



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

SAMARA CRISTINA DOSSENA

**EFEITOS DO GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) SOBRE A MORFOFISIOLOGIA E  
INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO COLO PROXIMAL DE RATOS WISTAR OBESOS**

Maringá - PR  
2022

SAMARA CRISTINA DOSSENA

**EFEITOS DO GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) SOBRE A MORFOFISIOLOGIA E INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO COLO PROXIMAL DE RATOS WISTAR OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Raquel Marçal Natali

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa

Maringá – PR  
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

D724e

Dossena, Samara Cristina

Efeitos do Goji Berry (*Lycium barbarum*) sobre a morfofisiologia e inervação intrínseca do colo proximal de ratos Wistar obesos / Samara Cristina Dossena. -- Maringá, PR, 2022. 65 f.: il. color., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Obesidade. 2. Controle da obesidade. 3. Trato gastrointestinal . 4. Sistema nervoso entérico. I. Natali, Maria Raquel Marçal, orient. II. Sousa, Fernando Carlos de, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572.4

Síntique Raquel Eleutério - CRB 9/1641

SAMARA CRISTINA DOSSENA

**EFEITOS DO GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) SOBRE A MORFOFISIOLOGIA E INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO COLO PROXIMAL DE RATOS WISTAR OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30/03/2022

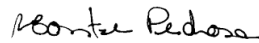
**BANCA EXAMINADORA**

---



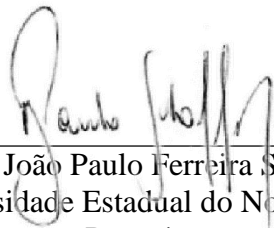
Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá

---



Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Montserrat Diaz  
Pedrosa  
Universidade Estadual de Maringá

---



Prof<sup>o</sup> Dr. João Paulo Ferreira Schoffen  
Universidade Estadual do Norte do  
Paraná

## BIOGRAFIA

**Samara Cristina Dossena**, nasceu em São João/PR em 07/06/1997. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Dois Vizinhos (2015-2018) onde apresentou vínculo como bolsista CAPES no Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência – PIBID (2015-2016), participou como Vice Diretora de Assuntos Acadêmicos do Centro Acadêmico Rosalind Franklin, do Curso de Ciências Biológicas (CABio) (2016-2017), foi monitora das disciplinas de Anatomia Humana (2016-2017) e Biologia de Microrganismos (2018) e desenvolveu estudos para o Programa de Iniciação Científica, avaliando os “efeitos do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético sobre o sistema nervoso entérico (SNE) de *Rhamdia quelen*” (2018). Em 2019, ingressou no curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), em nível de mestrado, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Paraná, onde deu sequência em seus estudos sobre o SNE, desta vez, avaliando os efeitos do Goji Berry (GB) (*Lycium barbarum*) sobre a morfofisiologia e inervação intrínseca do colo proximal de ratos Wistar obesos.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro momento, agradeço a Deus, pela dádiva da vida, sabedoria e força. Por manter minha mente saudável para que pudesse dar continuidade nessa pesquisa mesmo passando por uma pandemia e uma gravidez inesperada em meio ao experimento.

Agradeço a minha família de origem. Ao meu pai Olmar, que virou aquela estrela mais brilhante no céu a 14 anos, mas que, por ter a garra e o comprometimento com a família construiu junto com minha mãe uma condição de vida capaz de nos manter sempre protegidos e saudáveis. A minha mãe Dolores, que a muito tempo vem cumprindo papel de mãe e pai, por sempre me incentivar e dar o suporte que necessito em cada etapa da minha trajetória acadêmica. Aos meus irmãos Sandro, Sandra, Elizandra e Fernando por estarem ao meu lado nessa caminhada.

Agradeço ao meu companheiro Eder, por ter chegado em minha vida de forma tão repentina e tão intensa. Por ter segurado minha mão quando o mundo pareceu desabar sobre os meus pés, por estar caminhando comigo nessa mágica e desafiadora missão de criar um filho, por todo suporte, carinho, amor e dedicação que tem por nossa família e principalmente por ser a pessoa que mais acredita em mim e nos meus sonhos. Por me lembrar todos os dias de como a vida é bonita e pode ser trilhada de forma leve e harmônica.

Agradeço ao meu filho Miguel, por ter me escolhido para ser morada durante 9 meses e confiado em mim para proteger, cuidar, amar e guiar seus passos até alçar voo. Você é a coisa mais maravilhosa que já aconteceu na minha vida, através de você me tornei mãe e uma mulher muito mais forte e madura para encarar qualquer desafio.

Aos meus amigos Fábio e Isabela por estarem comigo desde a graduação e por permanecerem presentes mesmo estando distantes. Obrigada pelas palavras, pelo incentivo e por compreenderem a minha falta em muitos momentos. Saber que posso contar com vocês me dá segurança.

A minha colega de projeto e amiga Isabela por sempre estar presente, por ter guiado esse projeto e me orientado em diversas situações, até mesmo quando eu mal sabia me locomover dentro da UEM, você foi essencial para a conclusão desse trabalho. Agradeço pelas palavras de incentivo, pelo apoio e disponibilidade em auxiliar em todos os momentos.

A minha colega e amiga Mariana que se dispôs a ficar com o Miguel nos momentos que precisei estar ausente. Sem você eu teria demorado muito mais tempo para concluir. Te admiro por ter esse coração gigante e sou eternamente grata a você.

A minha orientadora prof<sup>a</sup> Dra Maria Raquel Marçal Natali, que me aceitou e confiou no meu trabalho mesmo sem nem me conhecer. Que mesmo em meio a tantos compromissos, não negou esforços para me ajudar. Que ao descobrir minha gravidez em meio a pesquisa me incentivou com sua história de vida. Obrigada pela oportunidade. Minha gratidão e todo meu respeito a você.

Ao meu coorientador e amigo prof Dr. Fernando Carlos de Sousa, por ter sido um exemplo de profissional, desde as primeiras aulas ministradas de Anatomia Humana, você fez com que eu me encontrasse dentro da Biologia. Obrigada por todos os ensinamentos passados nesses 6

anos, por ser tão prestativo e não medir esforços para me ajudar em todas as ocasiões. Sou eternamente grata a você pelas oportunidades que abriu em minha vida acadêmica.

Aos colegas, professores, secretárias, zeladoras e técnicas do Laboratório de Fisiologia e Histologia, pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas, pela troca de conhecimento e ensinamentos. Vocês sem dúvida fizeram meus dias mais leves e meu trabalho mais prazeroso.

Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e a Universidade Estadual de Maringá por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos que tornaram esse sonho possível de ser realizado.

## APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas apresentadas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação é composta de um artigo científico denominado: **“Efeitos do Goji Berry (*Lycium barbarum*) sobre a morfofisiologia e inervação intrínseca do colo proximal de ratos Wistar obesos”** – **“Effects of Goji Berry (*Lycium barbarum*) on the morphophysiology and intrinsic innervation of the proximal colon of obese Wistar rats”**.

Redigido de acordo com as normas (Anexo II) da revista *Journal of Functional Foods*. ISSN: 1756-4646 e Fator de Impacto 4.451 (Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-functional-foods>).



## RESUMO GERAL

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal advinda de uma ingestão calórica, que ultrapassa o gasto energético diário; é um problema de saúde mundial que compromete a qualidade de vida dos indivíduos e representa fator de risco para diversas doenças potencialmente fatais. A obesidade está associada a doenças do trato gastrointestinal, sendo que no intestino grosso tem-se relacionado a obesidade à maior incidência de câncer e alterações na motilidade, no estado inflamatório e na microbiota. O modo de vida ocidentalizado se caracteriza por oferta abundante de alimentos palatáveis, ultraprocessados e de alta concentração energética, o que favorece o aumento da prevalência de obesidade. Extensivas pesquisas têm sido realizadas com objetivo de encontrar compostos úteis na prevenção e/ou tratamento da obesidade a exemplo do Goji Berry (GB) (*Lycium barbarum*), caracterizado como alimento funcional que tem se mostrado eficiente no controle da obesidade. Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do tratamento e profilaxia com GB sobre parâmetros corporais, bioquímicos e morfofisiológicos e também sobre a inervação intrínseca do colo proximal em ratos Wistar obesos. O modelo experimental de obesidade utilizado envolve o aumento das quantidades de carboidratos simples na dieta, tornando-a mais palatável e induzindo uma maior ingestão calórica. Essa alimentação simula dietas humanas baseadas em produtos industrializados ricos em açúcares e de baixo valor nutricional. Foram analisadas a massa corporal, comprimento naso-anal, massa da gordura visceral, tempo de trânsito gastrointestinal, fenótipo de fezes, glicemia, triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT) plasmáticos. Além disso, foi realizado estudo histológico do colo proximal com mensuração da espessura das túnicas e parede total intestinal e quantificada a população de células caliciformes produtoras de mucinas neutras. Também foi realizado estudo da população geral de neurônios e células da glia no plexo mioentérico, respectivamente, por meio de imunohistoquímica para proteínas HuC/D e S100. Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, divididos igualmente em 5 grupos experimentais de acordo com a indução ou não de obesidade e suplementação ou não com extrato de GB na dose de 250 mg/kg de peso corporal ou volume equivalente de água, administrado por gavagem gástrica. O período experimental se estendeu dos 21 aos 130 dias de vida e os animais foram submetidos a eutanásia após este período. Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma: Controle + água (CA), alimentados com dieta padrão para roedores dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com água dos 70 aos 130 dias; Controle + GB (CGB), alimentados com dieta padrão para roedores dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com extrato de GB (250 mg/kg de peso corporal) dos 70 aos 130 dias; Obeso + água (OA), alimentados com dieta rica em carboidratos simples (RCS) dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com água dos 70 aos 130 dias; Obeso + GB (OGB), alimentados com dieta RCS dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com extrato de GB dos 70 aos 130 dias e Obeso profilático (OPR), alimentados com dieta RCS dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com extrato de GB dos 21 aos 130 dias. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's e dados paramétricos submetidos à Análise de Variância (One-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados de distribuição de frequência foram analisados por teste de Qui-quadrado com 5% de significância. A dieta rica em carboidratos simples (RCS) promoveu aumento significativo na massa corporal final, índice de massa corporal (IMC) e massa da gordura visceral, levando a um quadro de obesidade efetivo. O tratamento diário com GB por 60 dias (OGB) apresentou efeito redutor para com a massa corporal final e a massa da gordura mesentérica dos animais em relação ao grupo OA. A profilaxia (OPR) melhorou os

parâmetros biométricos, diminuindo 8,5% do IMC em comparação com o grupo OA. O GB em animais não obesos não produziu alteração na massa final, IMC e gordura visceral. Os parâmetros bioquímicos sanguíneos indicaram glicemia plasmática de jejum aumentada em todos os grupos comparados ao grupo CA. Entretanto, este aumento não caracteriza um estado de diabetes por não atingir valores acima de 250 mg/dL. O nível de TG mostrou aumento de 180% no grupo OA em relação ao grupo CA. O tratamento (OGB) e profilaxia (OPR) com extrato de GB não apresentaram melhora para os níveis de TG. A dieta RCS (grupo OA) e a profilaxia com extrato de GB (grupo OPR) não influenciaram de forma significativa nos níveis de CT, por outro lado, o tratamento elevou significativamente o CT (grupo OGB). Para a fração de colesterol HDL, o grupo OPR e o grupo OGB, apresentaram aumento de 13,7% e 37,6%, respectivamente, sendo o último estatisticamente significativo. Não houve influência da dieta ou da suplementação com extrato de GB no tempo de trânsito gastrointestinal. Porém, a dieta RCS reduziu o volume total, a quantidade de água e o comprimento dos pellets de fezes. O tratamento com GB (OGB) não teve influência significativa nesses parâmetros e a profilaxia (OPR) elevou significativamente o comprimento dos pellets, tornando-os equivalentes aos do grupo CA. O diâmetro dos pellets de fezes foi mantido entre os grupos. A morfologia e a espessura das túnicas do colo proximal não demonstraram diferença. O índice de células caliciformes neutras (PAS+) apresentou redução de 10% nos animais obesos (OA) quando comparados ao grupo controle (CA), porém de forma não significativa. O tratamento com GB por 60 dias (OGB) não interferiu nesse parâmetro, entretanto, a profilaxia (OPR) reverteu esse quadro, aumentando o índice de células caliciformes, tornando-o equivalentes ao grupo CA. Em geral, os neurônios do plexo mioentérico estavam organizados em gânglios de tamanhos e formatos variados, com poucos neurônios dispersos. Em relação ao tamanho e forma dessas células, encontrou-se neurônios pequenos, médios e grandes. A dieta RCS não causou alteração na densidade de neurônios mioentéricos (HuC/D). Por apresentarem grande variabilidade de tamanho, utilizar uma análise por média não é o indicador adequado para analisar possíveis efeitos sobre o crescimento ou atrofia neuronal. Para isso, é mais conveniente representar os dados de morfometria neuronal na forma de histogramas de distribuição de frequência que revelam as proporções de neurônios pequenos, médios e grandes. Observou-se que o tratamento com GB por 60 dias em ratos não obesos (grupo OGB versus CA) não afeta o crescimento neuronal, mantendo semelhantes às proporções de neurônios pequenos, médios e grandes. Comparando o grupo CA com os grupos OA, OGB e OPR observou-se diferença significativa, com aumento na incidência de neurônios pequenos nos grupos obesos por dieta RCS. A administração de GB por 60 dias não demonstrou diferença significativa sobre o crescimento neuronal (grupo OA versus grupo OGB). Por outro lado, o tratamento profilático por 109 dias (OPR) aumentou, de forma significativa, o número de neurônios grandes em relação ao grupo OA. O número de células da glia não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando ausência de efeito da dieta e/ou do extrato de GB sobre a sobrevivência destas células. Concluiu-se com este estudo que a dieta RCS por 109 dias foi capaz de induzir a obesidade em ratos Wistar, promovendo redução no comprimento do colo proximal sem interferir na organização morfológica e morfométrica da parede total e túnicas deste órgão. O tratamento com extrato GB na dose 250 mg/kg de massa corporal por 60 dias foi responsável por reduzir a massa corporal final, a massa da gordura mesentérica e elevar o nível plasmático de colesterol HDL. A profilaxia com extrato GB na dose 250 mg/kg de massa corporal por 109 dias se mostrou eficiente em reduzir o IMC, reestabelecer o índice de células caliciformes e aumentar a incidência de neurônios grandes com diminuição no número de neurônios médios. Dessa forma, a utilização do extrato de GB torna-se uma alternativa promissora no controle da obesidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** obesidade, intestino grosso, células calciformes, sistema nervoso entérico

