



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO DE CIÊNCIA ANIMAL**

JOICY PRISCILA DA COSTA MAIA

**SUPLEMENTAÇÃO COM QUERCETINA REDUZ A DISLIPIDEMIA E A
ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA
OBESOGÊNICA**

Presidente Prudente - SP
2019



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO DE CIÊNCIA ANIMAL**

JOICY PRISCILA DA COSTA MAIA

**SUPLEMENTAÇÃO COM QUERCETINA REDUZ A DISLIPIDEMIA E A
ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA
OBESOGÊNICA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador:
Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis

Co-Orientadora:
Profa. Dra. Sabrina Alves Lenquiste

613.2
M217

Maia, Joicy Priscila da Costa.

Suplementação com quercetina reduz a dislipidemia e a esteatose hepática em ratos alimentados com dieta obesogênica / Joicy Priscila da Costa Maia. – Presidente Prudente, 2019.

54f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis.

1. Colesterol. 2. Flavonóide. 3. Lipoproteína. 4. Síndrome metabólica. 5. Sobrepeso.

JOICY PRISCILA DA COSTA MAIA

**SUPLEMENTAÇÃO COM QUERCETINA REDUZ A DISLIPIDEMIA E A
ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA
OBESOGÊNICA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 09 de Dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Souza de Lima Souza Reis
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Angélica Mércia Pascon Barbosa
Faculdade de Filosofia e Ciências - UNESP
Marília-SP

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Quero dedicar esse trabalho aos “homens” da minha vida.

Ao meu pai que se sacrificou para me dar o que ele julga ser o mais importante, o estudo, e por causa desse estudo estou aqui hoje.

Ao meu primogênito Isaac, meu companheirinho, sempre me acalmou dizendo que eu podia estudar porque ele cuidava dos irmãos.

Ao meu Davi, amor em forma de filho, me consolava dizendo: não chora mamãe, você vai conseguir.

Ao meu Daniel, meu mini guerreiro, sou a mãe mais feliz por ser considerada igual a “Mulher Maravilha”.

E de todo meu coração dedico a você Jean, que foi a peça propulsora dentro de mim, me encorajou desde o início, desde sempre, acreditou em mim mais do que eu mesma e esteve presente nos dias mais difíceis dessa caminhada, e por isso me considero a pessoa mais feliz por estar ao seu lado.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar a Deus por ser o autor da minha vida, por me dar o ar para respirar todas as manhãs e por ter escrito essas paginas lindas na minha vida.

Quero agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Souza Lima do Souza Reis, que esteve presente nesta trajetória de muito aprendizado, por sua paciência e por sua generosidade em compartilhar seu conhecimento, sem seu auxilio não conseguiria chegar até aqui.

À minha Co-Orientadora Profa. Dr^a Sabrina Alves Lenquiste, por ter me auxiliado e apoiado em muitas dúvidas e questionamentos ao longo do caminho.

Ao Coordenador do curso Prof. Dr. Anthony Cesar de Souza Castilho, por tornar possível a finalização desse projeto.

Aos professores do Mestrado em Ciência Animal, com os quais tive o privilégio de ter contato, e pude compartilhar conhecimentos e experiências enriquecedoras, possibilitando meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Biotério, a médica veterinária especialista Gracielle Vieira Gonçalves e Lucas Batista dos Santos, por estarem sempre dispostos a ajudar e facilitar o processo durante os dias de experimento.

À professora Profa. Dra. Elisangela Olegário, juntamente com a Residente do Hospital Veterinário Luara Evangelista Silva que me auxiliaram na leitura das lâminas confeccionadas durante o projeto.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da Patologia Animal, Cleonice Trevisan e Marcos Roberto Ramos, a alegria de vocês durante esse projeto trouxe uma leveza ímpar.

Aos alunos de iniciação científica Leticia Kazama Tsujigushi e Denise Yabuki, pela dedicação durante as etapas experimentais, contribuindo dessa forma para o experimento.

À Coordenação do Curso de Nutrição Profa. Ma. Marilda Moreira, meu coração é extremamente grato pela confiança em mim depositada e por todo apoio.

Aos meus colegas de trabalho e claro aos meus queridos alunos que sempre com muito carinho me apoiaram nessa trajetória.

“Não devemos chamar o povo à escola para receber instruções, postulados, receitas, ameaças, repreensões e punições, mas para participar coletivamente da construção de um saber, que vai além do saber de pura experiência feita, que leve em conta as suas necessidades e o torne instrumento de luta, possibilitando-lhe ser sujeito de sua própria história”. (Paulo Freire)

RESUMO

Suplementação com quercetina reduz a dislipidemia e a esteatose hepática em ratos alimentados com dieta obesogênica

A obesidade tem sido considerada epidemia mundial pela Organização Mundial da Saúde que gera transtornos metabólicos, dislipidemia resistência a insulina, esteatose hepática. A obesidade é fator de risco para o desenvolvimento das doenças crônicas como as cardiovasculares e diabetes melito tipo 2. Objetivou-se avaliar se a quercetina tem potencial para amenizar os efeitos deletérios da dieta obesogênica como a dislipidemia e esteatose hepática, no ganho de peso e na deposição de tecido adiposo em ratos. Utilizou-se 32 ratos machos Wistar alimentados com água e ração *ad libitum* e mantidos em temperatura de 23 °C e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas que foram divididos em 4 grupos (8 ratos/grupo): GC alimentados com dieta basal; GO ratos receberam dieta obesogênica por 16 semanas e G_{0Q1} e G_{0Q2} ratos receberam ração obesogênica por 8 semanas sem suplementação com quercetina, seguido de mais 8 semanas recebendo ração obesogênica de 10 e 20 mg de quercetina/dia, respectivamente. A ração obesogênica era composta por 50% de ração balanceada comercial, 20% de frutose PA e banha suína para atingir concentração de 30% extrato etéreo. No final colheram-se as amostras: sangue para determinação das concentrações séricas de colesterol total, HDL (*High Density Lipoproteins*), LDL (*Low-Density Lipoprotein*), enzimas AST (*Aspartato Aminotransferase*) e ALT (*Alanino Aminotransferase*), amostras do fígado para análise histopatológica e os tecidos epididimal, mesentérico e retroabdominal para avaliação da deposição de gordura nos ratos. Para análises dos dados aplicaram-se ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn com significância de 5%. Os ratos do grupo GO tiveram dislipidemia e esteatose hepática. Os ratos dos grupos G_{0Q1} e G_{0Q2} não apresentaram dislipidemia e esteatose hepática, mas somente os ratos do grupo G_{0Q2} apresentaram reorganização das trabéculas hepáticas. A suplementação com 20 mg de quercetina/dia foi a melhor dose capaz de reduziu a dislipidemia e a esteatose hepática em ratos alimentados com dieta obesogênica.

Palavras-chave: Colesterol. Flavonóide. Lipoproteína. Síndrome metabólica. Sobrepeso.

ABSTRACT

Supplement with quercetin reduces dyslipidemic and hepatic steatosis in rats fed with obesogenic diet

Obesity has been considered a worldwide epidemic by the World Health Organization that generates metabolic disorders, dyslipidemia, insulin resistance, hepatic steatosis and obesity is a risk factor for the development of chronic diseases such as Cardiovascular and diabetes mellitus type 2. The objective of this study was to evaluate whether quercetin has the potential to mitigate the deleterious effects of the obesogenic diet such as dyslipidemia and hepatic steatosis, weight gain and deposition of adipose tissue in rats. We used 32 male Wistar rats fed with water and ad libitum ration and kept at 23 °C and light/dark cycle of 12/12 hours that were divided into 4 groups (8 rats/Group): GC fed with basal diet; GO Rats received obesogenic diet for 16 weeks and G_{0Q1} and G_{0Q2} rats received obesogenic ration for 8 weeks without supplementation with quercetin, followed by another 8 weeks receiving obesogenic ration of 10 and 20 mg of quercetin/day, respectively. The obesogenic ration consisted of 50% of commercial balanced ration, 20% of fructose PA and swine lard to achieve a concentration of 30% ether extract. At the end the samples were harvested: blood for determination of serum concentrations of total cholesterol, HDL (High Density Lipoproteins), LDL (Low-Density Lipoprotein), AST and ALT (Alanine Aminotransferase) enzymes, liver for histopathologic analysis and Epididymal, mesenteric and retroabdominal fats for evaluation of the deposition of Fat in the rats. In the data analyses, ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn were applied, with a significance of 5%. Rats from the GO group had dyslipidemia and hepatic steatosis. Rats from Groups G_{0Q1} and G_{0Q2} did not present dyslipidemia and hepatic steatosis, but only rats from the G_{0Q2} group presented reorganization of the hepatic trabecula. Supplementation with 20 mg of quercetin/day was the best dose capable of reducing dyslipidemia and hepatic steatosis in rats fed with obesogenic diet.

Keywords: Cholesterol. Flavonoid. Lipoprotein. Metabolic syndrome. Overweight.

LISTA DE SIGLAS

ALT	– Alanino Aminotransferase
AST	– Aspartato Animotransferase
CONCEA	– Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DP	– Desvio Padrão
DT	– Dose total
GC	– Grupo Controle
GO	– Grupo Obeso
G _{oQ1}	– Grupo Obeso suplementado com Quercetina – 10mg
G _{oQ2}	– Grupo Odeso suplementado com Quercetina – 20mg
HDL	– High Density Lipoproteins
ID	– Intervalo de Administração
LDL	– Low-Density Lipoprotein
NRC	– National Research Council
OMS	– Organização Mundial da Saúde
RI	– Resistência a Insulina
TAE	– Tecido Adiposo Epididimal
TAM	– Tecido Adiposo Mesentérico
TAR	– Tecido Adiposo Retroperitoneal
TMB	– Taxa de Metabolismo Basal
TME	– Taxa Metabólica Epecífica
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 - Peso corporal (A) e ganho de peso (B) de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) 22
- Fig. 2 - Perfil lipídico de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica). (A) – Concentração sérica de triglicérides. (B) – Concentração sérica de colesterol total. (C) – Concentração sérica de HDL. (D) – Concentração sérica de LDL 23
- Fig. 3 - Concentrações séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e da aspartato alanintransferase (ALT) (B) de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) 24
- Fig. 4 - Escore lesional do fígado de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) 25
- Fig. 5 - Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) 26
- Fig. 6 - Peso da gordura epididimal (A), mesentérica (B) e retroabdominal (C) de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química das dietas obesogênica (hiperlipídica e hipercalórica) administradas aos ratos durante o período experimental	18
Tabela 2 - Consumo de água e de ração ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica).....	21

SUMÁRIO

1 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA FUTURA PUBLICAÇÃO NA REVISTA <i>NUTRITION</i>	13
<u>ANEXO A - PARECER FINAL DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA) E COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA – UNOESTE.....</u>	34
<u>ANEXO B - INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA <i>NUTRITION</i>.....</u>	35

1 **1 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA FUTURA PUBLICAÇÃO NA REVISTA**
2 ***NUTRITION***[†]

3
4 **Suplementação com quercetina reduz a dislipidemia e a esteatose hepática em ratos**
5 **alimentados com dieta obesogênica**

6
7 Joicy Priscila da Costa Maia^{a,b}, Marcela de Andrade Bernal Fagiani M.Sc.^{a,b}, Fabiola de Azevedo
8 Mello M.Sc.^a, Ilana Carla Nantes Ferreira do Carmo^c, Vanessa de Paiva Alves Gomes^c, Leticia
9 Kazama Tsujigushi^d, Sabrina Alves Lenquiste Ph.D. ^b, Gracielle Vieira Gonçalves Esp^e, Elisangela
10 Olegário da Silva Ph.D^f, Ana Maria Siqueira Silveira^f, Luara Evangelista Silva^f, Luis Souza Lima de
11 Souza Reis Ph.D^{a,c}

12
13 ^a Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo,
14 Brasil.

