

Efeito do consumo de quitosana nos parâmetros lipídicos, glicêmicos e microbiota intestinal em ratos Wistar

Effect of chitosan consumption in lipidic parameters, glycemics and intestinal microflora in rats Wistar

Camila Giroto¹

Francielle Garghetti Battiston²

Luiza Vivan¹

Mateus Fracasso¹

Resumo

A obesidade tornou-se frequente em países em desenvolvimento, acarretando em problemas cardiovasculares e outras doenças metabólicas. Entre as formas de combater a obesidade está a alimentação saudável, principalmente com a inserção de fibras. O objetivo da pesquisa foi verificar se ocorreria redução na massa corpórea de ratos suplementados com quitosana, diminuição dos parâmetros lipídicos e glicêmicos e verificar seu efeito em relação à microbiota intestinal. Foram utilizados 16 ratos machos e 16 fêmeas da linhagem Wistar, os quais foram divididos em quatro grupos (n=4 machos e n=4 fêmeas), C, CQ, H e HQ. O tratamento teve duração de 71 dias. Houve redução na massa corporal dos grupos tratados com quitosana, porém, não significantes estatisticamente; no entanto, a ingestão alimentar nos grupos tratados com quitosana foi maior comparada a seus controles, os níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicemia foram diminuídos em ratos suplementados com quitosana. A análise da microbiota intestinal demonstrou que a concentração de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, embora não tenha sido significativa estatisticamente, apresentou um aumento da concentração destas bactérias em ratos suplementados com a fibra. De acordo com os resultados obtidos no estudo, a quitosana age no controle da massa corpórea, especialmente pela ação no metabolismo dos lipídios, atuando também como um prebiótico, auxiliando no aumento da concentração de probióticos, regulando as funções da microbiota intestinal.

Palavras-chave

Quitosana; Obesidade; Microbiota intestinal; Parâmetros lipídicos

INTRODUÇÃO

A obesidade tornou-se frequente na população de países em desenvolvimento, independente da classe social, levando a ocorrência de *diabetes mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares. Entre as formas de combater a obesidade, a alimentação saudável com inserção de fibras favorece a perda e manutenção da massa corpórea. As fibras são de extrema importância, pois podem atuar no controle da absorção dos carboidratos e da glicemia bem como na diminuição de triglicerídeos e colesterol. Pode também estar relacionada com o aumento da massa bacteriana devido à fermentação das fibras alimentares.⁽¹⁾

A prevalência de doenças crônico-degenerativas e cardiovasculares tem aumentado nos últimos anos, e um dos principais fatores que desencadeiam estes problemas é devido ao excesso de gordura corporal, causado pelo aumento de açúcares simples e gorduras saturadas e gor-

duras trans. A diminuição do consumo de fontes vegetais ricas em fibras também é um dos fatores.⁽²⁾

Para a prevenção e o tratamento das doenças crônico-degenerativas é necessária a inclusão de atividade física e mudanças na dieta. A quitosana é a forma desacetilada da quitina, que é encontrada como constituinte do exoesqueleto de artrópodes tais como caranguejo, camarão, lagosta e outros insetos.⁽³⁾ Considerada como um alimento funcional pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ela auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol no corpo humano, sendo a gordura posteriormente eliminada pelas fezes. Promove ainda o aumento do bolo fecal e a frequência da defecação auxiliando como uma medida preventiva contra câncer de cólon.⁽⁴⁾

Diante do exposto, objetivou-se investigar os efeitos da quitosana e a sua importância em relação à diminuição de massa corpórea e dos níveis de colesterol, glicemia, e triglicerídeos. Verificar também possíveis alterações na

¹Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – Campus de Xanxerê, SC, Brasil.

²Mestre em Ciências Fisiológicas – UFSC; Professora da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – Campus de Xanxerê, SC, Brasil.

Instituição: Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – Campus de Xanxerê, SC, Brasil.