## GENERAL ABSTRACT

Obesity is characterized by excessive accumulation of body fat resulting from caloric intake, which exceeds daily energy expenditure; it is a global health problem that compromises the quality of life of individuals and represents a risk factor for several potentially fatal diseases. Obesity is associated to diseases of the gastrointestinal tract, and in the large intestine obesity has been related to a higher incidence of cancer and changes in motility, inflammatory status and microbiota. The westernized way of life is characterized by an abundant supply of palatable, ultra-processed and high-energy foods, which favors the increase in the prevalence of obesity. Extensive research has been carried out in order to find useful compounds in the prevention and/or treatment of obesity, such as the Goji Berry (GB) (*Lycium barbarum*), characterized as a functional food that has been shown to be efficient in controlling obesity. This study aimed at analyzing the effects of treatment and prophylaxis with GB on body, biochemical and morphophysiological parameters and also on the intrinsic innervation of the proximal colon in obese Wistar rats. The experimental model of obesity used involves increasing the amounts of simple carbohydrates in the diet, making it more palatable and inducing a higher caloric intake. This diet simulates human diets based on industrialized products rich in sugars and of low nutritional value. Body mass, naso-anal length, visceral fat mass, gastrointestinal transit time, stool phenotype, glycemia, plasma triglycerides (TG) and total cholesterol (CT) were analyzed. In addition, a histological study of the proximal colon was performed, measuring the thickness of the tunics and total intestinal wall and quantifying the population of neutral mucin-producing goblet cells. A study of the general population of neurons and glial cells in the myenteric plexus was also performed, respectively, by means of immunohistochemistry for HuC/D and S100 proteins. Fifty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, divided equally into 5 experimental groups according to whether or not obesity was induced and whether or not they were supplemented with GB extract at a dose of 250 mg/kg of body weight or equivalent volume of water, administered by gastric gavage. The experimental period lasted from 21 to 130 days of life and the animals were euthanized after this period. The experimental groups were distributed as follows: Control + water (CA), fed a standard diet for rodents from 21 to 130 days and administration of daily gastric gavage with water from 70 to 130 days; Control + GB (CGB), fed a standard diet for rodents from 21 to 130 days and daily gastric gavage administration with GB extract (250 mg/kg of body weight) from 70 to 130 days; Obese + water (OA), fed a diet rich in simple carbohydrates (RCS) from 21 to 130 days and administration of daily gastric gavage with water from 70 to 130 days; Obese + GB (OGB), fed RCS diet from 21 to 130 days and daily gastric gavage administration with GB extract from 70 to 130 days and Prophylactic Obese (OPR), fed RCS diet from 21 to 130 days and administration of daily gastric gavage with GB extract from 21 to 130 days. Data normality was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test and parametric data submitted by Analysis of Variance (One-way ANOVA) followed by Tukey's post-test. Frequency distribution data were analyzed by chi-square test with 5% significance. The diet rich in simple carbohydrates (RCS) promoted a significant increase in final body mass, body mass index (BMI) and visceral fat mass, leading to an effective obesity framework. Daily treatment with GB for 60 days (OGB) had a reducing effect on the final body mass and the mass of the mesenteric fat of the animals in relation to the OA group. Prophylaxis (OPR) improved biometric parameters, decreasing BMI by 8.5% compared to the OA group. GB in non-obese animals produced no change in final mass, BMI and visceral fat. Blood biochemical parameters indicated increased fasting plasma glucose in all groups compared to the CA group. However, this increase does not characterize a state of diabetes as it does not reach values above 250 mg/dL. The TG level showed an increase of 180% in the OA group

compared to the CA group. Treatment (OGB) and prophylaxis (OPR) with GB extract did not improve TG levels. The RCS diet (OA group) and GB extract prophylaxis (OPR group) did not significantly influence the CT levels, on the other hand, the treatment significantly increased the CT (OGB group). For the HDL cholesterol fraction, the OPR group and the OGB group showed an increase of 13.7% and 37.6%, respectively, the latter being statistically significant. There was no influence of diet or GB extract supplementation on gastrointestinal transit time. However, the RCS diet reduced the total volume, the amount of water and the length of the feces pellets. Treatment with GB (OGB) had no significant influence on these parameters and prophylaxis (OPR) significantly increased the length of the pellets, making them equivalent to those of the CA group. The diameter of stool pellets was maintained between groups. The morphology and thickness of the tunics of the proximal neck showed no difference. The neutral goblet cell index (PAS+) showed a reduction of 10% in obese animals (OA) when compared to the control group (CA), but not significantly. Treatment with GB for 60 days (OGB) did not interfere in this parameter, however, prophylaxis (OPR) reversed this situation, increasing the goblet cell index, making it equivalent to the CA group. In general, myenteric plexus neurons were organized into ganglia of varying sizes and shapes, with few scattered neurons. Regarding to the size and shape of these cells, small, medium and large neurons were found. The RCS diet did not change the density of myenteric neurons (HuC/D). As they present great variability in size, using an average analysis is not the appropriate indicator to analyze possible effects on neuronal growth or atrophy. For this, it is more convenient to represent the neuronal morphometric data in the form of frequency distribution histograms that reveal the proportions of small, medium and large neurons. It was observed that treatment with GB for 60 days in non-obese rats (CGB versus CA group) does not affect neuronal growth, keeping the proportions of small, medium and large neurons similar. Comparing the CA group to the OA, OGB and OPR groups, a significant difference was observed, with an increase in the incidence of small neurons in the obese groups by RCS diet. GB administration for 60 days showed no significant difference on neuronal growth (OA group versus OGB group). On the other hand, prophylactic treatment for 109 days (OPR) significantly increased the number of large neurons compared to the OA group. The number of glial cells showed no significant difference between the groups, indicating no effect of diet and/or GB extract on the survival of these cells. It was concluded with this study that the RCS diet for 109 days was able to induce obesity in Wistar rats, promoting a reduction in the length of the proximal neck without interfering in the morphological and morphometric organization of the total wall and tunics of this organ. Treatment with GB extract at a dose of 250 mg/kg of body mass for 60 days was responsible for reducing the final body mass, the mass of mesenteric fat and increasing the plasma level of HDL cholesterol. Prophylaxis with GB extract at a dose of 250 mg/kg of body mass for 109 days proved to be efficient in reducing BMI, reestablishing the goblet cell index and increasing the incidence of large neurons with a decrease in the number of medium neurons. Thus, the use of GB extract becomes a promising alternative in the control of obesity.

**KEYWORDS:** obesity, large intestine, goblet cells, enteric nervous system.

# **EFEITOS DO GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) SOBRE A MORFOFISIOLOGIA E INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO COLO PROXIMAL DE RATOS WISTAR OBESOS**

Samara Cristina Dossena<sup>1\*1</sup>, Fernando Carlos de Sousa<sup>2</sup>, Maria Raquel Marçal Natali<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. Estrada para Boa Esperança, KM 04, 85660-000 - Dois Vizinhos, PR - Brasil

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas. Zona 07, 87020-900 - Maringá, PR - Brasil

## **RESUMO**

O Goji Berry (GB) (*Lycium barbarum*), caracterizado como alimento funcional, tem se mostrado eficiente no controle da obesidade. Neste estudo foi avaliado o efeito da suplementação com extrato de GB (250 mg/kg) em ratos Wistar machos, dos 70 aos 130 dias (grupo OGB) e dos 21 aos 130 dias (grupo OPR), com obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples (RCS). A dieta RCS não alterou a morfologia e espessura da parede intestinal no colo proximal, mas levou ao aumento na proporção de neurônios pequenos no plexo mioentérico. A utilização de extrato de GB em animais obesos, promoveu a diminuição da massa corporal, da massa da gordura mesentérica, aumento do colesterol HDL e reestabelecimento do percentual de células caliciformes. Os resultados indicam que a utilização de extrato de GB torna-se uma alternativa promissora no controle da obesidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** obesidade, intestino grosso, células caliciformes, sistema nervoso entérico

---

*Abreviações:* GB, Goji Berry; RCS, Dieta rica em carboidratos simples; IMC, Índice de massa corporal; TGI, Trato gastrointestinal; SNE, Sistema nervoso entérico; UEM, Universidade Estadual de Maringá; HDL, Lipoproteína de alta densidade; VLDL, Lipoproteína de muito baixa densidade; HE, Hematoxilina e Eosina; HFD, Dieta hiperlipídica; PAS, Ácido Periódico de Schiff; CT, Colesterol total; TG, Triglicerídeos.

<sup>1</sup> \*Endereço para correspondência ao autor.

*E-mail:* samara.c.dossena@hotmail.com

**EFFECTS OF GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) ON THE MORPHOPHYSIOLOGY  
AND INTRINSIC INNERVATION OF THE PROXIMAL COLON OF OBESE  
WISTAR RATS**

Samara Cristina Dossena<sup>1\*2</sup>, Fernando Carlos de Sousa<sup>2</sup>, Maria Raquel Marçal Natali<sup>3</sup>

<sup>1</sup>State University of Maringá, Graduate Program in Biological Sciences. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brazil

<sup>2</sup>Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos Campus. Road to Boa Esperança, KM 04, 85660-000 - Dois Vizinhos, PR - Brazil

<sup>3</sup>State University of Maringá, Center for Biological Sciences, Department of Morphological Sciences. Room 108, Zona 07, 87020-900 - Maringa, PR – Brazil

**ABSTRACT**

Goji Berry (GB) (*Lycium barbarum*), characterized as a functional food, has been shown to be efficient in preventing obesity. In this study, the effect of supplementation with GB extract (250 mg/kg) was evaluated in male Wistar rats, from 70 to 130 days (OGB group) and from 21 to 130 days (OPR group), with obesity induced by a diet rich in simple carbohydrates (RCS). The RCS diet didn't change the morphology and thickness of the intestinal wall in the proximal colon, but led to an increase in the proportion of small neurons in the myenteric plexus. The GB extract usage in obese animals promoted a decrease in body mass, mesenteric fat mass, an increase in HDL cholesterol and reestablishment of the percentage of goblet cells. The results indicate that the use of GB extract becomes a promising alternative in the obesity prevention.

**KEYWORDS:** obesity, large intestine, goblet cells, enteric nervous system

---

*Abbreviations:* GB, Goji Berry; RCS, Diet Rich in Simple Carbohydrates; BMI, Body Mass Index; TGI, Gastrointestinal tract; ENS, Enteric Nervous System; UEM, State University of Maringá; HDL, High Density Lipoprotein; VLDL, Very Low Density Lipoprotein; HE, Hematoxylin and Eosin; HFD, High Fat Diet; PAS Periodic Acid Schiff; CT, Total Cholesterol; TG, Triglycerides.

<sup>2</sup> Correspondence address to the author.

*Email:* samara.c.dossena@hotmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a obesidade como uma epidemia mundial associada principalmente ao perfil alimentar e de atividade física (WHO, 2022). A obesidade pode ser definida como excesso de gordura corporal em relação à massa magra em um nível que compromete a saúde dos indivíduos (Oliveira et al., 2003). O desenvolvimento destas condições é considerado multifatorial e depende da interação de fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais (Kolotkin et al., 2001). Além disso, a obesidade pode decorrer da associação entre o sedentarismo e desordens endócrinas, como o hipotireoidismo (Tavares, Nunes & Santos, 2010).

Decorrente da obesidade estão associados quadros de hipertensão, distúrbios cardiovasculares, diabetes tipo 2, esteatose hepática (Hotamisligil, 2006) e alguns tipos de câncer (Guh et al., 2009; Masci et al., 2018). A obesidade está diretamente relacionada a distúrbios de motilidade gastrointestinal (Xing & Chen, 2004) como constipação e retardo no trânsito colônico (Anitha et al., 2016).

O aumento na prevalência de obesidade configura, em longo prazo, uma ameaça à sustentabilidade do tratamento desses indivíduos, tendo em vista que os gastos do setor público com doenças relacionadas à obesidade representam uma parte significativa do orçamento de vários países (Bahia & Araújo, 2014). As consequências econômicas desta doença e doenças associadas não se limitam aos elevados custos médicos, mas incluem também os custos indiretos ou sociais, tais como: diminuição da qualidade de vida, problemas de ajustes sociais, perda de produtividade, incapacidade com aposentadorias precoces e morte (Bahia & Araújo, 2014).