15 ^b Graduação em Nutrição, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

16 ^c Graduação em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

17 ^d Graduação em Medicina, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

18 ^e Biotério de Experimentação Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

19 ^f Laboratórios de Análises Clínicas e Patologia Animal do Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista,
20 Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

21
22 **Destaques**

- 23 • Quercetina diminui níveis séricos de triglicérides.
24 • Quercetina diminui níveis séricos de colesterol total.
25 • Quercetina minimiza a esteatose hepática.

26
27 Esta pesquisa foi financiada pela Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo,
28 Brasil.

29 Papel de cada autor no trabalho: todos os autores participaram do delineamento experimental, colheita
30 de dados, análises laboratoriais da pesquisa e redação do manuscrito.

31 Conflito de Interesse: os autores declaram não ter conflito de interesse nessa pesquisa.

32 * Autor correspondente: Tel. +55 18 99651-9155

33 Email: priscilamaiaunoeste@gmail.com (JPM Campos)

34

[†] Texto formatado conforme as normas para autores da revista *Nutrition*.

35 Resumo

36

37 *Objetivos:* Avaliar se a quercetina tem potencial para amenizar os efeitos deletérios da dieta
38 obesogênica como a dislipidemia, esteatose hepática, ganho de peso e deposição de tecido adiposo
39 em ratos.

40 *Métodos de pesquisa e procedimentos:* Utilizou-se 32 ratos machos Wistar alimentados com água e
41 ração *ad libitum* e mantidos em temperatura de 23 °C e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas que foram
42 divididos em 4 grupos (8 ratos/grupo): GC alimentados com dieta basal; GO ratos receberam dieta
43 obesogênica por 16 semanas e GOQ1 e GOQ2 ratos receberam ração obesogênica por 8 semanas sem
44 suplementação com quercetina, seguido de mais 8 semanas recebendo ração obesogênica e 10 e 20
45 mg de quercetina/dia, respectivamente. A ração obesogênica era composta por 50% de ração
46 balanceada comercial, 20% de frutose PA e banha suína para atingir concentração de 30% extrato
47 etéreo. No final colheram-se as amostras: sangue para determinação das concentrações séricas de
48 colesterol total, HDL (*High Density Lipoproteins*), LDL (*Low-Density Lipoprotein*), enzimas AST
49 (Aspartato Amino transferase) e ALT (Alanino Amino transferase), do fígado para análise
50 histopatológica e os tecidos epididimal, mesentérica e retroabdominal para avaliação da deposição de
51 gordura nos ratos. Nas análises dos dados aplicaram-se ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn
52 com significância de 5%.

53 *Resultados:* Os ratos do grupo GO tiveram dislipidemia e esteatose hepática. Os ratos dos grupos
54 GOQ1 e GOQ2 não apresentaram dislipidemia e esteatose hepática, mas somente os ratos do grupo GOQ2
55 apresentaram reorganização das trabéculas hepáticas.

56 *Conclusão:* A suplementação com 20 mg de quercetina/dia foi a melhor dose capaz de reduzir a
57 dislipidemia e a esteatose hepática em ratos alimentados com dieta obesogênica.

58

59 **Palavras-chave:** Sobrepeso. Flavonóide. Lipoproteína. Colesterol. Síndrome metabólica.

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70 **Introdução**

71

72 A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem considerado a obesidade como uma epidemia
73 mundial. Esta doença tem sido definida como um acúmulo excessivo de gordura no organismo do ser
74 humano e que prejudica à sua saúde devido aos transtornos metabólicos, como a dislipidemia [1,2],
75 esteatose hepática e resistência a insulina [2]. Ainda mais, a obesidade é um fator de risco para o
76 desenvolvimento de doenças crônicas como as cardiovasculares e diabetes melito tipo 2 [1,3]. A
77 obesidade também é uma doença inflamatória por provocar mudanças no tecido
78 adiposo [4]. Quando o ser humano possuir três ou mais das comorbidades descritas, incluindo ou não
79 a obesidade, ele preenche os critérios para caracterizar a síndrome metabólica [5].

80 A obesidade na infância e adolescência provavelmente causará sobrepeso e obesidade na fase
81 adulta, podendo estar associado ao maior risco e desenvolvimento precoce de doenças crônicas como
82 diabetes tipo 2, implicações psicossociais adversas e menor nível de escolaridade [1,6].

83 A etiologia da obesidade é difícil de ser identificada por ser multifatorial resultando da
84 interação entre os fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e
85 psicológicos [5,7]. Dentre eles, está a ingestão excessiva e/ou desequilibrada de
86 alimentos obsogênicos associado a vida sedentária com atividade física insuficiente [1,7].

87 Intervir na obesidade é importante para reduzir o risco de desenvolvimento dos transtornos
88 metabólicos e o aparecimento de doenças crônicas e, assim, conferir melhor qualidade de vida para
89 os seres humanos [1,8].

90 Para o tratamento da obesidade, tem sido indicada uma mudança dos hábitos alimentares, onde
91 é instituída uma alimentação balanceada em macronutrientes, vitaminas e minerais composta por
92 alimentos como as verduras, legumes e frutas que são ricos em fibras, e também alimentos
93 proteicos [9,10], no entanto, o tratamento das comorbidades associadas à obesidade e a manutenção
94 da massa magra após a perda de peso são difíceis de ser alcançados pelo paciente obeso [8,11] por
95 isso frequentemente tem sido recomendado o tratamento medicamentoso associado ao alimentar.

96 Concomitantemente, estudos relatam que mais de 40% dos medicamentos prescritos no mundo
97 para o tratamento de vários distúrbios são derivados principalmente de ervas, vegetais e frutas, e os
98 principais componentes presentes que conferem tal atributo são: os flavonóides,
99 alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e lignanas [12].

100 A quercetina é um flavonóide presente em várias frutas e vegetais, como por exemplo: maçã,
101 brócolis, cebola, alcaparra. Possui efeitos antioxidante, anti-inflamatório hepatoprotetor e tem sido
102 benéficos para a terapia de doenças neurodegenerativas [13,14].

103 Embora a quercetina esteja amplamente presente nos alimentos sua absorção é baixa, variando
104 de 3% a 17% em indivíduos saudáveis [15]. A recomendação diária, tempo de tratamento e forma de

105 ingestão da quercetina ainda vem sendo discutida e estudada, assim como a biodisponibilidade nos
106 alimentos desse componente. Em humanos, a dose recomendada varia entre 500 a 1.000 mg de
107 quercetina/dia [15,16]. Devido a ampla variação da dose recomendada de quercetina, há necessidade
108 de pesquisas para avaliar os efeitos e determinar uma dose ideal dos nutrientes funcionais que tem
109 potencial para as terapias que atenuam os efeitos deletérios da obesidade tais como
110 dislipidemia, esteatose hepática, resistência a insulina e diabetes melito tipo 2.

111 Assim o objetivo deste estudo foi avaliar se as suplementações com 10 e 20 mg de quercetina,
112 tem potencial para amenizar os efeitos deletérios da obesidade sobre o ganho de peso, no perfil
113 lipídico sérico, na esteatose hepática e na deposição de gordura corporal em
114 ratos com dieta obesogênica (hiperlipídica e hipercalórica).

115

116 **Métodos de pesquisa e procedimentos.**

117

118 O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
119 Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil (protocolo 3826), seguindo as
120 recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) [17] e em
121 conformidade com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Committee for the*
122 *Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [18].

123

124 *Procedimentos e delineamento experimental*

125

126 O período experimental foi de 16 semanas, sendo que as oito primeiras semanas foram para
127 induzir os efeitos deletérios da obesidade nos ratos, seguido de mais oito semanas para tratamento
128 dos ratos com quercetina.

129 Utilizaram-se 32 ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso corporal médio de $248,3 \pm 21,1$
130 g DP que foram alojados em temperatura ambiente de 23 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas [22,23]
131 e alimentados com ração comercial (Supralab[®], produzido por Alisul, Rio Grande do Sul, Brasil) e
132 água *ad libitum* que atendia as exigências nutricionais dos ratos segundo as recomendações do
133 *National Research Council - NRC* [19].

134 Os ratos foram divididos randomicamente em quatro grupos experimentais (n=8 ratos/grupo) e
135 foram mantidos 2 ratos por gaiola que receberam os seguintes tratamentos:

136

137 - *Grupo controle (GC)*: os ratos receberam dieta controle e uma goma (sem quercetina
138 purificada) para simular o tratamento com quercetina nos demais grupos experimentais.

139

140 - *Grupo obeso (GO)*: os ratos foram alimentados com ração obesogênica (hipercalórica e
141 hiperlipídica) [25], água *ad libitum* e uma goma (sem quercetina purificada) para simular o tratamento
142 com quercetina nos demais grupos experimentais.

143

144 - *Grupo obeso tratado com 10 mg de quercetina purificada (GOQ1)*: alimentou-se os ratos com
145 ração obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) [20], água *ad libitum* e uma goma contendo 10 mg
146 de quercetina purificada/dia.

147

148 - *Grupo obeso suplementado com 20 mg de quercetina purificada (GOQ2)*: os ratos receberam
149 ração obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica) [20], água *ad libitum* e uma goma contendo 20 mg
150 de quercetina purificada/dia.

151

152 As doses de 10 e 20 mg de quercetina administradas aos ratos dos grupos GOQ1 e GOQ2,
153 respectivamente, foram extrapoladas alometricamente das doses de quercetina indicadas para seres
154 humanos que são 500 e 1.000 mg de quercetina/dia [15].

155 Os cálculos alométricos das doses de quercetina utilizadas no experimento foram realizados
156 aplicando a fórmula: Dose Total (DT) Quercetina = $DT_{\text{homem}} \times TMB_{\text{homem}} = DT_{\text{rato}} \times TMB_{\text{rato}}$. A Taxa de
157 Metabolismo Basal (TMB) do homem e do rato foram calculadas por meio da fórmula: $TMB = K$
158 (constante relacionada à temperatura corporal) \times peso corporal^{0,75}. Para o cálculo do intervalo de
159 administração (ID) da quercetina foi aplicado a fórmula: $ID_{\text{Quercetina}} = ID_{\text{homem}} \times TME_{\text{homem}} = ID_{\text{rato}} \times$
160 TME_{rato} . A Taxa Metabólica Específica (TME) do homem e do rato foram calculadas por meio da
161 fórmula: $TME = TMB \div$ peso corporal [21].

162 A goma que foi administrada aos ratos era composta por 3,4 g de ágar, 7,5 g de gelatina de
163 morango e 100 mL de água. Os ingredientes eram misturados previamente, depois aquecidos e
164 acondicionados em formas que assumiam o formato de pequenas gomas. As doses de 10 e 20 mg de
165 quercetina purificada era adicionada nas gomas, durante o resfriamento.

166 As gomas eram administradas aos ratos uma vez ao dia e sempre no período da manhã. Os ratos
167 eram separados nas gaiolas colocando uma divisória de acrílico transparente no seu interior até que
168 os ratos consumissem totalmente a goma contendo seu respectivo tratamento. Logo após, a divisória
169 era retirada das gaiolas.

170 A ração obesogênica (hiperlipídica e hipercalórica) administrada aos ratos dos grupos GO, GOQ1
171 e GOQ2 era composta por 50% de ração balanceada comercial (Supralab[®] produzido por Alisul, Rio
172 Grande do Sul, Brasil), 20% de frutose PA e banha suína para atingir concentração de 30% extrato
173 etéreo [20,22] e sua composição química está apresentada na Tabela 1.

174 A dieta administrada aos ratos do grupo GC era composta de uma ração comercial balanceada
 175 (Supralab[®] produzido por Alisul, Rio Grande do Sul, Brasil) que sua composição química está
 176 apresentada na Tabela 1.