Artigo recebido em 12/12/2016

Artigo aprovado em 30/01/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700553

microbiota intestinal de ratos wistar que realizam a suplementação com quitosana, para o equilíbrio do organismo e funcionamento intestinal adequado.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo de Análise

Foram utilizados 32 ratos (16 machos e 16 fêmeas) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Univali, SC. Os animais recebidos tinham 45 dias e foram mantidos em gaiolas com quatro animais cada, em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro (12/12 h), com livre acesso à comida e água. Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unoesc, sob protocolo número 023/2015.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos, contendo oito animais cada, mantidos em aclimatação com dieta comercial por duas semanas; posteriormente receberam a administração das dietas definidas de acordo com os grupos, sendo eles: grupo controle (C) – receberam ração comercial (Nuvilab®) e água durante todo o processo experimental; grupo Controle + Quitosana (CQ) – receberam ração comercial (Nuvilab®) com suplementação de quitosana a 5% (m/m) e água; grupo Hipercalórico (H) – receberam ração hipercalórica (feita a partir de alimentos hipercalóricos moídos e oferecidos em forma de péletes) e água e o grupo Hipercalórico + Quitosana (HQ) – ração hipercalórica com quitosana a 5% (m/m) e água.

Após o término do processo experimental, totalizando 71 dias, os ratos fizeram jejum de 12 horas e foram anestesiados com ketamina/xilazina® na quantidade de 90 mg/kg e 10 mg/kg de peso corporal respectivamente, decapitados para a coleta de sangue, para avaliação dos parâmetros metabólicos e dissecados para a retirada dos órgãos.

A ração utilizada para os grupos controle foi a ração comercial para ratos (Nuvilab® CR1). Nos grupos com suplementação de quitosana, foram adicionados 5% (m/m) de quitosana pura em pó à ração, conforme AIN-93G.⁽⁶⁾ Para a ração do grupo Controle + quitosana, a ração comercial foi triturada, sendo acrescentada a ração 5% (m/m) de quitosana, juntamente com gelatina incolor (1g) e água para aumentar a coesão entre as partículas. A dieta hipercalórica apresentava a composição: 15 g de ração comercial, 10 g de amendoim torrado, 10 g de chocolate ao leite, 5 g de biscoito maisena e água somente para juntar os ingredientes.

Os animais foram pesados com balança semianalítica digital uma vez por semana para verificar se estava ou não ocorrendo variação de massa corpórea. Também eram pesadas as rações depositadas e sobras, bem como era medida a água depositada e consumida.

A dosagem de glicemia foi realizada nos animais em jejum (12-14 horas) no início do experimento (dia 0), 30 e 69

(48 h antes da eutanásia), por meio do sistema de fitas (monitor digital) glicosímetro G-TECH sistema NO CODE, a partir de gota de sangue obtida através de um corte na extremidade da cauda do animal.

Os animais permaneceram 12 horas em jejum, quando foi realizada a coleta de sangue (tempo 0') e dosada sua glicemia. Em seguida foi administrada, por via intraperitoneal, uma solução de glicose a 50% (m/v) na dose de 1,5 g de glicose/kg de massa corporal. A coleta de sangue e as respectivas análises repetiram-se nos minutos trinta, sessenta e cento e vinte. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas com o sistema de fitas (monitor digital) glicosímetro G-TECH sistema NO CODE.

A análise do perfil lipídico foi realizada no último dia de experimento, sendo coletado o sangue dos animais após a eutanásia, por decapitação do animal. Os parâmetros analisados foram: colesterol total, HDL, LDL e triglicérides, a partir de kits comerciais (Labtest).

Após a eutanásia, os intestinos dos animais foram retirados e realizada a coleta de 1 g de fezes contidas no intestino grosso de cada animal. Para o preparo dos meios, pesaram-se 70 g de Agar MRS *Lactobacillus* (Acumedia) e para preparar 1 litro do meio o agar foi dissolvido em água destilada. Também, utilizou-se o meio BMS *Bifidobacterium* (Sigma), pesando-se 55,5 g de agar para 1 litro de meio, com adição de 2,0 g de extrato de levedura por litro, sendo ambos os meios autoclavados a 121°C por 15 minutos. A adição do extrato de levedura como uma forma de suplemento para o crescimento de bifidobactérias foi proposta a partir de estudo realizado.⁽⁶⁾

As fezes previamente pesadas de cada animal foram dissolvidas em 9 mL de solução salina a 0,85% e a partir desta dissolução (10^{-1}) foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-8} , por meio da transferência de 1000 μL da diluição anterior para o tubo seguinte. Foram utilizados 100 μL de cada diluição e semeados por método *pour plate* em placas de petri estéreis vazias, adicionando-se posteriormente aproximadamente 20 mL do meio (específico para cada bactéria) sobre a diluição e homogeneizado com movimentos circulares. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas (Lactobacilos) e 72 horas (Bifidobactérias) em estufa com sistema de geração comercial de atmosfera anaeróbica (Anaerobac, Probac ®). Transcorrido o tempo de incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de cada meio.