Associar dietas com reduzida quantidade de gordura e açúcar à atividade física regular tem-se mostrado eficaz na redução de massa corporal (Amani & Gill, 2013; Hu, 2013). Entretanto, muitas pessoas sentem dificuldades em se manter por muito tempo em dietas, uma vez que o hábito de vida ocidentalizado se caracteriza por oferta abundante de alimentos palatáveis, práticos e de alta concentração energética. A prática de atividades físicas é ainda mais difícil de ser mantida, por questões climáticas, disponibilidade financeira, dentre outros fatores (Santos, Portela & Vieira, 2012), tornando de extrema importância a busca por soluções que minimizem este quadro.

Assim como os fármacos industrializados, algumas plantas medicinais têm se mostrado eficientes no controle da obesidade, bem como nos sintomas da síndrome metabólica (Amagase & Farnsworth, 2011). O fruto do *Lycium barbarum*, amplamente



conhecido como Goji Berry (GB) é utilizado como medicamento e alimento funcional há mais de 2000 anos no leste da Ásia, especialmente na China (Youyuan et al., 2019). O GB é rico em polissacarídeos, carotenóides, vitaminas, aminoácidos, minerais e compostos fenólicos (Crepaldi et al., 2018; Qian et al., 2017). Nos últimos anos, a demanda por GB aumentou devido a seus potenciais efeitos benéficos para a saúde humana (Rocchetti et al., 2018).

O conceito de alimentos funcionais foi inicialmente introduzido no Japão em meados de 1980, em referência a alimentos utilizados como parte de uma dieta normal que demonstraram benefícios metabólicos, fisiológicos ou que reduzem os riscos de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais (Costa & Rosa, 2016).

Estudos recentes indicam que o extrato do GB apresenta uma série de atividades biológicas (Cheng et al. 2015), entre elas, efeito antienvhecimento, antioxidante (Li, Ma & Liu, 2007; Niu et al., 2008), anticancerígeno (Mao et al., 2011; Miao et al., 2010; Shen & Du, 2012), antifadiga (Luo, Yan & Zhang, 2000), antiviral (Wang et al., 2010), hipoglicêmico (Li, 2007; Luo et al., 2004; Yang et al., 2014), hipolipemiante (Luo et al., 2004), neuroprotetor (Rui et al., 2012; Yu et al., 2005), de redução da circunferência abdominal (Amagase & Farnsworth, 2011), modulação do sistema imune e efeito protetor no sistema reprodutor (Li & Zhou, 2007; Wang et al., 2002). Em ratos Wistar obesos por dieta RCS tratados por 60 dias com GB (250 mg/Kg massa corporal) foram constatados efeitos hipoglicemiantes, hipolipemiantes, redução no ganho de massa corporal e na capacidade gliconeogênica hepática (Crepaldi et al., 2018).

Com relação à ingestão calórica, o trato gastrointestinal (TGI) desempenha um papel central no controle do consumo de alimentos, digestão e absorção de nutrientes. O desempenho bem sucedido dessas funções depende de uma motilidade gastrointestinal intacta e bem coordenada, pois, ela não apenas regula as taxas nas quais os nutrientes estão sendo processados, mas também participa do controle do apetite e da saciedade (Xing & Chen, 2004). Alterações na motilidade gastrointestinal em indivíduos obesos podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da obesidade e mudança do comportamento alimentar (Xing & Chen, 2004). A motilidade do intestino é resultado do controle integrado da contração e relaxamento das camadas musculares pela ação dos hormônios liberados em resposta à refeição e do sistema nervoso entérico (SNE) (Barrett, 2015).

O SNE representa a porção mais complexa do sistema nervoso autônomo e está dedicado à inervação intrínseca do TGI. O SNE é formado por neurônios, células da glia e pelas conexões entre essas células e outros tipos celulares. A maioria dos neurônios entéricos

se organiza em dois plexos, o plexo mioentérico e o plexo submucoso. Segundo Gabella (1989), alterações no número e tamanho dos neurônios do plexo mioentérico estão associadas a variações na espessura da túnica muscular, tecido alvo responsável pela manutenção e plasticidade destes neurônios.

Na parede do intestino grosso, encontramos a mucosa colônica, organizada em criptas longas, revestidas por epitélio simples cilíndrico constituído por enterócitos, abundantes células caliciformes e poucas células enteroendócrinas, entre outras células (Gartner & Hiatt, 2007; Kierszenbaum & Tres, 2012). As secreções das células caliciformes compõem a barreira da mucosa colônica que atua como a primeira linha de defesa contra lesões físicas e químicas causadas por alimentos ingeridos, microrganismos e produtos microbianos (Kim & Ho, 2010). Essa barreira pode ser prejudicada em respostas a estímulos, como hormônios (neuropeptídeos) e aumento de mediadores inflamatórios (citocinas e lipídios) (Dharmani et al., 2008; Laboisse et al., 1996).

Considerando os potenciais efeitos benéficos do GB em indivíduos obesos e o envolvimento do TGI nas alterações induzidas ou decorrentes da obesidade, este estudo tem como objetivo analisar os efeitos do tratamento e a profilaxia do GB sobre a morfofisiologia e a inervação intrínseca do colo proximal em ratos Wistar obesos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob protocolo de nº 2072240419 (Anexo I).

### **2.1 Delineamento experimental**

Foram utilizados 50 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UEM no dia do desmame (21 dias de idade) com aproximadamente 60 g de peso corporal. Durante o experimento os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (3 ou 2 animais por caixa), no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sob ciclos regulares de iluminação (12h claro: 12h escuro), temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) e exaustão de ar.

Os animais foram organizados nos grupos experimentais: Controle + água (CA), alimentados com dieta padrão para roedores dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com água dos 70 aos 130 dias; Controle + GB (CGB), alimentados com dieta padrão para roedores dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com

extrato de GB (250 mg/kg de peso corporal) dos 70 aos 130 dias; Obeso + água (OA), alimentados com dieta rica em carboidratos simples (RCS) dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com água dos 70 aos 130 dias; Obeso + GB (OGB), alimentados com dieta RCS dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com extrato de GB dos 70 aos 130 dias e Obeso profilático (OPR), alimentados com dieta RCS dos 21 aos 130 dias e administração de gavagem gástrica diária com extrato de GB dos 21 aos 130 dias.

## 2.2 Indução à obesidade

Os animais com 21 dias de idade pertencentes aos grupos obesos foram alimentados com dieta RCS. Para este preparado, foi utilizada ração comercial para roedores (Nuvilab, Curitiba, Brasil) triturada, com adição de leite condensado (Nestlé, Minas Gerais, Brasil), açúcar cristal (Alto Alegre, São Paulo, Br) e água (Crepaldi et al., 2018; Lima et al., 2008). Os valores nutricionais das dietas utilizadas estão representados na Tabela 1. Os animais tiveram acesso livre à água e alimento. A ração foi preparada uma vez por semana e mantida sob refrigeração.

**Tabela 1.** Valores nutricionais da dieta padrão para roedores (informações do fabricante) e da dieta RCS (Lima et al., 2008).

<b>Valores Nutricionais</b>	<b>Dieta padrão</b>	<b>Dieta RCS</b>
<b>Calorias (kcal/100g de dieta)</b>	292	318
<b>Carboidratos (%)</b>	57,2	68
<b>Proteínas (%)</b>	30	16
<b>Gorduras (%)</b>	12,5	16
<b>Água (%)</b>	12,5	27

## 2.3 Preparação do Goji Berry e acompanhamento dos grupos

O extrato de GB com composição descrita por Crepaldi et al., (2018), foi adquirido em farmácia de manipulação (Florien, Maringá, Brasil), diluído em água (250 mg/mL) e administrado diariamente nos animais por gavagem gástrica (0,1 mL/100 g de peso corporal). A dosagem utilizada (250 mg/kg) foi estabelecida de acordo com os testes de eficácia

descritos por Luo et al. (2004). O consumo de ração de todos os animais foi registrado uma vez por semana, bem como a massa corporal. Aos 130 dias de idade, os ratos foram pesados e mensurado o comprimento naso-anal para obtenção do IMC ( $\text{massa}/(\text{comprimento naso-anal})^2$ , em  $\text{g.cm}^2$ ) (Nery et al., 2011).

#### **2.4 Tempo de trânsito gastrointestinal**

Setenta e duas horas antes da eutanásia, os ratos receberam por gavagem 0,3 mL de uma solução contendo 3% de corante Carmim hidro 52% e 0,5% de etilcelulose líquido (Corantec – São Paulo SP, Brasil). Os animais foram acomodados em caixas separadas, sem cepilho, em local com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), e fornecimento livre de alimento e água e mantidos nessas condições por um período máximo de 12 horas a partir da administração da solução e observados a cada 15 minutos. O horário da administração da solução e da eliminação do primeiro pellet fecal marcado com corante de cada animal foi registrado e a diferença entre esses horários foi expressa em minutos.

#### **2.5 Análise do fenótipo das fezes**

Durante a última semana do experimento foi realizada a análise do fenótipo dos pellets de fezes (Aktar et al., 2018). Para isso, os animais foram isolados em caixas de polipropileno das 19h às 7h do dia seguinte, momento em que foram reagrupados. Foram coletados todos os pellets de fezes de cada caixa/animal, contados e pesados. Em seguida, com auxílio de paquímetro, 10 pellets de cada caixa/animal foram escolhidos de forma aleatória e medidos quanto ao comprimento e diâmetro. Por fim, todos os pellets coletados foram mantidos overnight em estufa a 60 °C, seguido a isso, pesados para obtenção da massa seca. A quantidade de água contida nos pellets foi determinada pela diferença entre a massa úmida e seca.

#### **2.6 Coleta de órgãos e tecidos**

Para a análise da glicemia de jejum, foi extraída uma gota de sangue da ponta da cauda de cada animal e realizada a mensuração com tira-teste e medidor portátil (FreeStyle Optium H, Abbott, São Paulo-SP, Brasil). Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia após jejum noturno por aprofundamento de anestesia (tiopental 120 mg/kg de peso corporal

associado a lidocaína 5 mg/kg, intraperitoneal) para remoção do intestino grosso, gorduras viscerais e sangue. O sangue foi coletado por punção cardíaca e amostras foram centrifugadas para separação de soro e plasma e armazenadas em freezer -80 °C para as análises bioquímicas. As amostras de gordura periepídidimal, retroperitoneal e mesentérica foram pesadas e as amostras de colo proximal foram mensuradas e fixadas em paraformaldeído 4%.

## **2.7 Análises bioquímicas**

O sangue coletado foi deixado em um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro, posteriormente utilizado para dosagem de triglicérides (TG), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL) e cálculo do Índice Aterogênico (CT/HDL). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e armazenadas em freezer -80 °C. As análises foram realizadas com kits comerciais (Gold Analisa Diagnostica Ltda – Minas Gerais MG, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante em espectrofotômetro semiautomatizado Bioplus 2000.

## **2.8 Preparação das amostras do colo proximal**

Após a coleta, foi realizada a mensuração do comprimento e largura do intestino grosso, em seguida separado e mensurado o comprimento do colo proximal. Os segmentos do colo proximal destinados a imunohistoquímica, foram lavados em tampão fosfato salinado (PBS 0,1 M pH 7,4) preenchidos com paraformaldeído 4% e suas extremidades amarradas, formando “bexigas”, deixadas imersas no mesmo fixador por 3 horas. Em seguida, as “bexigas” foram abertas e as amostras armazenadas em PBS com azida sódica 0,08%.

Sob estereomicroscópio amostras de aproximadamente 1 cm de comprimento foram abertas pela margem mesocólica e microdissecadas para remoção das túnicas mucosa, submucosa e parte da muscular circular para obtenção dos preparados totais de membrana, os quais foram utilizados para evidenciação dos neurônios e das células da glia do plexo mioentérico (Costa et al., 1980).

## **2.9 Imunohistoquímica (HuC/D e S100)**

Os preparados totais foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas e realizadas de acordo com Vicentini et al. (2018) para a marcação da população geral de neurônios mioentéricos (HuC/D) e das células da glia (S100).

Os preparados totais foram lavados 3 vezes durante 10 minutos com PBS 0,1 M (pH 7,4) e TRITON X-100 0,05% (PBS-T) e deixados em solução de bloqueio por 2 horas a fim de se evitar ligações inespecíficas. Foram então incubados em solução contendo os anticorpos primários anti-HuC/D (mouse, 1:500; A21271 Invitrogen, USA) e anti-S100 (rabbit, 1:500; A16257, Invitrogen, USA) durante 48 horas em estufa a 36 °C. Após a incubação, os preparados totais foram lavados 3 vezes, 10 minutos cada banho, em PBS+Triton X-100 e incubadas em nova solução com os anticorpos secundários Alexa Fluor 546 anti-mouse (1:500; A10036, Invitrogen, USA) e Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:500; A21206, Invitrogen, USA) durante 2 horas e por fim realizadas 3 lavagens com PBS por 10 minutos. Os preparados totais foram montados entre lâmina e lamínula com ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, USA).

As análises quantitativas foram realizadas por meio de imagens capturadas por câmera de alta resolução acoplada ao microscópio de fluorescência (Olympus FSX100, Olympus Microscopy, Europa) e transferidas para o computador através do programa Axio Vision Rel (v. 4.6). As imagens foram analisadas através do programa Image-Pro Plus, (v. 4.5.029; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foram quantificados todos os corpos celulares presentes em 40 imagens/animal, capturadas na porção intermediária da circunferência intestinal na objetiva de 20x e os resultados foram expressos como neurônios/cm<sup>2</sup>, sendo a área de cada imagem 0.01442 cm<sup>2</sup>.