177

178 **Tabela 1**

179 Composição química das dietas controle e obesogênica (hiperlipídica e hipercalórica) administradas
 180 aos ratos durante o período experimental.

Dietas	Composição química (%)							
	MS	NDT	PB	EE	MM	FDN	FDA	Hemicelulose
Dieta obesogênica	91,69	85,16	13,40	32,05	5,49	17,28	4,80	12,48
Dieta controle	89,31	83,07	25,42	4,54	10,45	21,97	7,49	14,48

181 MS = Matéria seca. NDT = Nutrientes digestivos totais. PB = Proteína bruta. EE = Extrato etéreo. MM = Matéria mineral.

182 FDN = Fibra de detergente neutra. FDA = Fibra de detergente ácida.

183

184

185 Os níveis de garantia de minerais e vitaminas por Kg de ração comercial (Supralab[®] produzido
 186 por Alisul, Brasil) era de: 1,2% de cálcio; 0,7% de fósforo; 9,0 mg de cobre; 40,0 mg de ferro; 0,7
 187 mg de iodo; 90,0 mg de manganês; 0,4 mg de selênio; 50,0 mg de zinco; 3.000 mg de metionina;
 188 7.000 UI de vitamina A; 50 mg de vitamina C; 2.000 UI de vitamina D₃; 15 UI de vitamina E; 1,0 mg
 189 de vitamina K₃; 2,0 mg de vitamina B₁; 6,0 mg de vitamina B₂; 3,0 mg de vitamina B₆; 9,0 mg de
 190 vitamina B₁₂; 1,0 mg de ácido fólico; 12,0 mg de ácido pantotênico; 0,5 mg de biotina; 500,0 mg de
 191 colina e 20,0 mg de niacina.

192 O consumo de água e ração foi mensurado diariamente aplicando a fórmula: (volume ofertado
 193 - volume que sobrava / pela quantidade de ratos na caixa [23,24].

194

195 *Eutanásia e as colheitas das amostras de sangue, fígado e tecido adiposo*

196

197 Após 16 semanas de experimento, anestesiou-se os ratos com 40 mg de tiopental sódico/Kg de
 198 peso corporal, que foi aplicado por via intraperitoneal, e colheu-se as amostras de sangue por meio
 199 da punção cardíaca [25] em tubos à vácuo sem anticoagulante. Logo após, o sangue foi centrifugado
 200 a 2.500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro para as determinações das concentrações séricas
 201 triglicérido, colesterol total, HDL (*High Density Lipoproteins*), LDL (*Low-Density Lipoprotein*) e
 202 das enzimas alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

203 Após as colheitas de sangue, os ratos morreram por overdose de barbitúrico (100 mg de
 204 tiopental sódico/Kg de peso corporal, aplicado por via intraperitoneal) [17] e colheu-se as amostras

205 do fígado que foram mantidos em formol a 10% até a realização das análises histopatológicas e
206 também foram colhidos amostras de tecido adiposo epididimal, mesentérico e retroperitoneal para
207 pesagem.

208

209 *Determinação do ganho de peso dos ratos*

210

211 Os ganhos de peso dos ratos foram calculados em dois momentos, antes e depois da
212 administração da quercetina. O primeiro momento compreendeu o período que foi administrado
213 somente a ração obesogênica para os ratos, foi calculado subtraindo-se o peso corporal dos ratos do
214 dia que foi iniciado a administração da quercetina do peso inicial do experimento. O segundo
215 momento, consistiu no período de administração da quercetina e ração obesogênica para os ratos, foi
216 calculado subtraindo-se o peso corporal dos ratos do final do experimento do peso do dia que foi
217 iniciado a administração da quercetina para os ratos.

218 Os ratos foram pesados semanalmente desde o dia que foi iniciado até o final do experimento.

219

220 *Análises laboratoriais*

221

222 *Avaliação da função hepática*

223

224 As concentrações séricas de ALT e AST dos ratos foram dosadas por meio do teste
225 colorimétrico enzimático utilizando kits comerciais (ALTL[®] e ASTL[®], Roche, Brasil) e as leituras
226 foram efetuadas no aparelho COBAS c111[®] (Roche). Os resultados estão expressos em mg dL⁻¹.

227 As concentrações de ALT e AST foram monitorados com soro normal como controle de
228 acurácia e precisão de testes para determinação quantitativa *in vitro* de analitos em sistemas
229 fotométricos.

230 A análise histopatológica do fígado dos ratos foi realizada por meio da adaptação da técnica
231 descrita por Grenier et al. [26]. As amostras do fígado foram fixadas em formol a 10% durante 48h.
232 Logo após, esta fixação, cortou-se as amostras do fígado, acondicionou-se em cassetes histológicos
233 que foram mantidos em álcool 70°. Depois, estas amostras foram embebidas em blocos de parafina e
234 cortadas com 3 µm de espessura em micrótomo, dispostas em lâminas para microscopia e coradas
235 com hematoxilina-eosina. Na leitura das lâminas avaliou-se uma área de 2.000-2.500 µm²,
236 identificando as lesões desorganização da trabécula hepática (severidade 1), vacuolização célula
237 hepática (severidade 1), apoptose (severidade 2), megalocitose (severidade 2), vacuolização nuclear
238 (severidade 1). O escore lesional do fígado máximo de 21 foi calculado conforme a fórmula descrita
239 por Grenier et al. [26].

240 Escore lesional do fígado = [(fator de severidade x extensão da desorganização da trabécula
241 hepática) + (fator de severidade x extensão da vacuolização célula hepática) + (fator de severidade x
242 apoptose) + (fator de severidade x megalocitose) (fator de severidade x vacuolização nuclear)]

243 A extensão de cada lesão avaliada no fígado dos ratos foi pontuada aplicando pontuação de 0 a
244 3: zero: quando não havia lesão no tecido; 1: era considerado baixa extensão quando 25% do tecido
245 estava afetado pela lesão; 2: era considerado extensão média quando 50% do tecido estava afetado
246 pela lesão e 3: era considerado quando grande extensão quando 75% ou mais do tecido afetado pela
247 lesão.

248

249 *Determinação do Perfil Lipídico*

250

251 As concentrações séricas de triglicérides, colesterol total, HDL e LDL dos ratos foram dosadas
252 por meio do teste colorimétrico enzimático utilizando kits comerciais (TRIGL[®], CHOL2[®], HDLC3[®]
253 e LDLC3[®] Roche) e as leituras foram efetuadas no aparelho COBAS c111[®] (Roche). Os resultados
254 estão expressos em mg/dL.

255

256 *Análise Estatística*

257

258 O consumo de água, ração e peso corporal dos ratos apresentaram distribuição normal pelo teste
259 de Shapiro-Wilk e foram analisados por meio da Análise de Variância para medidas repetidas e as
260 médias foram comparadas pelo teste de Tukey [27].

261 Os resultados do ganho de peso, escore lesional do fígado e as concentrações séricas de
262 triglicérides, colesterol total, HDL, AST e ALT dos ratos apresentaram distribuição normal pelo teste
263 de Shapiro-Wilk e foram analisados por meio da Análise de Variância *one-way* e as médias foram
264 comparadas pelo teste de Tukey [27].

265 Os resultados das concentrações séricas de LDL dos ratos apresentaram distribuição não normal
266 pelo teste de Shapiro-Wilk e foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e as medianas foram
267 comparadas pelo Teste de Dunn [27].

268 Em todas as análises aplicou-se a significância de 5%. [27].

269

270 **Resultados**

271

272 No consumo de água e ração não houve efeito da interação entre tratamentos com ou sem
273 quercetina ($p = 0,8283$) e nem efeito da linhagem do rato ($p = 0,6236$).

274 O consumo de água e ração dos ratos dos grupos GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} não diferiram antes e depois
 275 da administração da quercetina (Tabela 2, $p = 0,1233$), mas o consumo de água e ração destes grupos
 276 experimentais foi menor do que o grupo GC (Tabela 2, $p = 0,0001$).

277

278 Tabela 2

279 Consumo de água e de ração ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta
 280 obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica).

Grupos experimentais	Consumo de água (g/dia)		Consumo de ração (g/dia)	
	Sem quercetina	Com quercetina	Sem quercetina	Com quercetina
GC	97,57 ± 4,50 ^{Aa}	84,68 ± 12,58 ^{Aa}	48,77 ± 0,63 ^{Aa}	42,30 ± 7,8 ^{Aa}
GO	44,78 ± 1,77 ^{Ba}	37,46 ± 9,11 ^{Ba}	22,4 ± 0,77 ^{Ba}	18,75 ± 3,92 ^{Ba}
G _{OQ1}	47,45 ± 1,72 ^{Ba}	45,23 ± 7,48 ^{Ba}	23,73 ± 0,51 ^{Ba}	22,63 ± 3,36 ^{Ba}
G _{OQ2}	50,18 ± 1,48 ^{Ba}	45,50 ± 8,44 ^{Ba}	25,10 ± 0,82 ^{Ba}	22,75 ± 4,20 ^{Ba}

281 ^{A,B} – Médias acompanhadas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença estatística ($p=0,0001$) entre os grupos
 282 experimentais dentro de cada coluna da tabela.

283 ^a – Médias acompanhadas de letra minúscula são semelhantes estatisticamente entre si entre os tempos de suplementação
 284 com quercetina (sem e com quercetina) dentro de um mesmo grupo experimental.

285 CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. G_{OQ1} =
 286 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. G_{OQ2} = recebeu dieta obesogênica e
 287 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

288

289

290 No peso corporal dos ratos houve efeito da interação entre tratamento e tempo experimental (p
 291 = 0,0001) e também ocorreu efeito do rato sobre seu peso corporal ($p = 0,0001$).

292 No início do experimento o peso corporal dos ratos era semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos
 293 experimentais (Fig. 1A). Após a administração da dieta obesogênica, o peso corporal dos ratos dos
 294 grupos GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} não diferiram entre si antes ($p > 0,05$) foram menores ($p = 0,0001$) do que
 295 o peso dos ratos do grupo GC dentro de cada período experimental, antes e depois da suplementação
 296 com quercetina (Fig. 1A).

297 O peso corporal dos ratos dos grupos GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} não apresentou diferença ($p = 0,0723$)
 298 entre os períodos experimentais sem e com suplementação com quercetina (Fig. 1A). Entretanto, os
 299 ratos do grupo GC apresentam um aumento ($p = 0,0001$) no peso corporal no segundo período
 300 experimental (com suplementação com quercetina) (Fig. 1A).