Após a eutanásia, os órgãos pesados foram: fígado, rins, baço, intestino, cérebro e as gorduras (omental, perigonadal/epididimal e retroperitoneal/perirrenal).

Avaliação Estatística

A avaliação estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 5.01. O teste ANOVA de 1 via (*one-way ANOVA*) com pós-teste Tukey foi utilizado para a com-

paração de dados entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Durante o período experimental, foi acompanhada a massa corporal semanal dos grupos até o final do experimento. Como mostra o Gráfico 01.

Durante todo o período experimental foi realizado o acompanhamento do consumo alimentar e da ingestão hídrica dos animais, a partir das sobras dos mesmos (Gráfico 2).

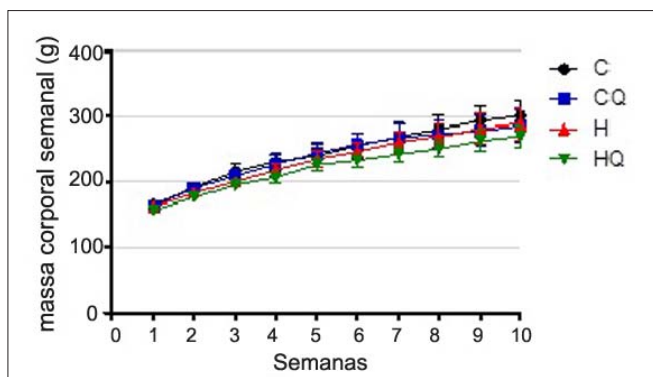


Gráfico 1. Acompanhamento da massa corporal durante o período experimental. Não houve diferença significativa. ($p < 0,05$, $n = 32$).
Fonte: Os autores, 2016.

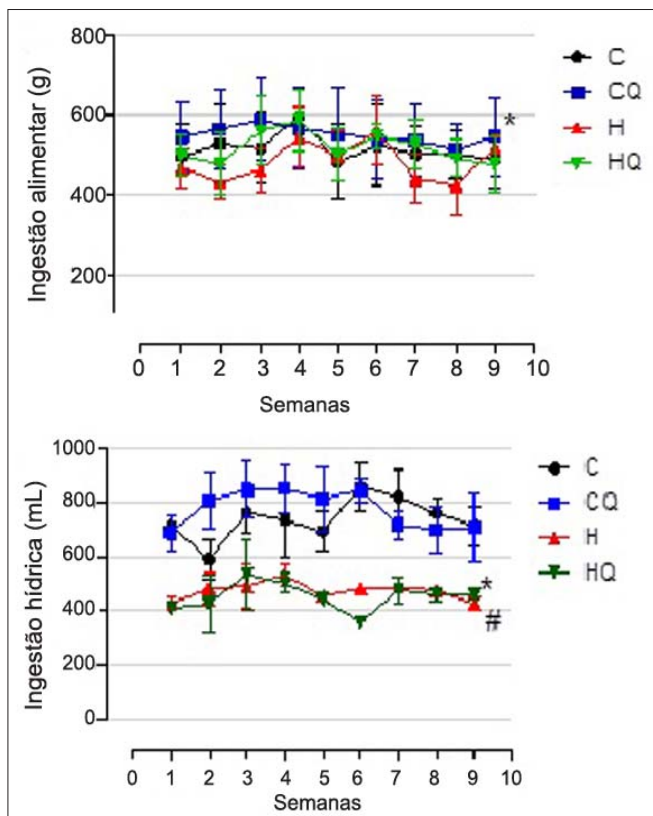


Gráfico 2. Ingestão alimentar semanal e ingestão hídrica. (*) diferença significativa por efeito da quitosana e (#) diferença significativa por efeito da dieta hipercalórica ($p < 0,05$, $n = 32$).
Fonte: Os autores, 2016.

Os resultados das análises dos parâmetros lipídicos e glicêmicos encontram-se na Tabela 01.