Posteriormente foram mensuradas aleatoriamente as áreas de 100 corpos celulares neuronais/animal com o auxílio do software de análise de imagens Image-Pro Plus. Os dados referentes a mensuração foram tabulados e divididos em histogramas de frequência com intervalos arbitrários de 100 μm<sup>2</sup>. Este procedimento destaca a gama de variação das áreas neuronais.

## **2.10 Histologia**

Amostras do colo proximal foram abertas na borda mesocólica, fixadas em paraformaldeído 4% durante 6 horas, desidratadas em série de concentrações crescentes de

álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados com 6 µm de espessura, em micrótomo (Leica RM2145). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) com objetivo de avaliar a morfologia e a espessura das túnicas mucosa, muscular e parede intestinal total.

A análise morfométrica foi realizada por amostragem de imagens capturadas em objetiva de 10x em microscópio óptico Olympus BX41 com câmera de alta resolução (Q Color 3, Olympus American, INC), acoplado a um computador com programa computacional Q-Capture. As avaliações foram realizadas em 20 pontos aleatórios/corte em cinco cortes/animal por meio do Sistema de Análise de Imagens Image-Pro Plus, com resultados expressos em µm.

### **2.11 Evidenciação de células caliciformes (PAS<sup>+</sup>)**

A histoquímica com ácido periódico de Schiff (PAS) evidencia as mucinas neutras produzidas pelas células caliciformes. Inicialmente foi realizada a desparafinização com xilol, seguido da hidratação em sequência de banhos de álcool com concentrações decrescentes. Posteriormente, realizada a oxidação com ácido periódico 1% por 5 minutos. A seguir, foi tratado com reativo de Schiff por 15 minutos, seguido de 3 banhos em água sulfurosa. A contra coloração foi feita com hematoxilina por um minuto. Após coloração, os cortes foram desidratados em sequência de banhos de álcool em concentração crescente, diafanizados com xilol e montados entre lâmina e lamínula com ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, USA).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX41 com câmera de alta resolução Q Color 3, acoplado a um computador com programa Q-Capture. Com a objetiva de 40x foram capturadas 50 imagens/animal em regiões sem pregas. Foram quantificadas 2500 células epiteliais/animal e utilizada a fórmula: Índice de Células Caliciformes = (número de células caliciformes/2500 células epiteliais) x 100 (Soares et al., 2015).

### **2.12 Análise estatística**

Todos os conjuntos de dados foram expressos como média±desvio padrão (DP) e submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's. Dados

paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (One-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação de médias. Os dados de distribuição de frequência foram analisados por teste de Qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas usando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad, San Diego- CA, EUA).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

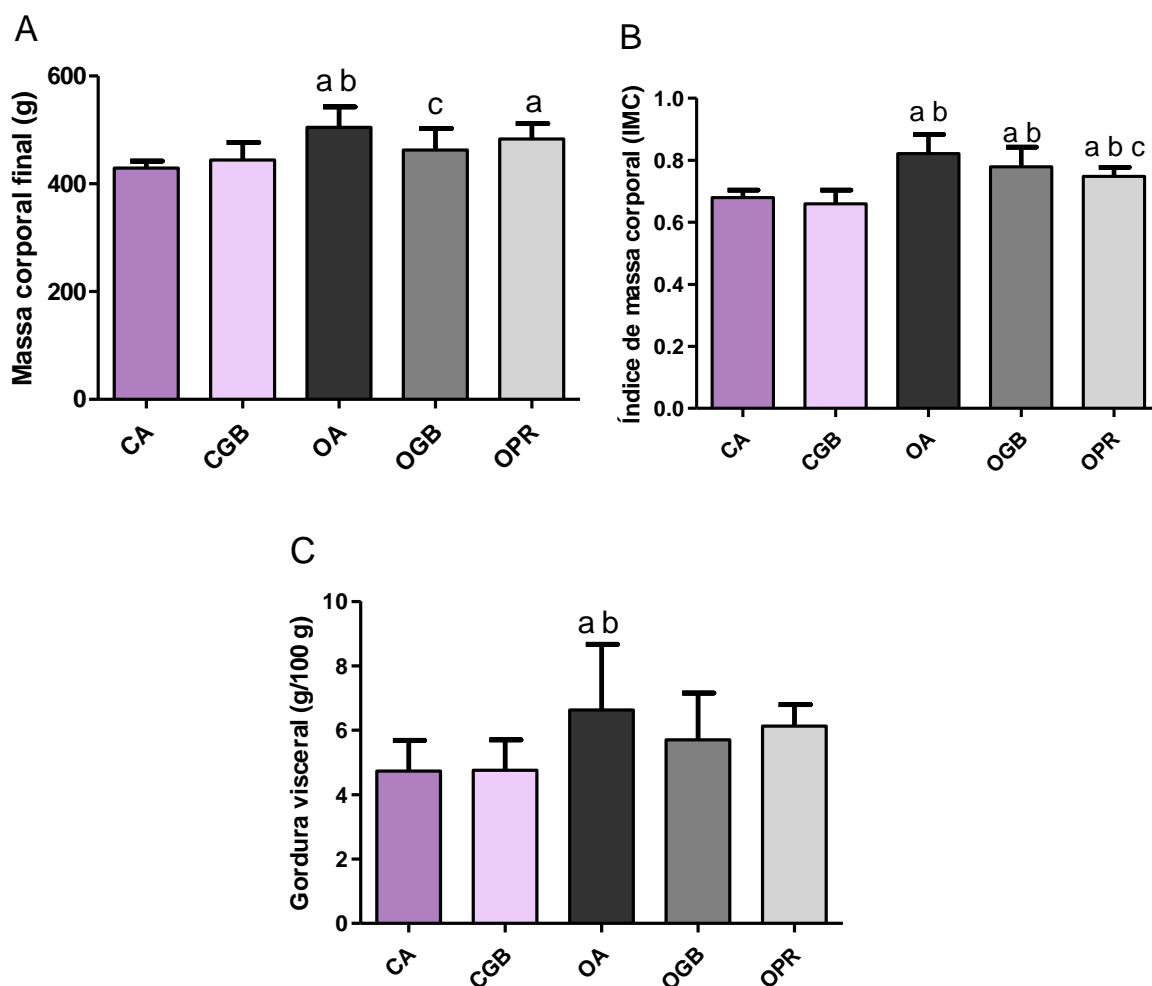
#### **3.1 Parâmetros biométricos e plasmáticos**

##### *3.1.1 Parâmetros biométricos*

Os animais pertencentes ao grupo OA apresentaram aumento significativo (Figura 1) na massa corporal final, índice de massa corporal (IMC) e gordura visceral (somatória das gorduras periepídídimal, retroperitoneal e mesentérica) quando comparados ao grupo controle (CA) que fez ingestão de dieta padrão para roedores. Resultados semelhantes foram obtidos com a mesma dieta por outros autores (Crepaldi et al., 2018; Lima et al., 2008), com dieta rica em carboidratos e gorduras (HCHF) (Abu-Elsaad & El-Karef, 2017) e dieta hiperlipídica (HFD) (Beraldi et al., 2019; Zhao, Li & Xiao, 2005), comprovando a eficiência deste modelo experimental em induzir obesidade.

O tratamento com GB por 60 dias (grupo OGB) resultou em redução significativa da massa corporal (8,4%) em relação ao grupo OA. Houve também diminuição do IMC (5%) e da massa das gorduras (16,3%), estas de maneira não significativa. A profilaxia, avaliada em animais tratados com GB por 109 dias (grupo OPR), se mostrou eficiente com relação ao IMC, que teve redução significativa de 8,5% quando comparado ao grupo OA. O tratamento com GB em animais controle (CGB) não produziu alterações na massa final, IMC e gordura visceral.





**Figura 1.** Parâmetros biométricos de ratos Wistar: massa corporal final (A), IMC (B), somatória das gorduras viscerais (C) aos 130 dias de vida, alimentados com dieta comercial para roedores sem suplementação de extrato de Goji Berry (CA) ou com suplementação entre os 70 e 130 dias (CGB), dieta RCS sem suplementação de extrato de GB (OA) ou com suplementação entre os 70 e 130 dias (OGB) ou com suplementação entre os 21 e 130 dias (OPR). Dados apresentados como média±DP. n=10 por grupo. a p<0,05 vs CA; b p<0,05 vs CGB; c p<0,05 vs OA; Sendo (A) e (C) por *one-way* ANOVA/Tukey; e (B) por Kruskal-Wallis/Dunn's.

O aumento da massa corporal nos animais alimentados com a dieta RCS ocorre pelo aumento no percentual de gordura e também pode ser atribuído a diminuição da massa muscular; redução do músculo gastrocnêmio foi constatada em ratos alimentados com dieta RCS (Crepaldi et al., 2018). A redução na massa muscular também pode ser relacionada ao menor teor de proteínas presente nessa dieta. Santos et al., (2016) em ratos alimentados com uma dieta pobre em proteínas e rica em carboidratos (LPHC) relataram redução de 36% na massa muscular do músculo extensor longo dos dedos.

Houve efeito positivo do extrato de GB com redução da massa corporal em animais RCS tratados por 60 dias, o qual pode ser atribuído ao predomínio de polissacarídeos na

composição. Os polissacarídeos são os principais constituintes funcionais do extrato de GB, compondo cerca de 40,81% do extrato (Crepaldi et al., 2018). O tratamento com polissacarídeos isolados de GB reduziu o ganho de massa em camundongos (Li et al., 2014) e em ratos alimentados com a dieta RCS (Crepaldi et al., 2018) e a dieta HFD (Zhao, Li, & Xiao, 2005).

Os polissacarídeos são componentes das fibras alimentares (Anderson et al., 2009; Tunngland & Mayer, 2002). Quando ingeridas na dieta, as fibras alimentares atrasam o tempo de digestão, levando a secreção de hormônios que promovem sensação de saciedade, prolongando o período de reincidência da fome e reduzindo o consumo calórico nas refeições subsequentes (Bernaud & Rodrigues, 2013). Ainda, os alimentos ricos em fibras têm uma densidade energética menor quando comparados aos alimentos ricos em gorduras ou açúcares (Ribeiro, Gutierrez & Rabbo, 2009). Dessa forma, alimentos ricos em fibras poderiam estrategicamente substituir a energia (calorias) dos demais alimentos não ingeridos na dieta (Rolls, 2000).

A tabela 2 apresenta a massa (g) das gorduras periepididimal, retroperitoneal e mesentérica que somadas constituem a massa de gordura visceral. Todos os depósitos de gordura estão significativamente aumentados no grupo OA quando comparados ao grupo CA. O extrato de GB (grupo OGB) atuou de forma a diminuir significativamente a massa da gordura mesentérica quando comparado ao grupo OA, demonstrando que o tratamento com GB por 60 dias apresenta efeito positivo. Uma vez que, o excesso de gordura visceral é considerado como um dos principais indicadores da síndrome metabólica e está associada a diminuição no tempo de vida média e máxima (Muzumdar et al., 2008).

**Tabela 2.** Massa (g) das gorduras periepididimal, retroperitoneal, mesentérica e gordura visceral total em ratos Wistar machos, alimentados com dieta padrão (CA), com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (CGB) e dieta rica em carboidratos simples (OA) com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (OGB) e dos 21 aos 130 dias (OPR).

	CA	CGB	OA	OGB	OPR
Gordura periepididimal (g/100g) <sup>1</sup>	1,62 ± 0,32	1,41 ± 0,21	2,21 ± 0,39 <sup>ab</sup>	1,86 ± 0,51	2,20 ± 0,29 <sup>ab</sup>
Gordura retroperitoneal (g/100g) <sup>2</sup>	1,64 ± 0,33	1,86 ± 0,54	2,79 ± 0,65 <sup>ab</sup>	2,23 ± 0,52	2,08 ± 0,21
Gordura mesentérica (g/100g) <sup>1</sup>	1,48 ± 0,36	1,49 ± 0,37	2,14 ± 0,47 <sup>ab</sup>	1,59 ± 0,50 <sup>c</sup>	1,85 ± 0,26
Gordura visceral total (g/100g) <sup>2</sup>	4,74 ± 0,95	4,76 ± 0,95	6,65 ± 2,02 <sup>ab</sup>	5,68 ± 1,42	6,13 ± 0,67

Dados apresentados como média±desvio padrão, n=10 por grupo. <sup>1</sup>Análise de Variância *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. <sup>2</sup>Análise de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. a p<0,05 vs CA; b p<0,05 vs CGB; c p<0,05 vs OA.

### 3.1.2 Parâmetros plasmáticos

A tabela 3 apresenta os parâmetros plasmáticos de glicemia, CT, colesterol HDL, TG e Índice Aterogênico nos diferentes grupos experimentais.

**Tabela 3.** Perfil glicêmico, perfil lipídico (CT, HDL e TG) e Índice Aterogênico em ratos Wistar machos, alimentados com dieta padrão (CA), com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (CGB) e dieta rica em carboidratos simples (OA) com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (OGB) e dos 21 aos 130 dias (OPR).