301 No ganho de peso dos ratos, não houve efeito da interação entre tratamento e tempo
 302 experimental ($p = 0,7862$) e também não ocorreu efeito da linhagem do rato sobre seu ganho peso (p
 303 = 0,9449). Já os grupos GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} não diferiram entre si antes ($p = 0,9219$) e o ganho de peso

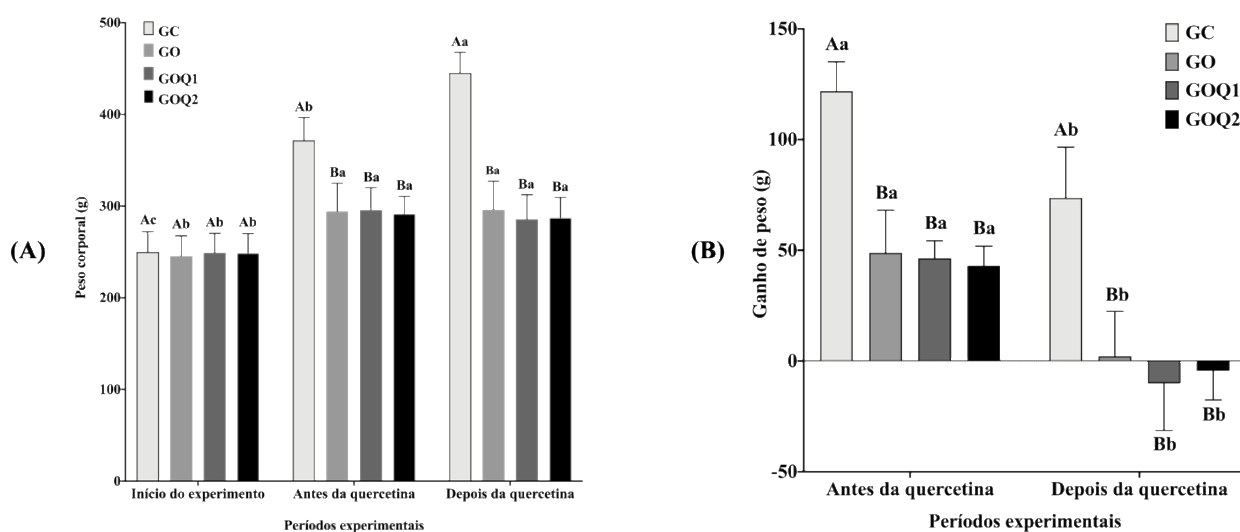
304 foi menor ($p = 0,0001$) do que o ganho de peso dos ratos do grupo GC dentro de cada período
 305 experimental, antes e depois da suplementação da quercetina (Fig. 1B).

306 No segundo período experimental, após a suplementação com quercetina, o ganho de peso dos
 307 grupos GC, GO, GOQ1 e GOQ2 foi menor ($p = 0,0001$) do que o ganho de peso desses ratos no período
 308 sem suplementação com quercetina (Fig.1B).

309

310

311



312

313 **Fig. 1.** Peso corporal (A) e ganho de peso (B) de ratos Wistar suplementados com quercetina
 314 consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica).

315 ^{A,B} – Letras maiúsculas distintas sobre as barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de cada
 316 período experimental.

317 ^{a,b} - Letras minúsculas distintas sobre as barras indicam diferença estatística entre os períodos experimentais dentro de
 318 cada grupo experimental.

319 CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. GOQ1 =
 320 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. GOQ2 = recebeu dieta obesogênica e
 321 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

322

323

324 As concentrações séricas de triglicérides dos ratos dos grupos GOQ1 e GOQ2 eram menores (p
 325 = 0,0001) que as concentrações dos grupos GO e GC (Fig. 2A) e a concentração sérica de triglicérides
 326 do grupo GO era maior ($p = 0,0045$) do que as concentrações do grupo GC (Fig. 2A).

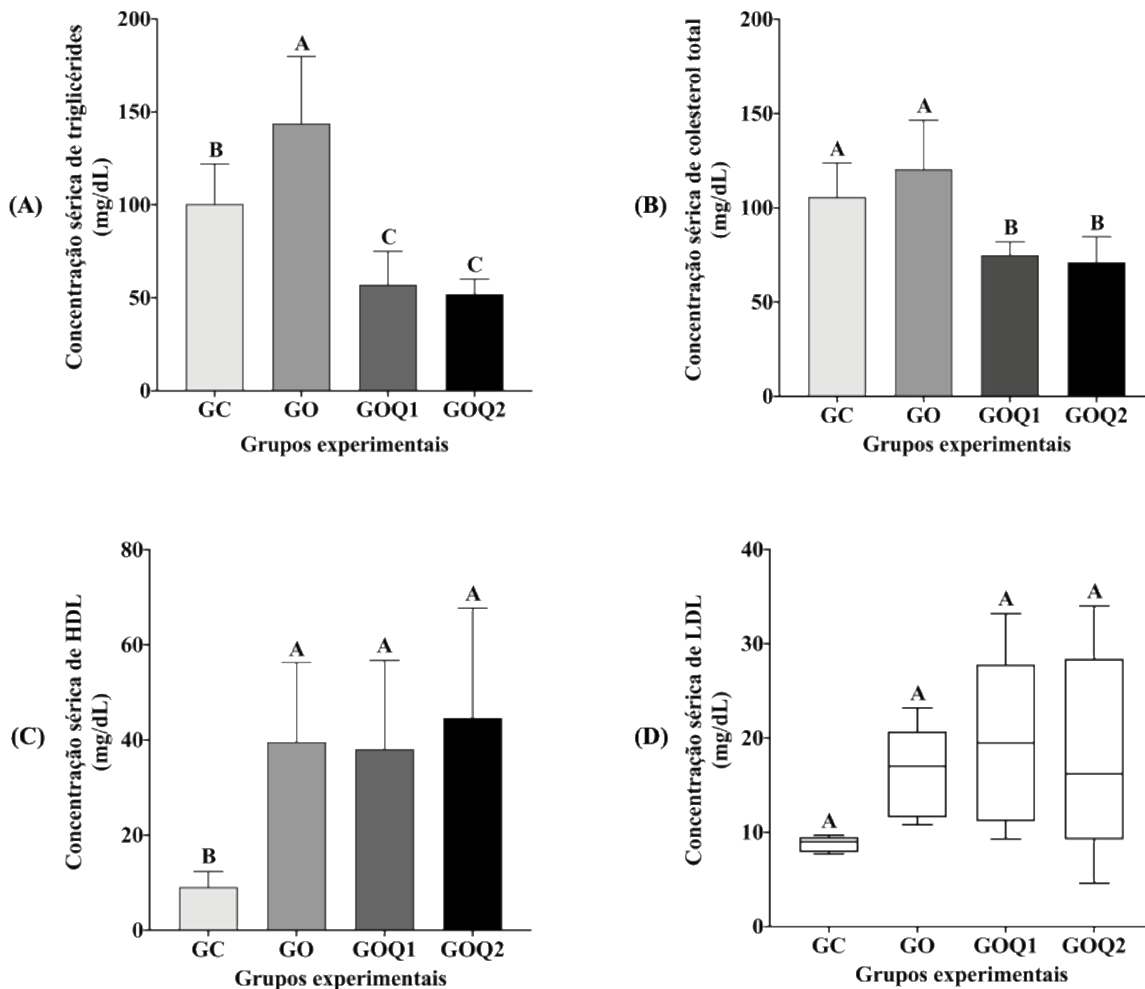
327 As concentrações séricas de colesterol total dos ratos dos grupos GOQ1 e GOQ2 não diferiram
 328 entre si ($p = 0,9711$) e eram menores ($p = 0,0001$) do que as concentrações dos grupos GO e GC (Fig.
 329 2B). As concentrações séricas de colesterol total dos ratos dos grupos GC e GO eram semelhantes
 330 entre si (Fig. 2B; $p = 0,3570$).

331 As concentrações séricas de HDL dos ratos dos grupos GO, GO_{Q1} e GO_{Q2} não apresentaram
 332 diferença ($p > 0,05$) entre os grupos e eram maiores ($p = 0,0189$) do que as concentrações séricas de
 333 HDL dos ratos do grupo GC (Fig. 2C).

334 As concentrações séricas de LDL dos ratos dos grupos GC, GO, GO_{Q1} e GO_{Q2} eram
 335 semelhantes entre si (Fig. 2D; $p = 0,0604$).

336

337



338

339 **Fig. 2.** Perfil lipídico de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica
 340 (hipercalórica e hiperlipídica). (A) – Concentração sérica de triglicérides, valor de referencia: $82,0 \pm$
 341 $24,7$ mg/dL [28]. (B) – Concentração sérica de colesterol total, valor de referencia: $87,0 \pm 18,1$
 342 mg dL [28]. (C) – Concentração sérica de HDL, valor de referencia: $17,82 \pm 18,71$ mg/dL [29]. (D) –
 343 Concentração sérica de LDL, valor de referencia: $15,3 \pm 8,3$ mg/dL [29].

344 ^{A,B} – Letras másculas distintas sobre as barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais.

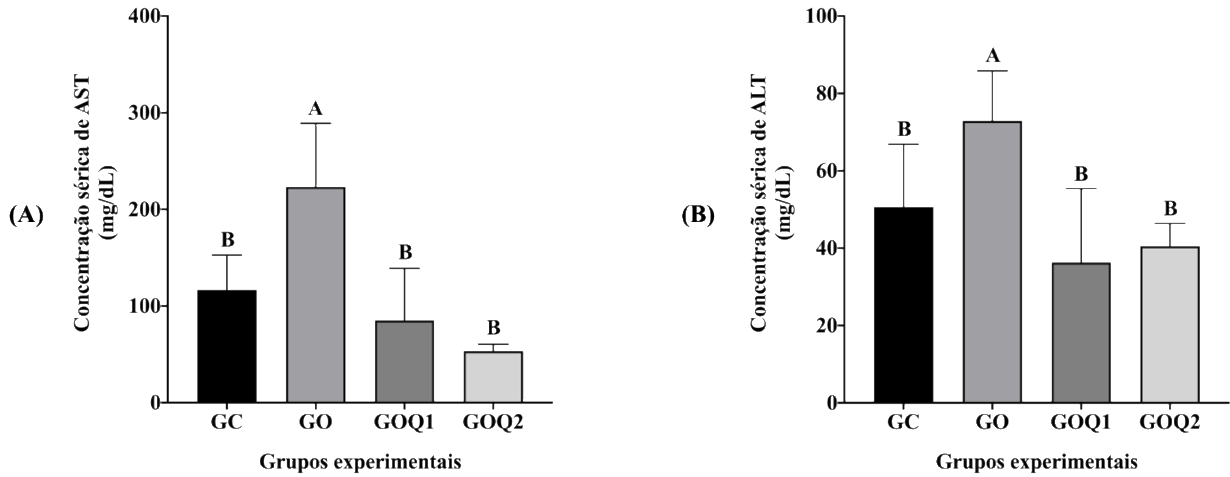
345 CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. GO_{Q1} =
 346 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. GO_{Q2} = recebeu dieta obesogênica e
 347 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

348

349 As concentrações séricas das enzimas AST e ALT dos ratos dos grupos dos grupos GC, G_{OQ1}
 350 e G_{OQ2} não diferiram entre si ($p = 0,5282$) e também eram menores ($p = 0,0001$) do que os ratos do
 351 grupo GO (Fig. 3A e Fig. 3B).

352

353



354

355 **Fig. 3.** Concentrações séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e da aspartato
 356 alanintransferase (ALT) (B) de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta
 357 obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica).

358 ^{A,B} – Letras maiúsculas distintas sobre as barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais

359 CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. G_{OQ1} =
 360 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. G_{OQ2} = recebeu dieta obesogênica e
 361 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

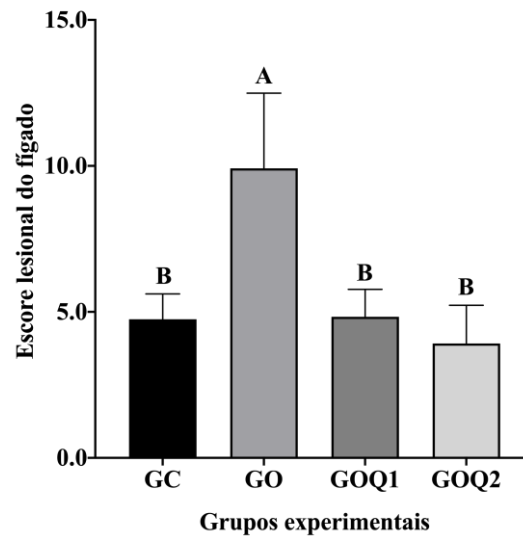
362

363

364 O escore lesional do fígado dos ratos dos grupos dos grupos GC, G_{OQ1} e G_{OQ2} não diferiram
 365 entre si ($p = 0,5725$) e também eram menores ($p = 0,0001$) do escore dos ratos grupo GO (Fig. 4).