A partir das fezes contidas no intestino grosso dos animais, realizaram-se as análises microbiológicas para avaliar a concentração de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Ambos os resultados encontram-se representados no Gráfico 3.

Tabela 1 - Análises lipídicas e glicêmicas. (*) diferença significativa por efeito da quitosana. ($p < 0,05$, $n = 32$)

(mg/dL)	C	CQ	H	HQ
Glicemia- dia 0	92,62	89,25	86,25	90,88
Glicemia- dia 30	88,25	82,5	85	82,62
Glicemia- dia 69	95,5	86	95,87	88
Colesterol total	138,64	97,43 (*)	115,95	111,08
HDL-Colesterol	44,39	38,47	40,11	34,12
LDL-Colesterol	76,14	41,48 (*)	55,02	60,74
Triglicerídeos	127,99	87,38 (*)	144,30	104,99 (*)

Fonte: Os autores, 2016

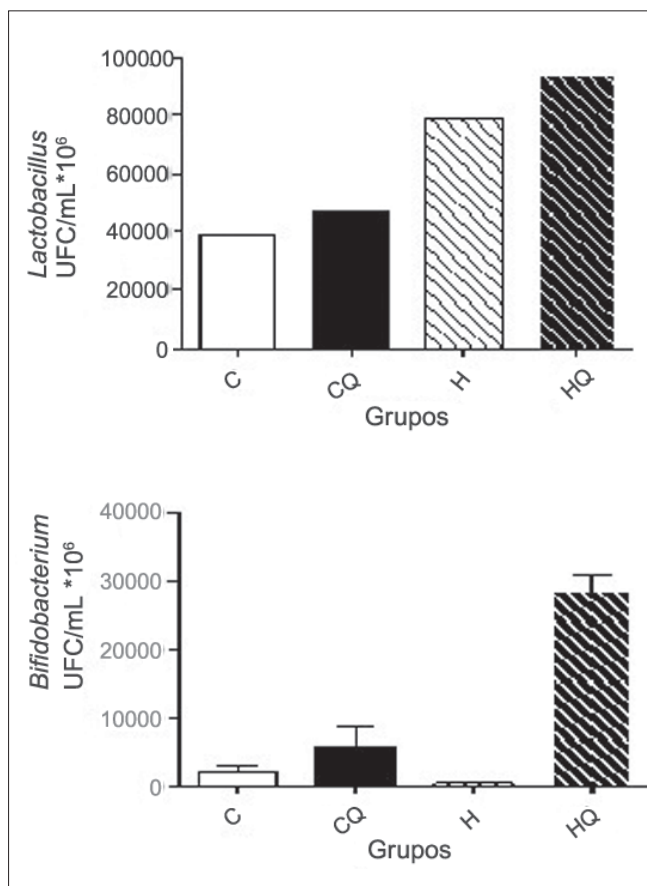


Gráfico 3. Concentração de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Não houve diferença significativa. ($p < 0,05$, $n = 32$).

Em relação à massa dos órgãos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Somente em relação às gorduras perigonadal/epididimal e retroperitoneal/perirrenal.

DISCUSSÃO

O presente estudo visou estudar a ocorrência de possíveis alterações metabólicas provenientes da alimentação, buscando analisar a relação de possíveis benefícios da suplementação com quitosana em animais com dieta normocalórica e principalmente avaliar os efeitos em dietas hipercalóricas, analisando a resposta da suplementação perante a dieta.

Diversos estudos tem apontado o efeito da quitosana em reduzir as concentrações de colesterol total, triglicérides, LDL e aumento do HDL. Neste estudo foi possível verificar que os valores de colesterol total e triglicérides foram significativamente diminuídos nos grupos com suplementação de quitosana (CQ e HQ), e o HDL foi aumentado no grupo CQ; no entanto, a suplementação com quitosana não foi capaz de aumentar a concentração de HDL no grupo HQ. Da mesma forma, o LDL foi diminuído no grupo CQ, mas não obteve o mesmo efeito no grupo HQ, diferente do que foi abordado em estudo⁽⁷⁾ que analisou os efeitos da suplementação de quitosana em ratos diabéticos, sendo observada uma redução dos níveis de colesterol total, triglicérides, LDL e aumento de HDL. Por sua vez, Anandan R. et al.⁽⁸⁾ avaliaram a resposta de ratos wistar jovens (2-3 meses de idade) e ratos idosos (20-25 meses de idade) quanto à suplementação de 2% (m/m) de quitosana e perceberam que ambos obtiveram boa resposta em relação à diminuição dos níveis de colesterol total, LDL e aumento do HDL. Segundo estudo de Anraku M et al.,⁽⁹⁾ a suplementação de quitosana também foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total, triglicérides, LDL e aumentar os níveis de HDL em ratos hipertensos, utilizados como modelo de síndrome metabólica, após quatro semanas.