	CA	CGB	OA	OGB	OPR
Glicemia (mg.dL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	69,20 ± 5,53	84,30 ± 7,80 <sup>a</sup>	83,00 ± 5,44 <sup>a</sup>	87,10 ± 10,30 <sup>a</sup>	82,40 ± 3,10 <sup>a</sup>
CT (mg.dL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	74,50 ± 13,68	86,94 ± 8,83	74,24 ± 10,29	100,5 ± 23,04 <sup>ac</sup>	75,21 ± 16,98 <sup>d</sup>
HDL (mg.dL <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	41,20 ± 14,38	46,44 ± 7,27	39,17 ± 9,19	53,90 ± 10,51 <sup>c</sup>	44,55 ± 8,91
TG (mg.dL <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	68,95 ± 20,87	73,33 ± 15,72	193,7 ± 75,56 <sup>ab</sup>	254,4 ± 67,10 <sup>ab</sup>	183,4 ± 66,50 <sup>ab</sup>
Índice Aterogênico <sup>2</sup>	1,66 ± 0,33	1,89 ± 0,14	1,98 ± 0,45	1,86 ± 0,22	1,69 ± 0,12

Dados apresentados como média±desvio padrão, n=10 por grupo. <sup>1</sup>Análise de Variância *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. <sup>2</sup>Análise de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. a p<0,05 vs CA; b p<0,05 vs CGB; c p<0,05 vs OA; d p<0,05 vs OGB.

A glicemia plasmática de jejum encontrava-se aumentada em todos os grupos quando comparados ao grupo CA. Entretanto esse aumento não caracteriza um estado de diabetes por não atingir valores acima de 250 mg/dL para roedores (Henriques, Helm & Simeone, 2013). Crepaldi et al. (2018) também não obtiveram diferença nos valores de glicemia de jejum para ratos obesos por dieta RCS e tratamento com GB por 60 dias.

Diversos estudos mostram que os polissacarídeos do fruto de GB tendem a afetar o peso corporal, glicemia, metabolismo lipídico, além de alterar os estados oxidativos e inflamatórios responsáveis por complicações patológicas do diabetes de forma a melhorar esses parâmetros (Cheng et al., 2015; Kulczynski & Gramza-Michalowska, 2016; Masci et al., 2018). Efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina e tratamento por 3 semanas com 10 mg/kg de polissacarídeos isolados de GB resultaram em redução significativa no nível de glicose plasmática (Zhao, Li & Xiao, 2005).

Com relação ao perfil lipídico (Tabela 3), observou-se efeito da dieta RCS na taxa de TG com aumento de 180%, porém com manutenção do colesterol total e do HDL entre os animais do grupo OA em relação ao grupo CA, o que repercutiu na ausência de alterações significativas no Índice Aterogênico. Este índice é utilizado para estimar o risco de aterosclerose devido ao aumento do colesterol no sangue, assim sua redução indica diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Aumento nos triglicerídeos também foi

observado por Crepaldi et al., (2018) em ratos alimentados com a dieta RCS e por Abu-Elsaad & El-Karef (2017) em ratos que receberam dieta HCHF.

Como demonstrado na Tabela 3, o extrato de GB elevou o CT no grupo OGB e apresentou ausência de efeito sobre o TG. Para a fração de colesterol HDL tanto o grupo OPR quanto o grupo OGB demonstraram aumento respectivamente de 13,7% e 37,6%, sendo o último estatisticamente significativo. Crepaldi et al., (2018) demonstra redução do CT em ratos Wistar submetidos as mesmas condições experimentais.

Yang et al., (2021) relatam aumento de HDL em camundongos tratados com 50 mg/kg de extrato de GB, e sugerem que a administração de polissacarídeos de GB modulou notavelmente a razão HDL/LDL levando a efeitos positivos do tratamento em modificar a mobilização de colesterol e triglicerídeos do plasma para o fígado (Li et al., 2016; Wang et al., 2015). O HDL desempenha um papel importante no efluxo de triglicerídeos e colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde pode ser catabolizado durante a circulação (Yang et al., 2021), reduzindo desta forma a gordura abdominal. Ressalta-se que a gordura mesentérica no grupo OGB também encontrava-se significativamente reduzida.

O extrato de GB ao promover o aumento de HDL mantém o Índice Aterogênico sem diferenças significativas, embora tenha diminuído 6% no grupo OGB e 14,6% no grupo OPR.

### **3.2 Trânsito gastrointestinal e fenótipo de fezes**

Os resultados para o estudo de trânsito gastrointestinal e fenótipo de fezes estão apresentados na Tabela 4. O tempo de trânsito gastrointestinal não foi afetado diretamente pela dieta RCS. Observações semelhantes foram descritas por Kunz et al., (2019) e Beraldi et al., (2019) em ratos obesos por dieta HFD. O tratamento (grupo OGB) e a profilaxia (grupo OPR) com GB também não influenciaram esse parâmetro.

**Tabela 4:** Tempo de trânsito gastrointestinal (TTG) e fenótipo de fezes avaliado em ratos Wistar machos, alimentados com dieta padrão (CA), com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (CGB) e dieta rica em carboidratos simples (OA) com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (OGB) e dos 21 aos 130 dias (OPR).

	CA	CGB	OA	OGB	OPR
TTG (min) <sup>1</sup>	597,1 ± 112,3	619,2 ± 101,6	514,0 ± 133,5	550,5 ± 92,97	598,9 ± 65,60
Nº de pellets fecais <sup>1</sup>	38,53 ± 4,34	34,01 ± 4,29	20,86 ± 2,43 <sup>ab</sup>	23,14 ± 2,43 <sup>ab</sup>	20,50 ± 3,53 <sup>ab</sup>
Peso úmido (g) <sup>1</sup>	11,76 ± 1,08	10,47 ± 1,77	5,41 ± 1,15 <sup>ab</sup>	5,19 ± 0,51 <sup>ab</sup>	6,09 ± 0,49 <sup>ab</sup>
Peso seco (g) <sup>1</sup>	5,11 ± 0,39	4,91 ± 0,63	2,41 ± 0,32 <sup>ab</sup>	2,51 ± 0,31 <sup>ab</sup>	2,61 ± 0,38 <sup>ab</sup>
≠ peso úmido e seco (g) <sup>1</sup>	6,66 ± 0,77	5,56 ± 1,24 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,90 <sup>ab</sup>	2,63 ± 0,34 <sup>ab</sup>	3,48 ± 0,34 <sup>ab</sup>
Comprimento (cm) <sup>1</sup>	1,49 ± 0,05	1,47 ± 0,08	1,41 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,51 ± 0,06 <sup>cd</sup>
Diâmetro (cm) <sup>2</sup>	0,64 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,57 ± 0,04	0,57 ± 0,02	0,61 ± 0,02

Dados apresentados como média±desvio padrão. N=10 por grupo. <sup>1</sup>Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. <sup>2</sup>Análise de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. a p<0,05 vs CA; b p<0,05 vs CGB; c p<0,05 vs OA; d p<0,05 vs OGB;

A análise do fenótipo de fezes permite avaliar de forma macroscópica o comportamento do bolo fecal relacionado a motilidade intestinal, visto que, os pellets sólidos naturais são impulsionados a uma velocidade mais lenta do que o material viscoso ou líquido (Spencer et al., 2016). Não foi observada diferença macroscópica nos pellets de fezes entre os grupos. No momento da coleta a maioria dos pellets apresentava estrutura intacta e conteúdo de consistência sólida. Não foi identificada presença de fezes moles ou sanguinolentas.

A dieta RCS promoveu alteração no volume total de fezes, estimado pelo peso úmido dos pellets, com redução significativa para os animais obesos (OA) quando comparados ao grupo controle (CA). O mesmo padrão foi observado em modelos de indução de obesidade por dieta HFD em camundongos (Kunz et al., 2019).

A diferença entre o peso úmido e o peso seco, que caracteriza a quantidade de água presente nas fezes, também se mostrou reduzido nos animais obesos (OA), resultado também observado por Beraldi et al., (2019) com menor teor de água nas fezes de ratos obesos por dieta HFD. O comprimento dos pellets de fezes dos animais obesos (OA) foi estatisticamente menor quando comparados aos animais controle (CA) e não apresentou efeito sobre o diâmetro. O tratamento com GB por 60 dias (OGB) não teve ação aparente sobre o fenótipo de fezes. A profilaxia por 109 dias (OPR) aumentou de forma significativa apenas o comprimento dos pellets de fezes em relação aos grupos OA e OGB.

O consumo alimentar dos animais no mesmo período em que foi realizada a avaliação do fenótipo de fezes apresentou como média: 7,15 ± 0,48 g/100g no grupo CA; 6,39 ± 1,14 g/100g no grupo CGB; 5,03 ± 0,55<sup>ab</sup> g/100g no grupo OA; 6,32 ± 1,00<sup>c</sup> g/100g no grupo OGB e 6,29 ± 0,49 g/100g no grupo OPR. As letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente

significante, a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs CGB; c  $p < 0,05$  vs OA (Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's). Desta forma, a menor ingestão alimentar dos animais tratados com a dieta RCS nesse período, com diferença significativa no grupo OA quando comparado com CA e CGB, pode ser um dos fatores para a redução do volume das fezes.

É possível perceber que houve diminuição significativa no volume de fezes também dos grupos obesos que receberam extrato de GB (OGB e OPR), porém estes não tiveram diminuição significativa no consumo alimentar quando comparados aos grupos controle (CA). Isso pode ser explicado pela composição do extrato de GB que receberam. Os frutos de GB contêm diversas moléculas bioativas, principalmente polissacarídeos (Skenderidis et al., 2019), em 100 g de fruto de GB, 3,63 g são de fibras alimentares (Ilić et al., 2020). A dieta rica em polissacarídeos vegetais pode equilibrar as comunidades microbianas (Turnbaugh et al., 2009), estimulando o crescimento de bactérias com propriedades prebióticas (Zhu et al., 2020), sendo a biomassa bacteriana responsável por pelo menos 30% da matéria seca das fezes (Roberfroid, Gibson & Delzenne, 2009).

A ração comercial para roedores (Nuvilab, Curitiba, Brasil) contém 7 g de fibra alimentar a cada 100 g de ração (dados fornecidos pelo fabricante). No preparo da dieta RCS foi utilizada ração comercial para roedores (395 g) sendo acrescida de leite condensado (395 g), açúcar (83,8 g) e água (102,9 mL). Isso torna a dieta RCS pobre em fibras quando comparada a dieta padrão. Desta forma, a baixa quantidade de fibras na dieta RCS e a alta quantidade de carboidratos simples favorece a absorção e retenção de água no organismo, pelo efeito osmótico que os carboidratos possuem, contribuindo para a redução do peso seco das fezes.

Sendo assim, o aumento no comprimento dos pellets fecais dos animais do grupo OPR poderia ser justificado pela presença de fibras alimentares no extrato de GB ingerido, visto que mudanças na dieta podem modificar o conteúdo das fezes (Fathallah, Bouchard & de Parades, 2017).

### **3.3 Morfometria intestinal**

Independente do grupo experimental não foram detectadas diferenças significativas quanto ao comprimento total e largura do intestino grosso (colo proximal e colo distal) (Tabela 5). O intestino grosso apesar de menor atuação na absorção de nutrientes, desempenha papel importante na digestão, na absorção de água e eletrólitos, no trânsito de matéria fecal e na produção de vitaminas lipossolúveis (Levy et al, 2006). A parede intestinal

apresenta considerável plasticidade, e pode manifestar alterações e comportamento diferenciado nas túnicas em diferentes tipos de dietas, inclusive as que induzem a obesidade (Bertrand, 2013).

**Tabela 5.** Biometria do intestino grosso, espessura da parede, túnicas intestinais e índice de células caliciformes no colo proximal de ratos Wistar machos, alimentados com dieta padrão (CA), com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (CGB) e dieta rica em carboidratos simples (OA) com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (OGB) e dos 21 aos 130 dias (OPR).

	CA	CGB	OA	OGB	OPR
Comp. IG (cm) <sup>1</sup>	11,56 ± 1,42	13,15 ± 1,72	11,22 ± 1,32	10,90 ± 1,91 <sup>b</sup>	11,00 ± 1,41
Larg. IG (cm) <sup>2</sup>	1,62 ± 0,21	1,35 ± 0,18	1,42 ± 0,24	1,51 ± 0,25	1,46 ± 0,19
Comp. Colo proximal (cm) <sup>1</sup>	5,50 ± 1,18	6,22 ± 0,71	4,67 ± 0,75 <sup>b</sup>	4,80 ± 0,95 <sup>b</sup>	5,20 ± 0,67
Parede Total (µm) <sup>1</sup>	337,9 ± 41,15	355,3 ± 54,75	396,5 ± 69,45	409,4 ± 56,07	401,9 ± 74,27
T. Mucosa (µm) <sup>1</sup>	188,0 ± 22,61	202,4 ± 22,61	221,6 ± 48,07	238,7 ± 32,41	235,3 ± 36,36
T. Muscular (µm) <sup>1</sup>	150,0 ± 40,23	152,8 ± 45,56	164,8 ± 51,20	177,6 ± 34,85	171,0 ± 52,48
PAS <sup>+</sup> (%) <sup>1</sup>	21,65 ± 2,14	16,38 ± 1,43 <sup>a</sup>	19,55 ± 1,72 <sup>b</sup>	19,08 ± 2,39	22,55 ± 1,34 <sup>bcd</sup>

Dados apresentados como média±desvio padrão, n=7 por grupo. <sup>1</sup>Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. <sup>2</sup>Análise de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. a p<0,05 vs CA; b p<0,05 vs CGB; c p<0,05 vs OA, d p<0,05 vs OGB.

A dieta influenciou o comprimento do colo proximal com redução significativa no grupo obeso (OA) e obeso tratado com GB (OGB) (Tabela 5). Outros estudos revelam resultados semelhantes com indução de obesidade por diferentes dietas inclusive com redução na área do colo proximal e distal de camundongos (Beraldi et al., 2014). O grupo CGB não apresentou influência significativa do extrato de GB nesses parâmetros.