366

367



368

369 **Fig. 4.** Escore lesional do fígado de ratos Wistar suplementados com quercetina consumindo dieta
 370 obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica).

371 ^{A,B} – Letras maiúsculas distintas sobre as barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais.

372 CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. GOQ1 =
 373 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. GOQ2 = recebeu dieta obesogênica e
 374 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

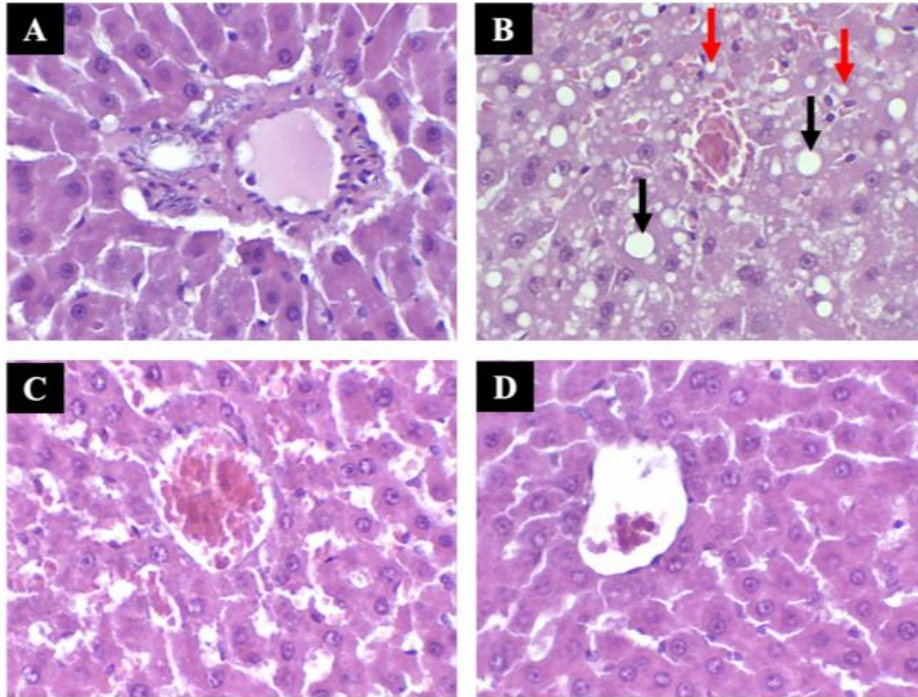
375

376

377 Os ratos suplementados com quercetina dos grupos GOQ1 apresentaram diminuição da
 378 degeneração lipídica no fígado (Fig. 5C) e GOQ2 apresentam menos esteatose hepática e maior
 379 reorganização das trabéculas hepáticas após a suplementação (Fig. 5D).

380

381



382

383

384 **Fig. 5.** Fotomicrografia das características histológicas do fígado de ratos Wistar suplementados com
 385 quercetina consumindo dieta obesogênica (hiperlipídica e hipercalórica). (A) grupo GC:
 386 características histológicas preservadas do fígado. (B) grupo GO: presença de esteatose hepática,
 387 caracterizado por gotas lipídicas, macrodegeneração lipídica (seta preta) e microdegeneração lipídica
 388 (seta vermelha) no fígado. (C) grupo G_{OQ1}: sem esteatose, porém com desorganização no fígado após
 389 a suplementação com 10 mg de quercetina/dia. (D) grupos G_{OQ2}: diminuição da esteatose e
 390 reorganização das trabéculas hepáticas após a suplementação com 20 mg de quercetina/dia. Aumento
 391 de 400x.

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

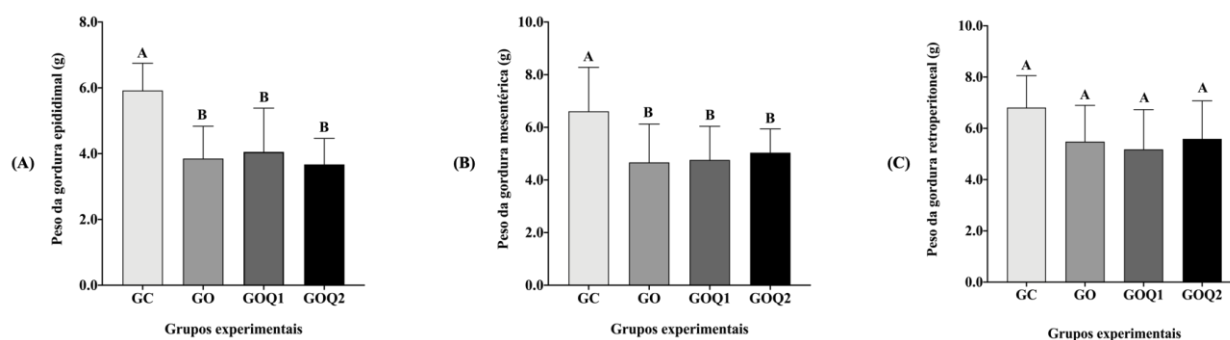
402

403

CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. G_{OQ1} =
 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. G_{OQ2} = recebeu dieta obesogênica e
 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

Os pesos das gorduras epididimais e mesentéricas dos ratos dos grupos GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} eram semelhantes entre si ($p > 0,005$) e menores ($p = 0,0007$) do que os pesos das gorduras dos ratos do grupo GC (Fig 6A).

As gorduras retroperitoneais dos ratos dos grupos GC, GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} eram semelhantes entre si ($p = 0,0660$; Fig. 6C).



404
405

406 **Fig. 6.** Peso da gordura epididimal (A), mesentérica (B) e retroabdominal (C) de ratos Wistar
407 suplementados com quercetina consumindo dieta obesogênica (hipercalórica e hiperlipídica).

408 ^{A,B} – Letras maiúsculas distintas sobre as barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais.

409 CG = grupo controle recebeu água e ração balanceada *ad libitum*. GO = grupo obeso recebeu dieta obesogênica. GOQ1 =
410 recebeu dieta obesogênica e suplementado com 10 mg de quercetina/dia. GOQ2 = recebeu dieta obesogênica e
411 suplementado com 20 mg de quercetina/dia.

412

413

414 Discussão

415

416 Nosso experimento evidenciou que a suplementação com quercetina reduziu a dislipidemia
417 (concentração sérica de triglicérides e colesterol total) e a esteatose hepática em
418 ratos alimentados com dieta obesogênica.

419 Os ratos do grupo GC apresentaram as concentrações séricas das enzimas AST e ALT,
420 características histológicas do fígado dentro da normalidade e as concentrações séricas de triglicérides,
421 colesterol total, HDL, LDL dentro da normalidade. Estes valores corroboram com Dantas et al.
422 [28] que consideram valores normais as concentrações séricas de triglicérides de $82,0 \pm 24,7$ mg/dL
423 e colesterol total de $87,0 \pm 18,1$ mg/dL e Roberto et al. [29] relataram concentração normal de HDL
424 de $17,82 \pm 18,71$ mg/dL. Assim, consideramos os valores dos analitos séricos dos ratos do grupo GC
425 como valores normais para comparação com os demais grupos experimentais.

426 A dieta obesogênica (hiperlipídica e hipercalórica) utilizada no experimento foi capaz de
427 simular nos ratos do grupo GO os efeitos deletérios que a obesidade gera na saúde dos seres
428 humanos tais como a dislipidemia e esteatose hepática [2]. As concentrações séricas de triglicérides
429 dos ratos do grupo GO estavam acima das concentrações consideradas normais dos ratos do grupo
430 GC indicando que os ratos do grupo GO apresentavam dislipidemia. Além disso, as concentrações
431 séricas das enzimas AST e ALT dos ratos do grupo GO também estavam acima das concentrações
432 consideradas normais dos ratos do grupo GC que havia lesão no fígado desses ratos, mesmo não
433 havendo descrição de inflamação. A presença de gotas lipídicas, macrodegeneração

434 e microdegeneração lipídica são alterações histológicas indicativas de esteatose hepática [30] nos
435 ratos do grupo GO.

436 Os ratos dos grupos GO, G_{OQ1} e G_{OQ2} consumiram menor quantidade de água
437 e dieta obesogênica do que os ratos do grupo controle provavelmente devido a alta concentração
438 energética da ração obesogênica que estimula a liberação de leptina pelo tecido adiposo que é um
439 hormônio sacietogênico [31]. Esta menor ingestão de alimentos resultou em menor ganho de peso e
440 peso corporal desses ratos antes e depois da suplementação com quercetina. Enquanto na ração
441 comercial balanceada do grupo controle tinha menor concentração energética, provavelmente
442 concentração reduzida de leptina e menor saciedade [32,33] fez com que os ratos consumissem maior
443 quantidade de ração e conseqüentemente maior ganho de peso, peso corporal e acúmulo de tecido
444 epididimal e mesentérico.

445 As suplementações com quercetina não foram capazes de interferir no peso corporal e no
446 ganho de peso dos ratos, uma vez que esses dados antropométricos dos grupos G_{OQ1} e G_{OQ2} eram
447 semelhantes aos dos ratos do grupo GO que consumiram somente a ração obesogênica.
448 Depois das suplementações com quercetina, os ratos dos G_{OQ1} e G_{OQ2} tenderam para o ganho de peso
449 negativo, mas não foi suficiente para diferenciar do grupo GO, além disso, neste período os ratos
450 dos grupos GC e GO também tiveram menor ganho de peso comparado ao período antes da
451 administração da quercetina.

452 As suplementações com 10 e 20 mg de quercetina/dia foram capazes de evitar um dos efeitos
453 deletérios da obesidade que é a dislipidemia, pois as concentrações séricas de triglicérides e colesterol
454 total dos ratos grupos G_{OQ1} e G_{OQ2} permaneceram dentro da normalidade mesmo após o consumo de
455 16 semanas da dieta obesogênica. Fato que é benéfico para reduzir o processo aterosclerótico e os
456 riscos de eventuais doenças cardiovasculares [34,35,36].

457 Corroborando com nossos resultados, Egert et al. [37], realizou um estudo para examinar o
458 efeitos da suplementação com quercetina em diversos aspectos entre eles o metabolismo lipídico, em
459 indivíduos entre 25 e 65 anos com doença metabólica, os quais foram randomizados para receber 150
460 mg de quercetina durante 6 semanas, em um estudo cruzado e duplo-cego, onde concluiu que a
461 quercetina reduziu as concentrações de LDL, fornecendo proteção contra doenças cardiovasculares.
462 Da mesma forma Schwertz et al. [16], em seu estudo concluiu que o suco de camu-camu, fruto fonte
463 de quercetina, apresentou efeito modulador do perfil lipídico em ratos *Wistar* com dislipidemia
464 induzida através de ração hiperlipídica, e suplementados com 0,4 mL/kg, 4,0 mL/kg e 10 mL/kg do
465 suco.

466 Outro fato interessante foi que as suplementações com quercetina também evitou a ocorrência
467 de mais um efeito deletério da obesidade que é a esteatose hepática, pois os ratos suplementados com
468 quercetina, grupos G_{OQ1} e G_{OQ2}, tiveram baixo escore lesional no fígado que era semelhante aos ratos

469 do grupo GC e também apresentaram diminuição da degeneração lipídica no fígado e ainda os ratos
470 do grupo G_{OQ2} suplementados 20 mg de quercetina/dia tiveram a reorganização das trabéculas
471 hepáticas sendo benéfico para a saúde do obeso, uma vez que o fígado é responsável por realizar
472 diversas funções vitais como a síntese metabólica dos carboidratos, proteínas e no metabolismo
473 lipídico o fígado realiza a função de oxidação dos ácidos graxos para suprir energia em outras funções
474 corporais, síntese de uma grande quantidade de colesterol, fosfolípidos e lipoproteínas e síntese de
475 gordura, a partir das proteínas e carboidratos [35].