Para a diminuição dos parâmetros lipídicos, a quitosana pode atuar como uma resina de troca iônica, ligando-se a ânions hidrofóbicos, como os ácidos biliares no intestino, formando micelas, fazendo com que haja diminuição na sua reabsorção, sendo excretadas nas fezes, o que resulta em uma diminuição na absorção do colesterol e triglicérides.^(10,11) Confirmando tal teoria, em estudos realizados, verificou-se que ratos Wistar que receberam suplementação de quitosana apresentaram uma absorção de colesterol diminuída em relação ao grupo controle, sendo que a excreção de gorduras a partir das fezes foi significativamente maior.^(10,12,13)

Em relação à massa corporal dos animais, os mesmos apresentaram médias similares no início do experimento. No entanto, no decorrer do experimento, apresentaram diferenças em relação ao ganho de massa. Os grupos com suplementação de quitosana (CQ e HQ), embora não tenham obtido diferenças significativas, apresentaram um menor ganho de massa corporal em relação aos seus controles. Em sua pesquisa, Geremias R⁽¹¹⁾ verificou que os ra-

tos suplementados com 5% (m/m) de quitosana apresentaram redução em sua massa corporal quando comparados com o controle e hiperlipídico. Diferente de Cherem & Bramorski⁽¹⁴⁾ que, em sua pesquisa, não observaram diferenças na redução da massa corporal de ratos suplementados com quitosana e os grupos controle. Entretanto, Trautwein E, et al.⁽¹⁵⁾ verificaram que hamsters que consumiram dietas com 8% (m/m) de quitosana tiveram sua massa corporal diminuída significativamente; no entanto, ao utilizar suplementação de 4% (m/m) de quitosana, a diminuição da massa corporal não foi tão efetiva.

Os ratos que receberam suplementação com quitosana (CQ e HQ) aumentaram o seu consumo alimentar ao serem comparados com seus controles. O mesmo pode ser observado em estudo realizado por Cherem & Bramorski⁽¹⁴⁾ ao adicionar à dieta hipercalórica de ratos Wistar 5% (m/m) de quitosana de duas diferentes marcas comerciais; os grupos com suplementação da fibra ingeriram uma maior quantidade de ração quando comparado a seus controles. Também, em seus estudos, Gallaher CM e Azuma K, et al.^(10,16) observaram maior ingestão alimentar nos grupos com suplementação de quitosana. Alguns estudos realizados observaram diminuição de leptina em animais que receberam suplementação com quitosana, indicando, desta forma, que houve diminuição na acumulação de lipídios, o que levou a um aumento na ingestão alimentar.^(7,17-19)

Em relação à ingestão hídrica, os grupos C e CQ apresentaram maior ingestão, diferente dos grupos H e HQ, o que demonstra que a quitosana não atuou no aumento da ingestão hídrica, sendo característico de cada tipo de dieta. Da mesma forma, Geremias R e Azuma K, et al. relataram em seus estudos que a ingestão hídrica não se mostrou alterada durante o período experimental com quitosana e suas associações.^(11,16)

Quanto à avaliação da concentração de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* verificou-se um aumento destas bactérias nos grupos que receberam a suplementação com quitosana, sendo que a quitosana, por ser uma fibra, apresenta as características de um prebiótico, não sendo hidrolisada nem absorvida na parte superior do trato gastrointestinal, sendo posteriormente fermentada por Lactobacilos e Bifidobactérias.⁽²⁰⁾ No entanto, percebe-se que o grupo HQ apresentou um aumento em relação à concentração destas bactérias, o que indica o potencial prebiótico da quitosana que, ao ser administrada com a dieta hipercalórica, que contém chocolate em sua composição, apresentou um maior efeito na microbiota intestinal; de acordo com diversos estudos realizados, o chocolate atua como um prebiótico devido aos flavonoides que possui (derivados do cacau), levando a um aumento na concentração de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.⁽²¹⁻²³⁾ Em relação à glicemia e ao teste de tolerância à glicose, os grupos com suplementação de quitosana apresentaram uma tendên-