A morfologia do colo proximal no que se refere à organização de suas túnicas, mucosa, submucosa e muscular, foi mantida entre os grupos, como demonstrado na Tabela 5. Dentre os componentes da dieta o teor de proteínas é um dos elementos de grande influência sobre a dinâmica celular e conseqüente alterações na espessura da parede intestinal e suas túnicas. A redução da espessura da túnica mucosa de diferentes segmentos gastrointestinais de ratos é um resultado frequente em modelos de desnutrição proteica e/ou calórica (Natali, Miranda-Neto & Orsi, 2000). Com relação ao colo proximal, Hermes et al., (2008) verificaram redução na túnica mucosa, na profundidade das criptas e manutenção na espessura da parede total e túnica muscular em ratos desnutridos. Schoffen et al., (2005) também obtiveram redução significativa na espessura da túnica mucosa e conservação na espessura da túnica muscular no colo proximal de ratos idosos alimentados com dieta hipoproteica (8% de proteínas). A dieta RCS, utilizada nesse experimento, possui redução de 50% no teor de

proteínas quando comparada a dieta padrão para roedores, o que não foi suficiente para interferir na espessura das túnicas mensuradas.

O índice de células caliciformes produtoras de mucinas neutras (PAS<sup>+</sup>) não se mostrou significativamente diferente nos animais obesos quando comparados ao grupo controle, apesar de ser observada redução na ordem de 10%. O muco produzido por células caliciformes representa a linha de frente na defesa de bactérias patogênicas e são responsáveis por bloquear a penetração, fixação epitelial e translocação de bactérias para o tecido hospedeiro (Johansson & Hansson, 2016).

O tipo de dieta pode modificar a produção de mucinas (Sharma, 1995), o que implicaria em variações no número das células caliciformes. Truter et al., (2016) obtiveram redução de células caliciformes produtoras de mucinas neutras nas criptas do intestino grosso (colo proximal e distal) de ratos alimentados com dieta hipercalórica (HCD). O menor aporte de nutrientes também promoveu redução do número de células caliciformes no colo proximal em ratos (Schoffen et al., 2014).

A dieta HFD reduziu o número de células caliciformes no jejuno de ratos obesos (Scoaris et al., 2010), já em camundongos foi observada manutenção deste número no duodeno e jejuno e redução no íleo (Soares et al., 2015). Como a obesidade pode induzir inflamação no TGI, a redução no número de células caliciformes neutras é considerada uma resposta inflamatória em animais que recebem dieta com alto teor calórico (Deplancke & Gaskins, 2001; Frazier et al., 2011; Kim & Ho, 2010), o que não foi constatado de forma estatisticamente significativa em nosso estudo.

O tratamento com GB por 60 dias não interferiu nesse parâmetro, entretanto, a profilaxia com o extrato aumentou o número de células caliciformes neutras tornando-as equivalentes ao grupo CA, o que pode ser associado a um quadro de maior eficiência na barreira mucosa. Ding et al., (2021) observaram aumento no número de células caliciformes no colo de camundongos suplementados com 200 mg/kg de polissacarídeos isolados de GB durante 14 semanas.

O aumento no número de células caliciformes no grupo OPR, possivelmente está associado a presença de fibras alimentares no extrato de GB, administrado por 109 dias. As fibras quando adicionadas a dieta são capazes de modular a composição da microbiota, como um possível mecanismo de normalização da dinâmica das células do epitélio intestinal (Sharma, 1995).



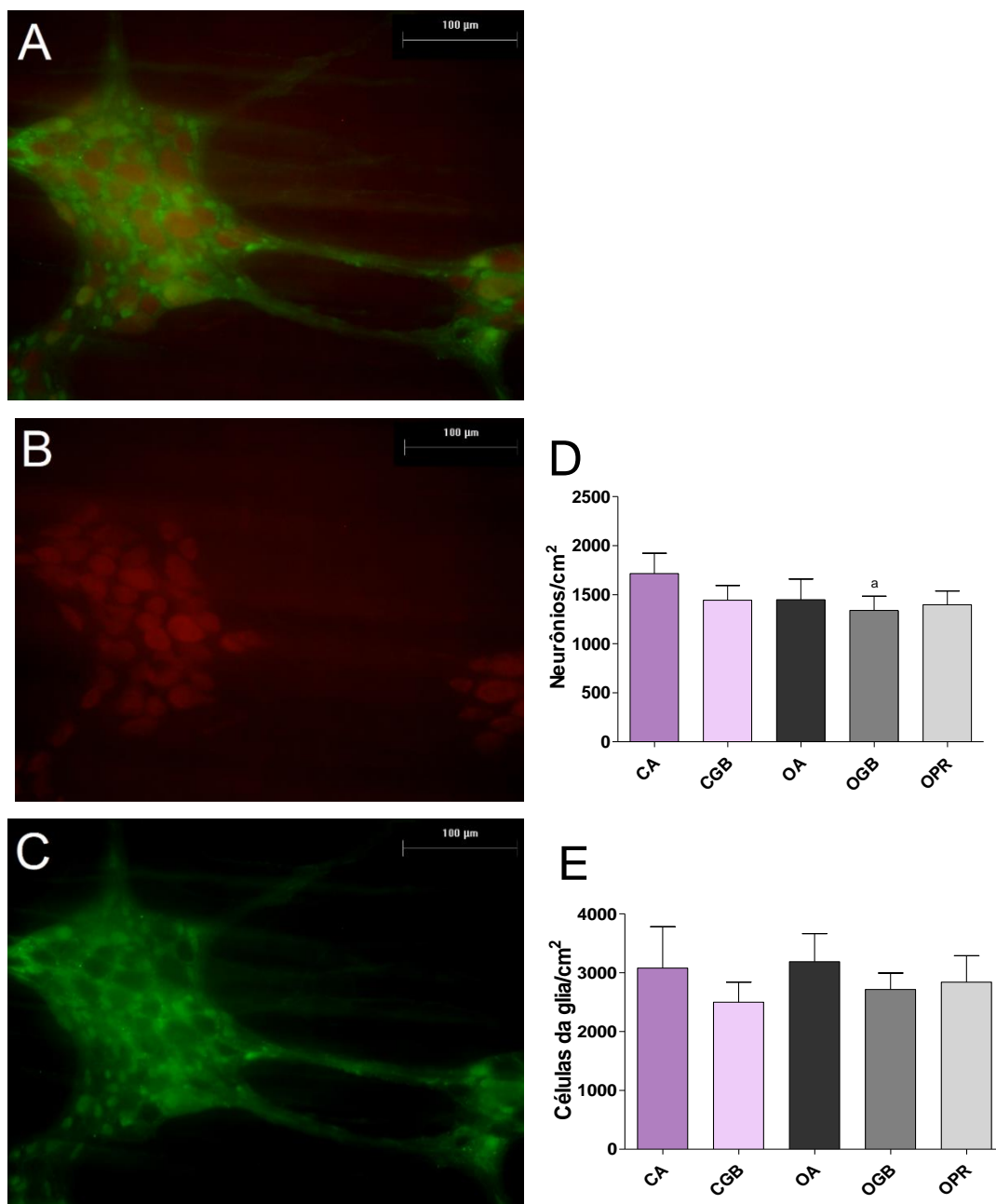
Houve redução significativa no número de células caliciformes (PAS+) do grupo controle tratado (CGB) quando comparado com o grupo controle (CA), divergindo dos resultados obtidos por Ding et al., (2021) que verificaram aumento no número de células caliciformes e também na expressão da mucina 2 (uma das principais proteínas que formam o muco) no colo de camundongos alimentados com dieta padrão para roedores tratados com 200 mg/kg de polissacarídeos isolados de GB. A diminuição no número das células caliciformes como efeito do extrato de GB na ausência de obesidade indica a necessidade de investigações que visem elucidar a questão dose efeito do extrato de GB em condições normais de dieta.

### **3.4 Inervação intrínseca do colo proximal**

A população de neurônios do plexo mioentérico (HuC/D<sup>+</sup>) no colo proximal encontrava-se organizada em gânglios de tamanhos variados, com corpos celulares de formatos arredondados e piriformes, envolvidos por numerosos corpos celulares gliais (S-100<sup>+</sup>), com poucos neurônios dispersos no espaço interganglionar (Figura 2). Arranjos semelhantes são observados em todo trato gastrointestinal, sendo relatados no estômago de ratos (De Sousa & Miranda Neto, 2009), no intestino delgado (Soares et al., 2015) e no colo proximal e distal de camundongos Swiss (Beraldi et al., 2019). Não foram detectadas diferenças nesse padrão entre os grupos experimentais.

#### *3.4.1 Quantificação de neurônios e células da glia*

Processos patológicos ou até mesmo a coleta dos tecidos pode causar uma alteração no tamanho do intestino, concentrando ou diluindo o número de neurônios presentes na área analisada (Gabella, 1989; Phillips & Powley, 2007). Assim, os dados para densidade neuronal e glial foram corrigidos (Cowen et al., 2000) de acordo com a área total do intestino grosso. Para tanto, foi atribuído como fator de correção padrão o grupo CA representado pelo valor 1. Em seguida, calculado quanto que, em média o intestino grosso dos animais dos demais grupos equivalem ao do grupo CA. Os valores calculados como fator de correção foram 0,92; 0,80; 0,67 e 0,77 respectivamente para os grupos CGB, OA, OGB e OPR.



**Figura 2** – Arranjo morfológico do plexo mioentérico e quantificação de neurônios e células da glia do colo proximal de ratos Wistar machos, alimentados com dieta padrão (CA), com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (CGB) e dieta rica em carboidratos simples (OA) com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (OGB) e dos 21 aos 130 dias (OPR). Sobreposição das imagens de imunohistoquímica (A) com marcação para neurônios por HuC/D<sup>+</sup> (B) e células glias S100<sup>+</sup> (C). Densidade média de neurônios mioentéricos (D) e de células glias (E). Dados apresentados como média±desvio padrão, n=6 por grupo, a p<0,05 vs CA one-way ANOVA/Tukey.

A densidade de neurônios mioentéricos (HuC/D) no colo proximal de ratos do grupo obeso controle (OA) não diferiu de forma significativa quando comparado ao grupo CA. O tratamento com extrato de GB (OGB) diferiu significativamente do grupo controle CA, de forma a reduzir a densidade neuronal e a profilaxia com GB (OPR) não se mostrou efetiva em alterar esse parâmetro (Figura 2D).

A literatura diverge com relação a densidade neuronal mioentérica (aumento, redução ou manutenção) em modelos de obesidade. Beraldi et al., (2014) não observaram diferença significativa quanto a população geral de neurônios no colo proximal em camundongos tratados com dieta HFD por oito semanas, entretanto em um período maior, 17 semanas, obtiveram redução na densidade de neurônios mioentéricos. Nezami et al., (2014) também constataram redução no número de neurônios nitrérgicos e colinérgicos no colo proximal de camundongos alimentados com dieta HFD, associado a um aumento significativo na apoptose de células neuronais.

No intestino delgado, Soares et al., (2015), obtiveram aumento significativo na densidade neuronal da população de neurônios imunorreativos para miosina-V (16%,  $p < 0,01$ ) e subpopulação imunorreativas para nNOS (28%,  $p < 0,01$ ) do íleo de camundongos alimentados com dieta HFD.

No processo de neurodegeneração entérica, diversos fatores são associados, tais como o estresse oxidativo (Voss et al., 2013), alterações na microbiota intestinal (Cani et al., 2007) ou inflamação associada à obesidade (Tehrani et al., 2012). A obesidade é uma doença crônica caracterizada por inflamação persistente de baixo grau que afeta a motilidade intestinal. Anormalidades motoras sugerem que a obesidade tem efeitos no SNE (Lakhan & Kirchgessner, 2011). Estudos relataram que a dieta HFD está diretamente relacionada a alteração na microbiota e aumento da permeabilidade intestinal deixando o organismo mais propenso a infecções (Sharkey, 2015).

A ausência de diferenças significativas na densidade neuronal mioentérica entre os grupos pode estar diretamente relacionado com a manutenção da espessura da túnica muscular. Essa relação já estabelecida em vários trabalhos, vai de encontro ao descrito por Gabella (1989), ao ressaltar que alterações no número e tamanho dos neurônios do plexo mioentérico estão associadas a variações na espessura da túnica muscular, tecido alvo responsável pela manutenção e plasticidade destes neurônios.