476 Ambas as suplementações com 10 e 20 mg de quercetina/dia produziram efeitos
477 benéficos semelhantes como a redução da dislipidemia, das concentrações séricas de ALT,
478 AST, escore lesional e degeneração lipídica no fígado, mas a suplementação com 20 mg de
479 quercetina/dia ainda melhorou reorganização das trabéculas hepáticas o que favorece indicação dessa
480 dose de suplementação com quercetina. No entanto, neste experimento não foi possível elucidar todos
481 os mecanismos fisiológicos da quercetina que levaram a redução da dislipidemia e esteatose hepática
482 nos ratos.

483 Como a dose de quercetina utilizadas nos ratos do grupo G_{OQ2} corresponde alometricamente a
484 dose de 1.000 mg de quercetina/dia recomendada para os seres humanos [15], provavelmente esta
485 suplementação com quercetina têm potencial para contribuir adjuvamente com o tratamento da
486 dislipidemia e esteatose hepática nos seres humanos.

487 Foi possível destacar com este trabalho a importância de não consumir uma dieta hiperlipídica
488 e hipercalórica, pois mesmo indivíduos com baixo peso corporal e ganho de gordura visceral podem
489 apresentar os efeitos deletérios da obesidade, como esteatose hepática e dislipidemia.

490

491 **Conclusão**

492

493 Com os dados do nosso estudo, concluímos que a suplementação com 20 mg de quercetina/dia
494 é a melhor dose para reduzir a dislipidemia e a esteatose hepática em ratos alimentados com
495 dieta obesogênica.

496

497

498

499

500

501

502

503

504 **Referências**

505

506 [1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index,
507 underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based
508 measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet* 2017;390(10113):
509 2627-42.

510

511 [2] Timóteo AT, Carmo MM, Soares C, Ferreira RC. Is metabolic syndrome a prognostic marker in
512 patients at high cardiovascular risk? A long-term cohort study. *Rev Port Cardiol* 2019;38(5):325-32.

513

514 [3] Pavlou DI, Paschou SA, Anagnostis P, Spartalis M, Spartalis E, Vryonidou A. Hypertension in
515 patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. *Maturitas* 2018;112:71-7.

516

517 [4] Farias CRLD, Medeiros CCM, Souza DR, Costa IFAFD, Simões MODS, Carvalho DFD.
518 Persistent metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease in children and adolescents. *Rev*
519 *Bras Enferm* 2018;71(3):1013-21.

520

521 [5] Claro R M, Santos MAS, Oliveira TP, Pereira CA, Szwarcwald CL, Malta DC. Unhealthy food
522 consumption related to chronic non- communicable diseases in Brazil: National Health Survey, 2013.
523 *Epidemiol Serv Saúde*, 2015;24(2):257-65.

524

525 [6] Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: clinical
526 insights and vascular mechanisms. *Can J Cardiol* 2018;34(5):575-84.

527

528 [7] Henriques P, O'Dwyer G, Dias PC, Barbosa RMS, Burlandy L. Health and Food and Nutritional
529 Security Policies: challenges in controlling childhood obesity. *Ciênc. Saúde Coletiva* 2018;23:4143-
530 52.

531

532 [8] Dias PC, Henriques P, Anjos LAD, Burlandy L. Obesidade e políticas públicas: concepções e
533 estratégias adotadas pelo governo brasileiro. *Cadernos de Saúde Pública* 2017;33:6016.

534

535 [9] Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *J Gastroenterol*
536 *hepatol* 2013;28: 59-63.

537

- 538 [10] Mahan, L. Kathleen Krause alimentos, nutrição e dietoterapia / L. Kathleen Mahan, Janice L.
539 Raymond ; [tradução Verônica Mannarino , Andréa Favano]. - 14. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier,
540 2018.
- 541
- 542 [11] Abarca-Gómez, Leandra et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight,
543 and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in
544 128· 9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, 2017.
- 545
- 546 [12] Patel K, Patel DK. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of
547 hispidulin: A concise report. *J Tradit Complement Med* 2016;7(3):360-6.
- 548
- 549 [13] Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, Freitas V. Wine flavonoids in health and
550 disease prevention. *Molecules* 2017;22(2):292.
- 551
- 552 [14] Yang R, Li L, Yuan H, Liu H, Gong Y, Zou L, et al. Quercetin relieved diabetic neuropathic
553 pain by inhibiting upregulated P2X4 receptor in dorsal root ganglia. *J Cell Physiol* 2018;234(3):2756–
554 64.
- 555
- 556 [15] Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, inflammation and
557 immunity. *Nutrients* 2016;8(3):167.
- 558
- 559 [16] Schwertz MC, Maia JRP, Sousa RFSD, Aguiar JPL, Yuyama LKO, Lima ES. Hypolipidemic
560 effect of camu-camu juice in rats. *Revista de Nutrição* 2012;25(1):35-44.
- 561
- 562 [17] Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). Normativas do
563 CONCEA: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa
564 científica, 3 ed. Brasília, Brasil, 2016.
- 565
- 566 [18] Committee for Update of the guide for the care and use of the laboratory Animals:
567 Environment, housing and management. In: *Guide for the care and use of laboratory animals*.
568 Washington: The National Academic Press, 2011. pp. 41-103.
- 569
- 570 [19] National Research Council. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. 4ed., National
571 Academies Press: Washington, D.C., 1995.

- 572 [20] Lenquiste SA, Marinelia RS, Moraes ÉA, Dionísio AP, Brito ES, Maróstica Jr MR. Jaboticaba
573 peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity
574 model. *Food Res Int* 2015;77:162-70.
- 575
- 576 [21] Cubas ZS, Joppert AM. Terapêutica dos animais selvagens. In: Andrade SF, ed. *Manual of*
577 *veterinary therapy*, 3rd edition, ROCA; 2008:664–7.
- 578
- 579 [22] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report
580 of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A
581 rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939–51.
- 582
- 583 [23] Leocádio PC, Antunes MM, Teixeira LG, Leonel AJ, Alvarez-Leite JI, Machado DC, et al. L-
584 Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. *Nutr Cancer*
585 2015;67:486-93.
- 586
- 587 [24] Fagiani MAB, Fluminhan A, Mello FA, Yabuki D, Gonçalves GV, Tsujigushi LK et al. L-
588 arginine minimizes immunosuppression and prothrombin time and enhances the genotoxicity of 5-
589 fluorouracil in rats. *Nutrition* 2019;66:94-100.
- 590
- 591 [25] Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small lab- oratory
592 animals. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1:87–93.
- 593
- 594 [26] Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Lucioli J, Pacheco GD, Cossalter AM, Moll WD et al.
595 Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets.
596 *Mol Nutr Food Res* 2011;55:761-71.
- 597
- 598 [27] Zar JH. *Bioestatistical analysis*. Fifth edition Upper Saddle River, NJ: Pearson; 2009.
- 599
- 600 [28] Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns
601 parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do
602 Paraná. *Acta Scientiarum. Health Sciences* 2006;28(2);165-70.
- 603
- 604 [29] Roberto JVB, Nascimento Junior CS, Souza ESA, Martins RA, Araújo ER, Barros MMA.
605 Parâmetros bioquímicos de referência de ratos wistar de diferentes faixas de peso, provenientes do

606 biotério das faculdades nova esperança–pb.Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança
607 2018;16(1):81-7.

608

609 [30] Carvalheira JBC, Saad MJA. Insulin resistance/hyperinsulinemia associated diseases not
610 included in the metabolic syndrome. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50(2):360-7.

611

612 [31] Rodríguez-Valle A, Navarro-Ferrando MÁ, Boj-Carceller D, Escanero-Marcén JF, Sanz-Paris A.
613 Efecto del tratamiento de dos días con orlistat sobre los niveles de leptina plasmática en pacientes
614 obesas sin pérdida de peso. Nutrición Hospitalaria 2016;33(2):292-7.

615

616 [32] González E, Díez JJ, Pérez Torres A, Bajo MA, Del Peso G, Sánchez-Villanueva R. Body
617 composition analysis and adipocytokine concentrations in haemodialysis patients: Abdominal fat gain
618 as an added cardiovascular risk factor. Abdominal fat gain and cardiovascular risk. Nefrologia
619 2017;37(2):138-48.

620

621 [33] Martins F, Campos DHS, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP. Dieta hiperlipídica promove
622 remodelação cardíaca em modelo experimental de obesidade. Arquivos Brasileiros de Cardiologia,
623 2015; 479-86.

624

625 [34] Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AM P. I Diretriz
626 sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia
627 2013;100(1):1-40.

628

629 [35] Hall JE. Guyton e Hall tratado de fisiologia médica. Elsevier Brasil, 2017.

630

631 [36] Zhuang M, Qiu H, Li P, Hu L, Wang Y, Rao L. Islet protection and amelioration of type 2
632 diabetes mellitus by treatment with quercetin from the flowers of *Edgeworthia gardneri*. Drug Des
633 Devel Ther 2018;23(12):955-966.

634

635 [37] Egert S, Bosity-Westphal A, Seiberl J, Kürbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, et al. Quercetin
636 reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in
637 overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-
638 controlled cross-over study. Br J Nutr. 2009;102(7):1065-74.

639

640

641 ANEXO A - PARECER FINAL DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE
 642 ANIMAIS (CEUA) E COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) DA
 643 UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA – UNOESTE.

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
 PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM QUERCETIN, PERFIL LIPÍDICO E ANTIPOBESOGÊNICO EM RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM RAÇÃO OBESOGÊNICA", (Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3567 e tendo como participante(s) LUÍS SOUZA SOUZA REIS (responsável), SABRINA ALVES LENQUISTE (docente), ALINE MORAES MENACHO (discente), ILANA CAR FERREIRA DO CARMO (discente), LETICIA KAZAMA TSUJIGUSHI (discente), VANESSA DE PAIVA ALVES GOMES (avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO I (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (mamífero), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.094, de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APRESENTADA em reunião realizada em 07/12/2016.