cia à diminuição destes parâmetros ao serem comparados com seus controles. Assim como encontrado em estudo de Chang HP et al.,⁽⁷⁾ que analisaram o efeito da suplementação de quitosana em ratos diabéticos, embora não tenham obtido resultados significantes estatisticamente, houve uma tendência à diminuição de glicose e resistência à glicose após sete semanas de tratamento.

Ao se analisar a massa dos órgãos não foram encontradas diferenças significativas. No entanto, ao se analisar as gorduras omental, perigonadal (epididimal) e retroperitoneal (perirrenal), verificou-se uma diminuição da massa nos grupos que receberam suplementação de quitosana. Em seus estudos, Zhang J, et al. e Zhang H, et al.^(12,24) observaram que ratos que receberam suplementação de 5% (m/m) de quitosana apresentaram uma menor massa epididimal e perirrenal em relação aos grupos controle, demonstrando a ação da quitosana em reduzir a capacidade de armazenamento de gorduras.

CONCLUSÃO

A ação da quitosana em relação aos parâmetros glicêmicos foi positiva, a glicemia em jejum e o teste de tolerância à glicose demonstraram que a quitosana apresentou uma tendência à diminuição da glicemia.

O efeito da quitosana em relação aos parâmetros lipídicos apresentou-se eficaz, ao diminuir significativamente as concentrações de colesterol total e triglicérides.

Houve uma manutenção da massa corpórea dos animais que receberam a suplementação com quitosana, não apresentando, entretanto, redução significativa da massa corpórea. Faz-se necessária a realização de estudos com a administração de quitosana com dietas com restrição calórica e com adição de atividades físicas, para verificar seu efeito. A quitosana também nesta dose e neste período experimental não induziu ao aumento da saciedade, levando a um aumento da ingestão alimentar dos animais que receberam a suplementação.

Em relação à microbiota intestinal, a quitosana apresentou um efeito benéfico como prebiótico, aumentando as concentrações de bactérias probióticas. O grupo hiper-calórico com quitosana apresentou uma maior concentração destas bactérias, demonstrando a ação do cacau proveniente do chocolate presente na dieta hiper-calórica, o qual, ao ser administrado com a quitosana, aumentou seu potencial prebiótico.

Abstract

Obesity has become frequent in developing countries, resulting in cardiovascular problems and other metabolic diseases. Among the ways to combat obesity is a healthy diet including mainly fibers. The objective was to verify if there would be a reduction in the body mass of rats supplemented with chitosan, decreasing the lipid and glycemic parameters and check their effect on the intestinal microflora. 16 female

and 16 male mice from the Wistar lineage were used, which were divided into four groups (n = 4 males and n = 4 females), C, CQ, H, HQ. The treatment lasted 71 days. There was a reduction in body mass of groups treated with chitosan, but not statistically significant, however, food intake in the groups treated with chitosan was higher compared to their controls, the total cholesterol levels, triglycerides and glucose levels were reduced in mice supplemented with chitosan. The analysis of intestinal microbiota showed that the concentration of Lactobacillus and Bifidobacterium although not statistically significant, showed an increase in the concentration of these bacteria in mice supplemented with fiber. According to the results obtained in the study, chitosan acts in the control of body mass, especially by the action in metabolism of lipids, also acts as a prebiotic, aiding in increasing the concentration of probiotics, regulating the functions of the intestinal microbiota.