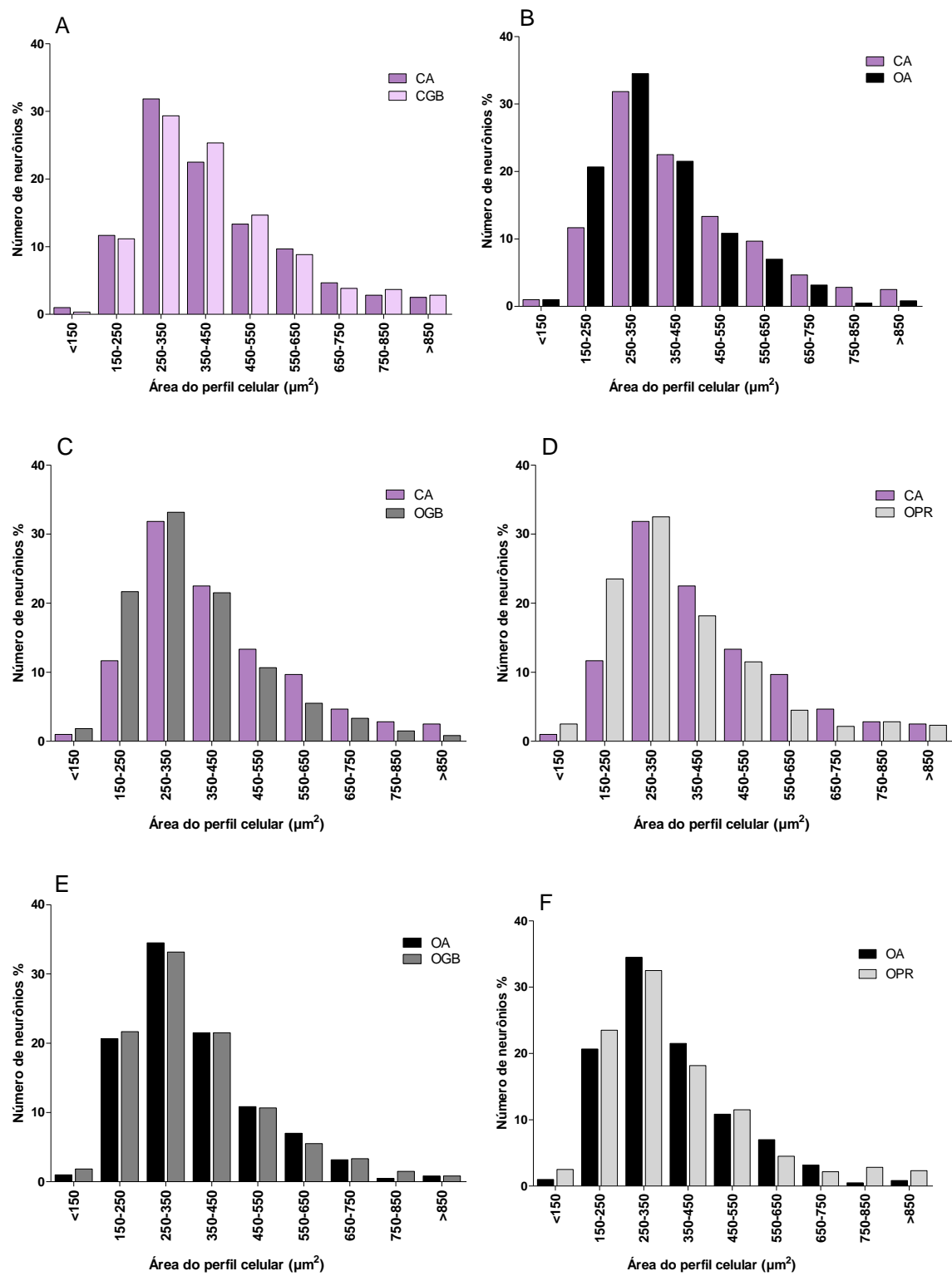
As células gliais são essenciais para a integridade e função gastrointestinal, orquestrando diversas funções na plasticidade do sistema digestório, incluindo um importante papel na regulação da neurotransmissão, da resposta imune e da motilidade, por exemplo (Sharkey, 2015).

Não foram obtidas diferenças significativas na quantificação de células da glia entre os grupos (Figura 3E), indicando ausência de efeito da dieta e/ou do tratamento. Estudos revelam que o número de células gliais entéricas pode ser influenciado tanto pela idade quanto pela

dieta, sugerindo que fatores ambientais são capazes de influenciar o número dessas células (McClain et al., 2014; Schoffen et al., 2005; Stenkamp-Strahm, 2013), o que não ocorreu em nosso modelo experimental, indicando ausência de efeito sobre o número de células (neurônios e glia) que compõem os gânglios mioentéricos.

#### 3.4.2 *Mensuração do perfil celular de neurônios*

A mensuração do perfil celular de neurônios, apresentou como média  $413,6 \pm 25,54 \mu\text{m}^2$  no grupo CA;  $421,4 \pm 27,11 \mu\text{m}^2$  no grupo CGB;  $362,6 \pm 32,70 \mu\text{m}^2$  no grupo OA;  $359,2 \pm 31,65 \mu\text{m}^2$  no grupo OGB e  $361,3 \pm 46,51 \mu\text{m}^2$  no grupo OPR, resultado este que não apresenta diferença significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's). Os neurônios mioentéricos exibem grande variabilidade de tamanho e forma e o uso de média não expressa todo o leque de variação nos tamanhos dos corpos celulares neuronais (Sousa, 2013). Devido a isso, os dados para mensuração neuronal foram convertidos em distribuições de frequência com intervalos de classes arbitrários de  $100 \mu\text{m}^2$ , sendo os neurônios considerados pequenos menores que  $350 \mu\text{m}^2$ , médios de  $350$  a  $650 \mu\text{m}^2$  e grandes maiores que  $650 \mu\text{m}^2$ . Os resultados foram representados em histogramas, como demonstrado na Figura 3.



**Figura 3** – Histograma de distribuição de frequência em função do tamanho de neurônios mioentéricos do colo proximal de ratos Wistar alimentados com dieta padrão (CA), com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (CGB) e dieta rica em carboidratos simples (OA) com suplementação de extrato de GB dos 70 aos 130 dias (OGB) e dos 21 aos 130 dias (OPR). CA x CGB  $p > 0,05$  (A); CA x OA  $p < 0,05$  (B); CA x OGB  $p < 0,05$  (C); CA x OPR  $p < 0,05$  (D); OA x OGB  $p > 0,05$  (E); OA x OPR  $p < 0,05$  (F). Teste de Qui-quadrado.

O grupo CA quando comparado ao grupo CGB não apresentou diferença significativa em relação a distribuição de frequência na área do perfil celular, ou seja, o tratamento com GB por 60 dias em ratos não obesos não alterou o tamanho das células neuronais.

Comparando o grupo CA com os grupos OA, OGB e OPR obtivemos diferença significativa, como demonstrado pelas Figuras 3B, 3C e 3D. Os animais obesos, pertencentes aos grupos OA, OGB e OPR tiveram uma quantidade maior de neurônios pequenos, quando comparados ao grupo CA, que teve uma quantidade maior de neurônios grandes. O tratamento com GB por 60 dias não apresentou diferença estatística, quando comparamos o grupo OA com OGB, porém, o tratamento profilático por 109 dias aumentou, de forma significativa, o número de neurônios grandes e diminuiu o número de neurônios médios em relação ao grupo OA.

Resultados semelhantes foram encontrados por Beraldi et al., (2019) no colo distal de camundongos Swiss alimentados com dieta HFD. Em outro estudo, os mesmos autores observaram um padrão divergente, com redução na área dos corpos celulares da população geral, da subpopulação nitrérgica e de neurônios imunorreativos para VIP no colo proximal e distal de camundongos alimentados com dieta HFD por 17 semanas (Beraldi et al., 2014).

A redução no tamanho neuronal pode ser consequência de distúrbios metabólicos e estruturais causados pelo excesso de ácidos graxos saturados presentes na dieta HFD (Soares et al., 2015). Estes distúrbios podem gerar disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, reduzindo a disponibilidade de substratos energéticos, levando a uma diminuição da atividade metabólica (Wang et al., 2015). Estes fatores podem contribuir com a alta prevalência de neurônios pequenos nos animais submetidos a dieta RCS uma vez que essa alimentação também possui um valor elevado de gordura quando comparada a dieta padrão para roedores.

Os estudos que encontramos em sua maioria são realizados com a dieta HFD que já é uma dieta padronizada e bem descrita na literatura. Sendo este, o primeiro estudo realizado com a dieta RCS a fim de avaliar seus efeitos na inervação intrínseca do colo proximal.

#### **4. CONCLUSÃO**

A dieta RCS teve eficiência obesogênica nos animais testados sem efeitos sobre a morfologia e morfometria da parede total e tûnicas do colo proximal. O tratamento com extrato de GB na dose de 250 mg/kg de peso corporal por 60 dias foi responsável por reduzir a massa corporal final, a massa da gordura mesentérica e elevar o nível plasmático de

colesterol HDL. Esse tratamento não influenciou os parâmetros morfométricos e a inervação intrínseca do colo proximal. A profilaxia com extrato GB por 109 dias reduziu o IMC, reestabeleceu o índice de células caliciformes no epitélio colônico e aumentou a incidência de neurônios grandes e redução no número de neurônios médios. A utilização do extrato de GB é uma alternativa promissora no controle da obesidade.

## 5. APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## 6. REFERÊNCIAS

Abu-Elsaad & N., El-Karef, A. (2017). The Falconoid Luteolin Mitigates the Myocardial Inflammatory Response Induced by High-Carbohydrate/High-Fat Diet in Wistar Rats. *Inflammation*, 41(1), 221–231. doi:10.1007/s10753-017-0680-8.

Aktar, R., Peiris, M., Fikree, A., Cibert-Goton, V., Walmsley, M., Tough, I.R., Watanabe, P., Araujo, E. J. A., Mohammed, S. D., Delalande, J. M., Bulmer, D. C., Scott, S. M., Cox, H. M., Voermans, N. C., Aziz, Q. & Blackshaw, L.A. (2018). The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-X regulates peripheral sensory and motor neurons. *The Journal of Physiology*. 596(17), 42374251. doi:10.1113/jp276300.

Anitha, M., Reichardt, F., Tabatabavakili, S., Nezami, B. G., Chassaing, B., Mwangi, S., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A. & Srinivasan, S. (2016). Intestinal dysbiosis contributes to the delayed gastrointestinal transit in high-fat diet fed mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology Hepatology*, 2(3), 328-339. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.12.008.

Amagase, H., & Farnsworth, R. N. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44(7), 1702-1717. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.027.

Amani, R. & Gill, T. (2013). Shiftworking, nutrition and obesity: implications for workforce health- a systematic review. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 22(4), 505-15. doi: 10.6133/apjcn.2013.22.4.11.

Anderson, J.W., Baird, P., Davis Jr, R.H., Ferreira, S., Knudtson, M., Koraym, A., Águas, V., Williams, C.L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188–205. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x

Barrett, K. E. (2015) *Fisiologia Gastrointestinal*. (2<sup>a</sup> ed.) McGraw-Hill: São Paulo, p336.

- Beraldi, E. J., Borges, S. C., Almeida, F. L. A., Santos, A., Saad, M. J. A. & Buttow, N. C. (2019). Colonic neuronal loss and delayed motility induced by high-fat diet occur independently of changes in the major groups of microbiota in Swiss mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 32(2), e13745. doi: 10.1111/nmo.13745.
- Beraldi, E. J., Soares, A., Borges, S. C., de Souza, A. C. da S., Natali, M. R. M., Bazotte, R. B. & Buttow, N. C. (2014). High-Fat Diet Promotes Neuronal Loss in the Myenteric Plexus of the Large Intestine in Mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(4), 841–849. doi:10.1007/s10620-014-3402-1.
- Bernaudo, F. S. R. & Rodrigues, T. C. (2013). Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 57(6), 397–405. doi:10.1590/s0004-27302013000600001.
- Bertrand, P.P. (2013). Obesity and plasticity: how your gut learns to deal with yours diet. *The Journal of Physiology*, 591: 4955. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264085.
- Bahia, L. & Araújo, D.V. (2014). Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista HUPE*, Rio de Janeiro. 13(1), 13-17. doi:10.12957/rhupe.2014.9793.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R. & Delzenne, N.M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11), 2374-83. doi: 10.1007/s00125-007-0791-0.
- Cheng, J.; Zhou, Z. W.; Sheng, H. P.; He, L. J.; Fã, X. W.; He, Z. X.; Sun, T.; Zhang, X.; Zhao, R. J; Gu, L.; Cao, C. & Zhou, S. F. (2015). An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 33–78. doi:10.2147/dddt.s72892.
- Costa, M. B. & Rosa, C. O. B. (2016). *Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos*. (2ª ed.), Rio de Janeiro: Rubio.
- Costa, M., Buffa, R., Furness, J. B. & Solcia, E. (1980). Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. *Histochemistry*, 65(2), 157–165. doi:10.1007/bf00493164.
- Cowen, T., Johnson, R. J. R., Soubeyre, V. & Santer, R. M. (2000). Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut*, 47(5), 653–660. doi:10.1136/gut.47.5.653.
- Crepaldi, L; Mariano, I. R.; Trondolil, A. N. P. C.; Moreno, F. N.; Piovan, S.; Formigoni, M.; Sanguero-Pagadigorria, C. L.; Godoi, V. A. F.; Brito, M. N. & Garcia, R. F. (2018). Goji Berry (*Lycium barbarum*) extract improves biometric, plasmatic and hepatic parameters of rats fed a high-carbohydrate diet. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 877-889. doi: 10.17265/2328-2150/2018.10.001.