Vigência do projeto: 01/2017 a 01/2020.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Rattus norvegicus Wistar	90	200 gramas	60 dias	M	Biotério U

Presidente Prudente, 14 de M.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
 Coordenadora da CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3229-2079 - cep@unoeste.br
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 183229-2079 - ceua@unoeste.br

645 **ANEXO B - INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA NUTRITION**

646

647 **GUIDE FOR AUTHORS**

648 *Please note that per 1 January 2019 the Nutrition Guide for Authors has been updated in regard*
649 *to the requirements for the submission of clinical trials. See further details below. Nutrition has an*
650 *open access mirror journal, Nutrition:*

651 *INTRODUCTION Nutrition provides an international forum for professionals interested in the*
652 *applied and basic biomedical nutritional sciences and publishes papers both of clinical interest and*
653 *of scientific import. Investigators are encouraged to submit papers in the disciplines of nutritionally*
654 *related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology,*
655 *physiology, and pharmacology. Papers on nutrition-related plant or animal sciences which are not*
656 *of direct relevance to man, whereas occasionally of interest are not the main focus of the Journal.*
657 *Nutrition publishes a wide range of articles, which includes original investigations, review articles,*
658 *rapid communications, research letters, case reports and special category manuscripts. Manuscripts*
659 *must be prepared in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to*
660 *Biomedical Journals" developed by the International Committee of Medical Journal Editors (N Engl*
661 *J Med 1991;324:424-428). All submissions are peer reviewed.*

662 *Original Investigation (3000-5000 words including tables, figures and references) Original*
663 *investigations are considered full-length applied (human) or basic (bench work) research reports.*
664 *They cover topics relevant to clinical and basic studies relevant to man in the following areas*
665 *nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology,*
666 *neurobiology, physiology, and pharmacology. Studies in adult and pediatric populations are*
667 *welcome. The work presented in the manuscript must be original; studies confirming previous*
668 *observations will be considered. Other considerations of a paper's publishability are its importance*
669 *to the science, the soundness of the experimental design, the validity of methods, the appropriateness*
670 *of the conclusions and the quality of presentation.*

671 *Rapid Communication (1000-3000 words including tables, figures and references) Papers*
672 *representing concise and original studies of scientific importance are considered. In the cover letter*
673 *the author should justify the request for Rapid Communication. The review process is 10 days,*
674 *authors are allowed one revision if accepted, and the final version of the paper appears in the next*
675 *available issue of the journal.*

676 *Research Letter (up to 1000 words, including up to 10 references and 1 figure or table) A*
677 *Research Letter contains new data or a clinical observation, in a format that allows for rapid*
678 *publication.*

679 *Review Article (up to 5000 words including tables, figures and references) In-depth,*
680 *comprehensive state of the art reviews on a nutritional topic are welcomed. Reviews may be invited*
681 *by the Editor or may be unsolicited viewpoints.*

682 *Case Report (up to 2500 words including tables figures, and references) Case Reports include*
683 *case studies of 4 or fewer patients that describe a novel situation or add important insights into*
684 *mechanisms, diagnosis or treatment of a disease.*

685 *Editorial (up to 1000 words including tables, figures and references) Editorials express*
686 *opinions on current topics of interest, or provide comments on papers published in Nutrition or other*
687 *journals. Editorials are generally solicited by one of the Editors.*

688 *Correspondence (Letter to the Editor) (1000 words including tables, figures and references)*
689 *Opinion pieces concerning papers published in Nutrition are particularly welcomed and all*
690 *submissions are subject to editing. Letters commenting on past-published papers are sent to the*
691 *corresponding author for a response. Letters are selected for their relevance and originality; not all*
692 *letters submitted can be published.*

693 *Meeting Proceedings (up to 2500 words including tables, figures and references)*

694 *Reports of meeting proceedings are synopses of scientific meetings of interest to Nutrition's*
695 *audience. Authors should e-mail the Editor to solicit potential interest 8 weeks prior to conference.*

696 *Collections of abstracts representing the proceedings of organizational meetings are not*
697 *subjected to customary peer review. It is the view of the Editorial Board that it is of service to the*
698 *nutrition community to present such material as promptly as possible. Hypothesis (up to 3000 words*
699 *including tables, figures and references) Novel insights into a significant questions or clinical issues*
700 *are welcome and will be peer reviewed. As the definition of "hypothesis" suggests, articles of this*
701 *type should be, although they lack direct experimental evidence, closely tied to empirical data and*
702 *lead to testable predictions.*

703 *Special Article (up to 5000 words including tables, figures and references) Associated with a*
704 *particular special event, invitation or announcement; for example, the annual John M. Kinney*
705 *Awards papers. SUBMISSION_CHECKLIST Ensure that the following information and files have*
706 *been included. One author has been designated as the corresponding author with contact details: E-*
707 *mail address Full postal address*

708 *Manuscript: Word doc or similar required. PDF is not suitable for review and production.*
709 *Include keywords. Has been spell-checked and grammar checked. Has been edited by professional,*
710 *preferably native-English-speaking editor.*

711 *Tables: Include titles, description, footnotes. Create tables in the document rather than*
712 *inserting image files, so that changes can be made.*

713 *Figures: High quality and good resolution. Provide separate image files as well as in-*
714 *manuscript. Include relevant captions. Indicate clearly if color should be used for any figures in print.*
715 *Ensure all figure and table citations in the text match the files provided.*

716 *If applicable include as separate files: Graphical abstracts Highlights (3-5, document file)*
717 *Supplemental files*

718 *References: All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa.*
719 *Make sure reference style is consistent throughout.*

720 *Further considerations: Permission has been obtained for use of copyrighted material from*
721 *other sources (including the Internet). Relevant declarations of interest have been made. Journal*
722 *policies detailed in this guide have been reviewed. Referee suggestions and contact details provided,*
723 *based on journal requirements. Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements*
724 *for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or*
725 *PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you*
726 *be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required*
727 *for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.*
728 *BEFORE YOU BEGIN Ethics in publishing Please see our information pages on Ethics in publishing*
729 *and Ethical guidelines for journal publication. CONDITIONS OF PUBLICATION — ETHICAL AND*
730 *LEGAL CONSIDERATIONS All material submitted to Nutrition, for any section of the journal, is*
731 *considered for publication on the understanding that authors (including all coauthors) agree to*
732 *Nutrition's publication policies as stated in this section of the Guidelines to Authors.*

733 *In the event of non-compliance with these conditions of publication, including issues that*
734 *surface after a contribution is published, Nutrition's rights include: sending a notice of failure to*
735 *comply to authors' employers and funding agencies; and/or informing readers via a published*
736 *correction/retraction; the latter is linked to the original contribution via electronic indexing and*
737 *becomes part of the formal published record.*

738 *Research/publication misconduct is a serious breach of ethics. Such misconduct includes:*

739 *i) Redundant or duplicate publication by same author(s), ii) Publication in another source by*
740 *the same author(s) without acknowledgement or permission from the publisher, or iii) Plagiarism or*
741 *self-plagiarism (publication of material without acknowledging original author source). iv)*
742 *Fabrication of data, not substantiable via review of research records.*

743 *Should such publications occur, editorial action would be taken. In certain cases, secondary*
744 *publication is justifiable and even beneficial; however, such circumstances should be prospectively*
745 *discussed with and agreed upon by the Editor-In-Chief.*

746 *Nutrition will not accept a submission of work previously reported in large part in a published*
747 *article (duplicate) or that is contained in another paper submitted or accepted for publication in*

748 *Nutrition or elsewhere. Informed consent and patient details* Studies on patients or volunteers require
749 *ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper.*
750 *Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include*
751 *case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an*
752 *Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be*
753 *provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances*
754 *(for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that*
755 *such consents have been obtained. For more information, please review the Elsevier Policy on the*
756 *Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written*
757 *permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient*
758 *included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and*
759 *videos) must be removed before submission. Declaration of interest All authors must disclose any*
760 *financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately*
761 *influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment,*
762 *consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations,*
763 *and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary*
764 *declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-*
765 *blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This*
766 *summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as*
767 *part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It*
768 *is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.*
769 *More information. Submission declaration and verification Submission of an article implies that the*
770 *work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published*
771 *lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information),*
772 *that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all*
773 *authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and*
774 *that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other*
775 *language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify*
776 *originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity*
777 *Check. Preprints Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with*
778 *Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior*
779 *publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).*

780 *Use of inclusive language Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all*
781 *people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no*
782 *assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might*

783 *imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other*
784 *characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is*
785 *free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of*
786 *job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant'*
787 *instead of 'stewardess'). Author contributions For transparency, we encourage authors to submit an*
788 *author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT*
789 *roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation;*
790 *Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization;*
791 *Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted*
792 *with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example Authorship*
793 *Corresponding Author: One author is designated the corresponding author (not necessarily the*
794 *senior author) who will be approached to clarify any issues, such as those pertaining to materials*
795 *and methods, or technical comments. If Nutrition receives feedback from its readers concerning the*
796 *published paper, the corresponding author will be contacted. It is this author's responsibility to*
797 *inform all coauthors of such matters to ensure they are dealt with promptly.*

798 *The corresponding author must affirm in the cover letter at the time of submission that:*

799 *1. None of the material in the manuscript is included in another manuscript, has been published*
800 *previously, or is currently under consideration for publication elsewhere. This includes symposia*
801 *proceedings, transactions, books, articles published by invitation, and preliminary publications of*
802 *any kind except an abstract of less than 250 words. If there is any question concerning potential*
803 *overlap, the related material must be included for evaluation.*

804 *2. Ethical guidelines were followed by the investigator in performing studies on humans or*
805 *animals and should be described in the paper. The approval of the institutional review board of either*
806 *animal or human ethics committee must be cited in the Methods.*

807 *3. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for*
808 *the content of the paper and must approve of the final version of the manuscript. Authorship should*
809 *be based on substantive contributions to each of the following: conception and design of the study;*
810 *generation, collection, assembly, analysis and/or interpretation of data; and drafting or revision of*
811 *the manuscript; approval of the final version of the manuscript. Authors are required to include a*
812 *statement in the Acknowledgements to specify the actual contribution of each coauthor under the*
813 *above headings.*

814 *4. If requested, the authors will provide the data or will cooperate fully in obtaining and*
815 *providing the data on which the manuscript is based for examination by the editors or their assignees*
816 *Changes to Authorship This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names*
817 *in the authorship of accepted manuscripts:*

818 *Changes to author names after acceptance are strongly discouraged and can be accepted only*
819 *in compelling circumstances.*

820 *Before the accepted manuscript is published in an online issue Requests to add or remove an*
821 *author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the*
822 *corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should*
823 *be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax,*
824 *letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of*
825 *addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.*
826 *Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to*
827 *the corresponding author, who.*

828 *Must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the*
829 *Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online*
830 *issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in*
831 *an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an*
832 *online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum. Reporting*
833 *clinical trials Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT*
834 *guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied*
835 *by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment,*
836 *enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the*
837 *randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram are available online.*
838 *Registration of Clinical Trials Registration in a public trials registry is a condition for publication of*
839 *clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors*
840 *recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrollment. The clinical trial*
841 *registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is*
842 *defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to*
843 *one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related*
844 *interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for*
845 *example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and*
846 *process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures*
847 *obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely*
848 *observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the*
849 *discretion of the investigator) will not require registration. Copyright Upon acceptance of an article,*
850 *authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this).*
851 *An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with*
852 *a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.*

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

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

862 *Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse*
863 *your work. More information. Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your*
864 *research published in Elsevier journals. Role of the funding source You are requested to identify who*
865 *provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to*
866 *briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and*
867 *interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for*
868 *publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding*
869 *body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies*
870 *which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will*
871 *reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are*
872 *available online.*

873 *After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For*
874 *authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for*
875 *publication. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research:*

876 *Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and*
877 *patient groups through our universal access programs. • No open access publication fee payable by*
878 *authors. • The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and*
879 *make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal*
880 *article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the*
881 *sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal*
882 *can be found below. Gold open access • Articles are freely available to both subscribers and the*
883 *wider public with permitted reuse. • A gold open access publication fee is payable by authors or on*
884 *their behalf, e.g. by their research funder or institution.*

885 *Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer*
886 *review criteria and acceptance standards.*

887 For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative
888 Commons user licenses: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)
889 For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a
890 collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not
891 alter or modify the article. The gold open access publication fee for this journal is USD 2500,
892 excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:
893 <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Authors wishing to publish open access will be
894 presented with the option to publish in *Nutrition*, or in the journal's open access mirror journal,
895 *Nutrition: X* <https://www.elsevier.com/journals/nutritionx/2665-9026/open-access-journal>. One,
896 unified editorial team manages the peer-review for both titles using the same submission system. The
897 difference between the journals is the access model under which the journals will publish your work
898 and the indexation status. *Nutrition: X* will be indexed in Scopus if the parent is also indexed there;
899 if the parent is indexed in MEDLINE, then *Nutrition: X* will also be eligible for fast inclusion in
900 PubMed Central. However, please note that *Nutrition: X* will not have a CiteScore or Impact Factor
901 initially. Applications for inclusion in Science Citation Index / Social Sciences Citation Index and any
902 other relevant citation indexing databases will be made as soon as possible.

903 The choice of publishing model will be blinded to referees, ensuring the editorial process is
904 identical. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and
905 Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open
906 access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and
907 enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version
908 that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes
909 suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period:
910 For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to
911 subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo
912 period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable
913 form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months.