Keywords

Chitosan; Obesity; Intestinal microbiota; Lipid parameters

REFERÊNCIAS

1. Barbosa LS, Pazdziora AZ, Kojima ASG, Martins MSF, Ferreira CL P, Macêdo GS, et al. Efeitos da quitosana sobre alguns parâmetros nutricionais e bioquímicos em ratos. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 1-13, dez. 2007.
2. Oliveira C, Fisberg M. Obesidade na Infância e Adolescência- Uma verdadeira Epidemia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003 Apr ;47(2): 107-8.
3. Kurtz MC, Cruz AH, Retamoso V, Drehmer PB, Silveira V, Kirsten VR. Quitosana na redução de colesterol e perda de peso: Uma revisão da Literatura. Santa Maria, RS, 2010.
4. Anvisa. Alimentos funcionais. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_FXrxp9qY7FbU&p_p_col_id=column-2p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrxp9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrxp9qY7FbU_urlTitle=alimentos-funcionais&_101_INSTANCE_FXrxp9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrxp9qY7FbU_assetEntryId=2866855&_101_INSTANCE_FXrxp9qY7FbU_type=content>. Acesso em: Nov. 2016.
5. Reeves PG; Nielsen FH; Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Jour Nutr.* 1993;123(11): 1939-51.
6. Balciunas E. Produção de bacteriocina por *Bifidobacterium lactis* a partir de soro de leite. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade de São Paulo, 2013.
7. Chang HP, Yao HT, Chiang MT. Effects of high and low molecular weight chitosan on plasma cholesterol, glucose and adipocytokines in diabetic rats induced by Streptozotocin and Nicotinamide. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 20, No. 3, 2012, Pages 661-667.
8. Anandan R, et al. Antiaging effect of dietary chitosan supplementation on glutathione-dependent antioxidant system in young and aged rats. *Cell Stress and Chaperones*, 2013.
9. Anraku M, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, Tsuchiya D, Nishio H, et al. The antioxidative and antilipidemic effects of different molecular weight chitosans in metabolic syndrome model rats. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(12):1994-8.
10. Gallaher CM, Munion J, Hesslink R Jr, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr.* 2000 Nov;130(11):2753-9.
11. Geremias R. Avaliação do potencial Hipolipemiante da Quitosana e associações em Ensaios pré-clínicos e clínicos Fase H. Dissertação de Mestrado apresentado a UFSC. Florianópolis, 2002.
12. Zhang J, Liu J, Li L, Xia W. Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutr Res.* 2008 Jun;28(6):383-90.

13. Xu G, Huang X, Qiu L, Wu J, Hu Y. Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16 Suppl 1:313-7.
14. Cherem AR, Bramorski A. Excreção de gordura fecal de ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar), submetidos a dietas hiperlipídicas e hipercolesterolêmicas suplementadas com quitosana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
15. Trautwein AE, Jürgensen U, Erbersdobler HF. Cholesterol-lowering and gallstone-preventing action of chitosans with different degrees of deacetylation in hamsters fed cholesterol-rich diets. *Nutrition Research*, June 1997 Volume 17, Issue 6, Pages 1053-1065.
16. Azuma K, Nagae T, Nagai T, Izawa H, Morimoto M, Murahata Y, et al. Effects of Surface-Deacetylated Chitin Nanofibers in an Experimental Model of Hypercholesterolemia. *Int J Mol Sci.* 2015 Jul 30; 16(8):17445-55.
17. Cho EJ, Rahman MA, Kim SW, Baek YM, Hwang HJ, Oh JY, et al. CChitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Microbiol Biotechnol.* 2008 Jan;18(1):80-7.
18. Liu SH, Cai FY, Chiang MT. Long-Term Feeding of Chitosan Ameliorates Glucose and Lipid Metabolism in a High-Fructose-Diet-Impaired Rat Model of Glucose Tolerance. *Mar Drugs.* 2015 Dec 10;13(12):7302-13.
19. Bahijri S, Alsheikh K, Ajabnoor G, Borai A. Effect of supplementation with chitosan on food intake, weight gain, and cardiometabolic risk indices in Wistar rats fed normal diet ad libitum. *Endocrine Abstracts*, 2016.
20. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun; 125(6):1401-12.
21. Hayek N. Chocolate, gut microbiota and human health. *Front Pharmacol.* 2013 Feb 7;4:11.
22. Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr.* 2011 Jan;93(1):62-72.
23. Andujar MC, Recio RM, Giner JLR, Rios JL. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Volume 2012, Article ID 906252, 23 pages
24. Zhang HL, Zhong XB, Tao Y, Wu SH, Su ZQ. Effects of chitosan and water-soluble chitosan micro- and nanoparticles in obese rats fed a high-fat diet. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4069-76.

Correspondência

Camila Giroto

*Rua Américo Brasiliense, 631, apartamento 603 – Vila Morangueira
87030-380 – Maringá-PR
Camila.giroto@yahoo.com.br*