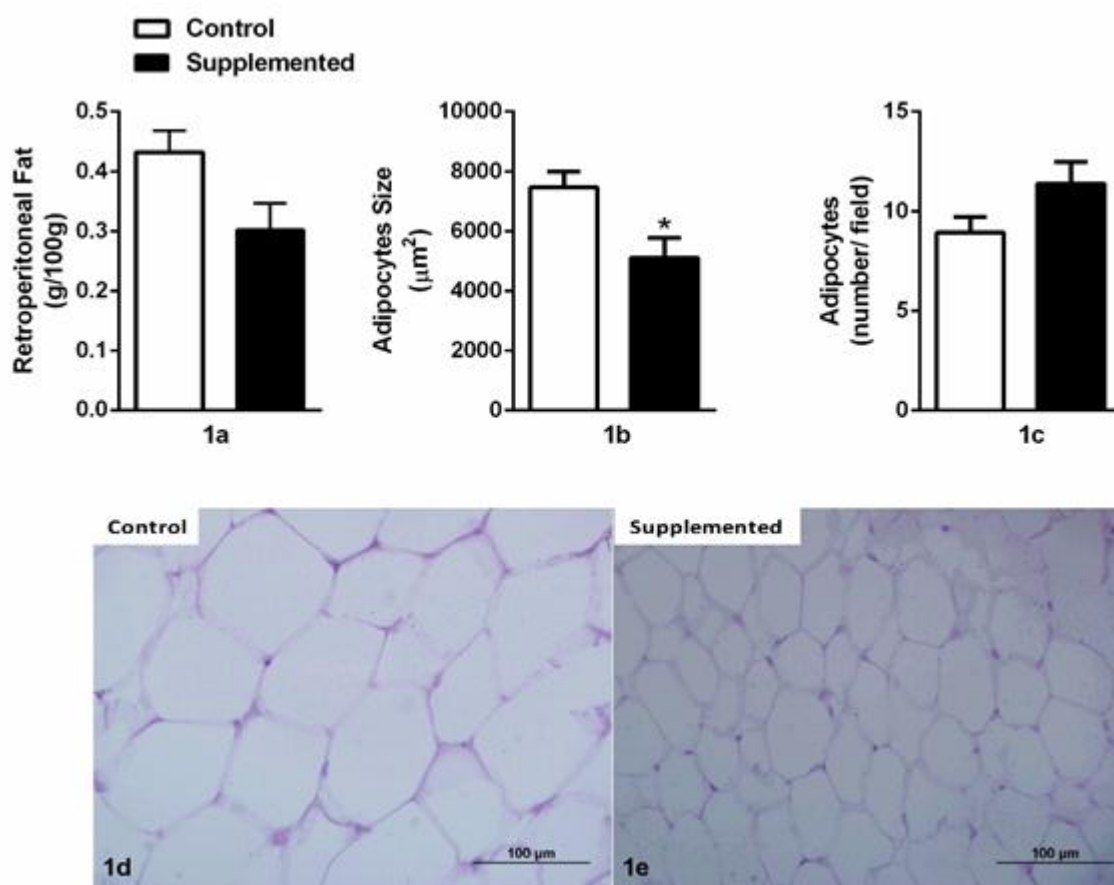


Figure 1- Weight and adipocytes of retroperitoneal fat from male Wistar rats supplemented or not with OFSP leaf flour: 1a) Weight of the liver tissue in the Control Group and Supplemented Group of male Wistar rats 1b.) Adipocytes from the retroperitoneal fat of animals in the Control Group; 1c) adipocytes from the retroperitoneal fat of the animals in the Supplemented Group; 1d) comparative graph referring to the number of adipocytes from rats in the Supplemented Group and Control Group; 1e) comparative graph referring to the adipocyte size from rats in the Supplemented Group and Control Group. Values represented by the bar chart followed by the symbol (*) differ significantly ($p < 0.05$) by the student's t-test.

Figure 2. Hepatic tissue (liver) weight of the Control Group and Supplemented Group male Wistar rats

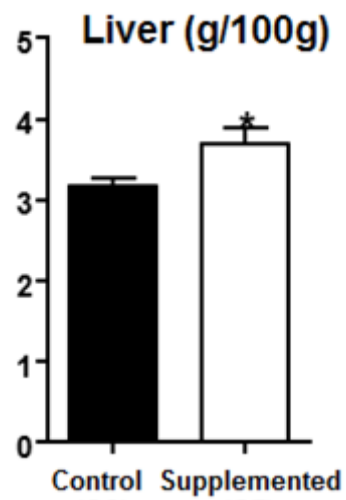


Figure 2- Hepatic tissue (liver) weight of the Control Group and Supplemented Group male Wistar rats. Values represented by the bar chart followed by the symbol (*) differ significantly ($p < 0.05$) by the student's t-test.