914 Elsevier Researcher Academy Researcher Academy is a free e-learning platform designed to
915 support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn"
916 environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable
917 guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through
918 peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the
919 publication process with ease. Language (usage and editing services) Please write your text in good
920 English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their
921 English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling

922 *errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing*
923 *service available from Elsevier's WebShop. Submission Our online submission system guides you*
924 *stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system*
925 *converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g.,*
926 *Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including*
927 *notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Submit your article*
928 *All new manuscripts must be submitted through Nutrition's online submission and review Web site*
929 *<https://ees.elsevier.com/nut/default.asp> Referees Please submit the names and institutional e-mail*
930 *addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor*
931 *retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. PREPARATION*
932 *NEW SUBMISSIONS Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided*
933 *stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your*
934 *files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your*
935 *Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing*
936 *process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by*
937 *referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If*
938 *you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission.*
939 *Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. Authors*
940 *please note: We please ask you to use line numbering throughout the manuscript text, to facilitate*
941 *clear and rapid peer review References There are no strict requirements on reference formatting at*
942 *submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where*
943 *applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication,*
944 *volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is*
945 *highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by*
946 *Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to*
947 *correct. Formatting requirements There are no strict formatting requirements but all manuscripts*
948 *must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract,*
949 *Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with*
950 *Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be*
951 *included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined*
952 *sections. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the*
953 *single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top*
954 *of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.*

955 *Peer review This journal operates a double blind review process. All contributions will be*
956 *initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then*

957 typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the
958 paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles.
959 The Editor's decision is final. More information on types of peer review. Double-blind review This
960 journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the
961 reviewers, and vice versa. More information is available on our website. To facilitate this, please
962 include the following separately: Title page (with author details): This should include the title,
963 authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a
964 complete address for the corresponding author including an e-mail address. Blinded manuscript (no
965 author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any
966 acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or
967 affiliations. REVISED SUBMISSIONS Use of word processing software Regardless of the file format
968 of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article.
969 Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced
970 on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of
971 conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on
972 Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and
973 'grammar-check' functions of your word processor. Article structure Subdivision - unnumbered
974 sections Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading.
975 Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible
976 when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.
977 Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a
978 detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Provide sufficient details
979 to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published
980 should be summarized and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published
981 method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should
982 also be described. Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to
983 the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast,
984 a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. Results Results
985 should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the
986 work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid
987 extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the
988 study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection
989 of a Discussion or Results and Discussion section. Appendices If there is more than one appendix,
990 they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate

991 numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for
992 tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

993 This should include 1) title of paper (use no abbreviations, limit: 120 characters with spaces),
994 2) running head of fewer than 55 characters with spaces, 3) full names of all authors with highest
995 academic degree(s); 4) affiliations of all authors; 4) role of each author in the work (see Authorship);
996 5) a word count for the entire manuscript (including figures and tables), and the number of figures
997 and tables, 4) the complete mailing address (including telephone, fax, and e-mail address of the
998 corresponding author for e-mailing of proofs and reprint requests). Highlights Highlights are
999 mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core
1000 findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission
1001 system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85
1002 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information
1003 site. Abstracts should be no more than 250 words. The structured abstract for an original
1004 investigation should be organized as follows:

1005 *Objective:* The abstract should begin with a clear statement of the precise objective or question
1006 addressed in the paper. If a hypothesis was tested, it should be stated.

1007 *Research Methods & Procedures:* The basic design of the study and its duration should be
1008 described. The methods used should be stated, the statistical data/methods provided and referenced.

1009 *Results:* The main results of the study should be given in narrative form. Measurements or other
1010 information that may require explanation should be defined. Levels of statistical significance should
1011 be indicated, including other factors crucial to the outcome of the study.

1012 *Conclusion(s):* State only conclusions that are directly supported by the evidence and the
1013 implications of the findings. Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is
1014 encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize
1015 the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide
1016 readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission
1017 system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels ($h \times w$) or
1018 proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen
1019 resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example
1020 Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services
1021 to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.
1022 *Keywords* 5—7 key words or phrases should be provided which should be selected from the body of
1023 the text and not duplicate title words. *Abbreviations* Define abbreviations that are not standard in
1024 this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are
1025 unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote.

1026 *Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Acknowledgments Collate*
1027 *acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not,*
1028 *therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those*
1029 *individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance*
1030 *or proof reading the article, etc.). Formatting of funding sources List funding sources in this standard*
1031 *way to facilitate compliance to funder's requirements:*

1032 *Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx,*
1033 *yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States*
1034 *Institutes of Peace [grant number aaaa].*

1035 *It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards.*
1036 *When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other*
1037 *research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.*

1038 *If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:*

1039 *This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public,*
1040 *commercial, or not-for-profit sectors. Units Follow internationally accepted rules and conventions:*
1041 *use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in*
1042 *SI. Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple*
1043 *formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line*
1044 *for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of*
1045 *e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be*
1046 *displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Footnotes Footnotes should be*
1047 *used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build*
1048 *footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position*
1049 *of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.*

1050 *Artwork Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your*
1051 *original artwork. • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol,*
1052 *Courier. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming*
1053 *convention for your artwork files. • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.*
1054 *• For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a*
1055 *single file at the revision stage. • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be*
1056 *provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged*
1057 *to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. Formats Regardless of*
1058 *the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images*
1059 *to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and*
1060 *line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save*

1061 *the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a*
1062 *minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or*
1063 *JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.*
1064 *Please do not:* • *Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the*
1065 *resolution is too low.* • *Supply files that are too low in resolution.* • *Submit graphics that are*
1066 *disproportionately large for the content. Color artwork Please make sure that artwork files are in an*
1067 *acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct*
1068 *resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will*
1069 *ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect*
1070 *and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed*
1071 *version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from*
1072 *Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or*
1073 *online only. Further information on the preparation of electronic artwork.*

1074 *Illustration services Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to*
1075 *submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article.*
1076 *Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a*
1077 *full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take*
1078 *your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.*
1079 *Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title*
1080 *(not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves*
1081 *to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Tables Please submit tables as editable*
1082 *text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on*
1083 *separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the*
1084 *text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that*
1085 *the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid*
1086 *using vertical rules and shading in table cells. References Citation in text Please ensure that every*
1087 *reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited*
1088 *in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not*
1089 *recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included*
1090 *in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include*
1091 *a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'.*
1092 *Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. Reference*
1093 *links Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links*
1094 *to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as*
1095 *Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please*

1096 *note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link*
1097 *creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the*
1098 *DOI is highly encouraged.*

1099 *A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic*
1100 *article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo*
1101 *R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab*
1102 *beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research,*
1103 *<https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same*
1104 *style as all other references in the paper. Web references as a minimum, the full URL should be given*
1105 *and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author*
1106 *names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be*
1107 *listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired or can be included*
1108 *in the reference list. Data references This journal encourages you to cite underlying or relevant*
1109 *datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your*
1110 *Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title,*
1111 *data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset]*
1112 *immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset]*
1113 *identifier will not appear in your published article. References in a special issue Please ensure that*
1114 *the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other*
1115 *articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have their*
1116 *reference template available in many of the most popular reference management software products.*
1117 *These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using*
1118 *citation plug-ins from these products, authors only need to select.*

1119 *the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and*
1120 *bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available*
1121 *for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this*
1122 *Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes*
1123 *before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from*
1124 *different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference*
1125 *style for this journal by clicking the following link: [http://open.mendeley.com/use-citation-](http://open.mendeley.com/use-citation-style/nutrition)*
1126 *style/nutrition When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the*
1127 *Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. Reference formatting There are no strict*
1128 *requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long*
1129 *as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter*
1130 *title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or*

1131 *pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal*
1132 *will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be*
1133 *highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself*
1134 *they should be arranged according to the following examples: Reference style Text: Indicate*
1135 *references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred*
1136 *to, but the reference number(s) must always be given. List: Number the references (numbers in square*
1137 *brackets) in the list in the order in which they appear in the text. Examples: Reference to a journal*
1138 *publication: [1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J*
1139 *Sci Commun 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>. Reference to a journal*
1140 *publication with an article number: [2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing*
1141 *a scientific article. Heliyon. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>*
1142 *Reference to a book: [3] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman;*
1143 *2000. Reference to a chapter in an edited book: [4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an*
1144 *electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age,*
1145 *New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Reference to a website: [5] Cancer Research UK.*
1146 *Cancer statistics reports for the UK, [http://www.cancerresearchuk.org/](http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/)*
1147 *aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/; 2003 [accessed 13 March 2003]. Reference to a dataset:*
1148 *[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt*
1149 *disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. [https://doi.org/10.17632/](https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1)*
1150 *xwj98nb39r.1. Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors*
1151 *the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform*
1152 *Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–*
1153 *34) (see also Samples of Formatted References). Journal abbreviations source Journal names should*
1154 *be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations. Video Elsevier accepts video*
1155 *material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have*
1156 *video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include*
1157 *links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by*
1158 *referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All*
1159 *submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In*
1160 *order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one*
1161 *of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total.*
1162 *Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article*
1163 *in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can*
1164 *choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead*
1165 *of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions*

1166 *please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the*
1167 *print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the*
1168 *portions of the article that refer to this content. Data visualization Include interactive data*
1169 *visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your*
1170 *research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how*
1171 *to include them with your article. Supplementary material Supplementary material such as*
1172 *applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted*
1173 *supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will*
1174 *appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise,*
1175 *descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary*
1176 *material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate*
1177 *any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft*
1178 *Office files as these will appear in the published version. Research data This journal encourages and*
1179 *enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables*
1180 *you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of*
1181 *observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and*
1182 *data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms,*
1183 *protocols, methods and other useful materials related to the project.*

1184 *Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a*
1185 *statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing*
1186 *data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list.*
1187 *Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more*
1188 *information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials,*
1189 *visit the research data page. Data linking If you have made your research data available in a data*
1190 *repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of*
1191 *repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to*
1192 *underlying data that gives them a better understanding of the research described.*

1193 *There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly*
1194 *link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For*
1195 *more information, visit the database linking page.*

1196 *For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your*
1197 *published article on ScienceDirect.*

1198 *In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your*
1199 *manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: ATIG01020; CCDC: 734053;*
1200 *PDB: 1XFN). Mendeley Data This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any*

1201 *research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and*
1202 *methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the*
1203 *submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your*
1204 *relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to*
1205 *readers next to your published article online.*

1206 *For more information, visit the Mendeley Data for journals page.*

1207 *Data in Brief You have the option of converting any or all parts of your supplementary or*
1208 *additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes*
1209 *your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given*
1210 *a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for*
1211 *Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your*
1212 *research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief*
1213 *where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief.*
1214 *Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details*
1215 *can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief. Data*
1216 *statement To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your*
1217 *submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable*
1218 *to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission*
1219 *process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with*
1220 *your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.*

1221 *AFTER ACCEPTANCE Online proof correction Corresponding authors will receive an e-mail with*
1222 *a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The*
1223 *environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables*
1224 *and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-*
1225 *prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction*
1226 *of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All*
1227 *instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods*
1228 *to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly*
1229 *and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and*
1230 *correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for*
1231 *publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to*
1232 *ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before*
1233 *replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely*
1234 *your responsibility. Offprints The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share*
1235 *Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The*

1236 *Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and*
1237 *social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which*
1238 *is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order*
1239 *offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article*
1240 *gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available*
1241 *open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link. AUTHOR INQUIRIES*
1242 *Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from*
1243 *Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted*
1244 *article or find out when your accepted article will be published.*

1245 © Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>.

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259