- De Sousa, F. C. & de Miranda Neto, M. H. (2009). Morphometric and quantitative study of the myenteric neurons of the stomach of malnourished aging rats. *Nutritional Neuroscience*, 12(4), 167–174. doi:10.1179/147683009x423337.
- Deplancke, B. & Gaskins, H.R., (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 1131S–1141S. doi:10.1093/ajcn/73.6.1131S.
- Dharmani, P.; Srivastava, V.; Kissoon-Singh, V. & Chadee, K. (2008). Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*, 1(2), 123–135. doi:10.1159/000163037.
- Ding, Y., Chen, D., Yan, Y., Chen, G., Ran, L., Mi, J. Lu L., Zeng X. & Cao, Y. (2021). Effects of long-term consumption of polysaccharides from the fruit of *Lycium barbarum* on host's health. *Food Research International*, 139:109913. doi:10.1016/j.foodres.2020.109913.
- Fathallah, N., Bouchard, D. & de Parades, V. (2017). Les règles hygiéno-diététiques dans la constipation chronique de l'adulte: du fantasme à la réalité. *La Presse Médicale*, 46(1), 23-30. doi:10.1016/j.lpm.2016.03.019.
- Frazier, T.H., DiBaise, J.K. & McClain, C.J., (2011). Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-Induced inflammation, and liver injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35, 14S–20S. doi: 10.1177/0148607111413772.
- Gabella, G. (1989). Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology*, 96(6):1487-93. doi: 10.1016/0016-5085(89)90516-7.
- Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (2007). *Tratado de Histologia em Cores*. (3<sup>a</sup> ed.), Elsevier, p592.
- Guh, D.P.; Zhang, W.; Bansback, N.; Amarsi, Z.; Birmingham, C.L. & Anis, A.H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and metaanalysis. *BMC Public Health*, 9(88), 1-20. https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88.
- Henriques, G.S.; Helm, C.V. & Simeone, M.L.F. (2013). Comparação da glicemia de ratos feitos diabéticos por estreptozotocina e de ratos normais a partir da ingestão de dietas experimentais ricas em fibra alimentar de diferentes fontes. *Revista do Médico Residente*, 15(4), 258-271.
- Hermes, C., Azevedo, J.F. de, Araújo, E.J. de A. & Sant'Ana, D. de M.G. (2008). Intestinal Ascending Colon Morphometrics in Rats Submitted to Severe Protein Malnutrition. *International Journal of Morphology*, 26(1), 5-11. doi:10.4067/s0717-95022008000100001.
- Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. (2006). *Nature*, 444(7121), 860-7. doi: 10.1038/nature05485.
- Hu, F. B. (2013). Resolved: there is sufficient scientific evidence that decreasing sugar-sweetened beverage consumption will reduce the prevalence of obesity and obesity-related diseases. *Obesity Reviews*, 14(8), 606–619. doi:10.1111/obr.12040

- Ilić, T., Dodevska, M., Marčetić, M., Božić, D., Kodranov, I. & Vidović, B. (2020). Chemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Goji Berries Cultivated in Serbia. *Foods*, 9(11), 1614. doi:10.3390/foods9111614.
- Johansson, M. E. V., & G. C. Hansson. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews. Immunology*, (10):639–49. doi: 10.1038/nri.2016.88.
- Kierszenbaum, B. L. & Tres, L. L. (2012). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*, (3ª ed.), Elsevier.
- Kim, Y. S. & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5):319-30. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
- Kolotkin, R. L.; Ross, D.C.; Karl, D. K. & Williams, G. R. (2001). Development of a brief measure to assess quality of life in obesity. *Obesity Research*, 9(2),102–111. doi: 10.1038/oby.2001.13.
- Kulczynski, B. & Gramza-Michalowska, A. (2016). Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(2), 67–75. doi:10.1515/pjfn-2015-0040.
- Kunz, R.I., Capelassi, A.N., Alegre-Maller, A.C., Bonfleur, M.L., Ribeiro, L.F., Costa, R.M. & Natali, M.R. (2019). Sericina como tratamento da obesidade: efeitos morfofisiológicos em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica. *Einstein*, 18,1-9. doi:10.31744/einstein\_journal/2020AO4876.
- Laboisse, C., Jarry, A., Branka, J.E., Merlin, D., Bou-Hanna, C & Vallette, G. (1996). Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 55:259–264. doi: 10.1079/pns19960027.
- Lakhan, S. & Kirchgessner, A. (2011). Gut microbiota and sirtuins in obesity-related inflammation and bowel dysfunction. *Journal of Translational Medicine*, 9:202. doi:10.1186/1479-5876-9-202.
- Levy, M.N.; Koppen, B. M.; Stanton, B. A. (2006). *Fundamentos de Fisiologia*: Berne & Levy. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Li, W.; Li, Y.; Wang, Q. & Yang, Y. (2014). Crude Extracts from *Lycium barbarum* Suppress SREBP-1c Expression and Prevent Diet-Induced Fatty Liver through AMPK Activation. *BioMed research international*, 1-10. doi: 10.1155/2014/196198.
- Li X.; Guo J. & Ji K.; Zhang P. (2016). Bamboo shoot fiber prevents obesity in mice by modulating the gut microbiota, *Scientific Reports*, 6, 32953. doi:10.1038/srep32953.
- Li, X. L. & Zhou, A. G. (2007). Evaluation of the antioxidant effects of polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*. *Medicinal Chemistry Research*, 15(9), 471–482. doi:10.1007/s00044-007-9002-2.

- Li, X.M. (2007). Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 40(5):461–465. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.11.002.
- Li, X.M., Ma, Y.L. & Liu, X.J. (2007). Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice. *Journal of Ethnopharmacol.* 111(3):504–511. doi: 10.1016/j.jep.2006.12.024.
- Lima, D.C; Silveira, S.A.; Haibara, A.S. & Coimbra, C.C. (2008). The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metabolic Brain Disease*, 23(4), 361-73. doi: 10.1007/s11011-008-9101-x.
- Luo, Q., Cai, Y., Yan, J., Sun, M. & Corke, H. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sciences*. 76(2):137–149. doi: 10.1016/j.lfs.2004.04.056.
- Luo, Q., Yan, J. & Zhang, S. (2000). Isolation and purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and its antifatigue effect. *Wei Sheng Yan Jiu*. 29(2):115–117. Chinese.
- Mao, F., Xiao, B., Jiang, Z., Zhao, J., Huang, X. & Guo, J. (2011). Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Medical Oncology*. 28(1):121–126. doi: 10.1007/s12032-009-9415-5.
- Masci, A.; Carradori, S.; Casadei, M. A., Paolicelli, P., Petralito, S., Ragno, R. & Cesa, S. (2018). *Lycium barbarum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects. A review. *Food Chemistry*, 254, 377–389. doi:10.1016/j. foodchem.2018.01.176.
- McClain, J.L., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R.A., Leininger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V. & Gulbransen, B.D. (2014). Ca<sup>2+</sup> Responses in Enteric Glia are Mediated by Connexin-43 Hemichannels and Modulate Colonic Transit in Mice. *Gastroenterology*, 146 (2), 497-507. doi: 10.1053 / j.gastro.2013.10.061.
- Miao, Y., Xiao, B., Jiang, Z., Guo, Y., Mao, F., Zhao, J., Huang, X. & Guo, J. (2010) Growth inhibition and cell-cycle arrest of human gastric cancer cells by *Lycium barbarum* polysaccharide. *Medical Oncology*. 2010;27(3):785–790. doi: 10.1007/s12032-009-9286-9.
- Muzumdar, R.; Allison, D. B.; Huffman, D. M.; Ma, X.; Atzmon, G.; Einstein, F. H.; Fishman, S.; Poduval, A. D.; Mcvei, T.; Keith, S. W. & Barzilai, N. (2008). Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. *Aging Cell*, 7(3), 438–440. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00391.x.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H. & Orsi, A.M., (2000). Effect of hypoproteic diet supply on adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Acta Scientiarum Biological Science*, 22, 567 – 571.
- Nery, C. S; Pinheiro, I. L.; Muniz, G. S.; Vasconcelos, D. A. A.; França, S.P & Nascimento, E. (2011). Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 17(1), 49-55. doi:10.1590/S1517-86922011000100010.

- Nezami, B. G., Mwangi, S. M., Lee, J. E., Jeppsson, S., Anitha, M., Yarandi, S. S., Faris, A. B. & Srinivasan, S. (2014). MicroRNA 375 Mediates Palmitate-Induced Enteric Neuronal Damage and High-Fat Diet-Induced Delayed Intestinal Transit in Mice. *Gastroenterology*, 146(2), 473–483. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.053.
- Niu, A.J., Wu, J.M., Yu, D.H. & Wang, R. (2008). Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 42(5):447–449. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.02.003.
- Oliveira, A.; Cerqueira, M.; Souza, J. & Oliveira, C.A. (2003). Sobrepeso e obesidade infantil: influência de fatores biológicos e ambientais em Feira de Santana, BA. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 47, 144-150. doi:10.1590/S0004-27302003000200006.
- Phillips, R.J. & Powley, T.L. (2007). Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Autonomic Neuroscience*, 136(1–2):1-19. doi: 10.1016/j.autneu.2007.04.005.
- Qian, D., Ji, R. F., Gao, W. & Huang, L. Q. (2017). Advances in Research on Relationships among Lycium Species and Origin of Cultivated Lycium in China. *Journal of Chinese Materia Medica* 42: 3282-5. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20170814.006.
- Ribeiro, L.R.; Gutierrez, L.L.P.; Rabbo, M.P.S. (2009). *Práticas em fisiologia e fisiologia do exercício*. Porto Alegre: Sulina.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R. & Delzenne, N. (2009). Biochemistry of oligofructose, a non-digestible fructooligosaccharide: An approach to estimate its caloric value. *Revisões de Nutrição*, 51, 137–146. doi: 10.1111/J.1753-4887.1993.TB03090.X.
- Rocchetti, G.; Chioldelli, G.; Giuberti, G.; Ghisoni, S.; Baccolo, G.; Blasi, F.; Montesano, D.; Trevisan, M. & Lucini, L. (2018). UHPLC-ESI-QTOF-MS profile of polyphenols in goji berries (*Lycium barbarum*) and its dynamics during in vitro, gastrointestinal digestion and fermentation. *Journal of Functional Foods*, 40, 564–572. doi:10.1016/j.jff.2017.11.042.
- Rolls, B.J. (2000). The role of energy density in the overconsumption of fat. *The Journal of Nutrition*. 30(Suppl 2):268S-71S. doi: 10.1093/jn/130.2.268S.
- Rui, C., Yuxiang, L., Yinju, H., Qingluan, Z., Yang, W., Qipeng, Z., Hao, W., Lin, M., Juan, L., Chengjun, Z., Yuanxu, J., Yanrong, W., Xiuying, D., Wannian, Z., Tao, S & Jianqiang, Y. (2012). Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on neonatal rat primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Journal of Molecular Histology*. 43(5):535–542. doi: 10.1007/s10735-012-9420-4.
- Santos, D.H.P.; Portela, F.A.I. & Vieira, R.G.F. (2012). Importância do exercício físico na síndrome metabólica. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição, Emagrecimento*, 2(9), 296-302. Recuperado de <<http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/90>> Acesso em 03 de março de 2022.
- Santos, M. P.; Batistela, E.; Pereira, M. P.; Paula-Gomes, S.; Zanon, N. M.; Do Carmo Kettelhut, I.; Karatzafari C.; Andrade C. M. B; França S.A.; Baviera A. M. & Kawashita N.

- H. (2016). Higher Insulin Sensitivity in EDL Muscle of Rats Fed a Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Inhibits the Caspase-3 and Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Systems but Does Not Increase Protein Synthesis. *The journal of nutritional biochemistry*, 34: 89-98. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.04.008.
- Schoffen, J.P.F., Soares, A., de Freitas, P., Buttow, N.C. & Natali, M.R.M. (2005). Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Autonomic Neuroscience*, 122(1-2), 77-83. doi:10.1016/j.autneu.2005.08.005.
- Schoffen, J.P.F., Vicentini, F.A., Marcelino, C.G., Araújo, E.J.A., Pedrosa, M.M.D. & Natali, M.R.M. (2014). Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 86, 1833-47. Doi:10.1590/0001-3765201420140163.
- Scoaris, C.R., Rizo, G.V., Roldi, L.P., Moraes, S. M F., Proença, A. R. G, Peralta, R. M.& Natali, M. R. M. (2010). Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition*. 26(3), 312-320. doi: doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.012.
- Sharkey, K.A. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *The Journal of Clinical Investigation*. 125(3), 918-925. doi: 10.1172/JCI76303.
- Sharma, R. & Schumacher, U. (1995). Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 40:2532–9. doi:10.1007/BF02220438
- Shen, L. & Du, G. (2012). *Lycium barbarum* polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway. *Life Sciences*. 2012;91(9–10):353–357. doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.012.
- Skenderidis, P., Lampakis, D., Giavasis, I., Leontopoulos, S., Petrotos, K., Hadjichristodoulou, C. & Tsakalof, A. (2019). Chemical Properties, Fatty-Acid Composition, and Antioxidant Activity of Goji Berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) Fruits. *Antioxidants*, 8(3), 60. doi:10.3390/antiox8030060.
- Soares, A., Beraldi, E. J., Ferreira, P. E. B., Bazotte, R. B. & Buttow, N. C. (2015). Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC Gastroenterology*, 15(1). doi:10.1186/s12876-015-0228-z.
- Sousa, F. C. *Fumonisin e seus efeitos sobre o sistema nervoso entérico de Ratos Wistar*. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- Spencer, N.J., Jantar, P.G., Brookes, S.J. & Costa, M. (2016). Insights sobre os mecanismos subjacentes aos padrões motores do cólon. *The Journal of Physiology*, 594(15), 4099-4116. doi:10.1113/jp271919.
- Stenkamp-Strahm, C., Patterson, S., Boren, J., Gericke, M. & Balemba, O. (2013). High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. *Autonomic Neuroscience*, 177(2): 199-210. doi: 10.1016/j.autneu.2013.04.014.

Tavares, T. B.; Nunes, S. M. & Santos, M. O. (2010). Obesidade e qualidade de vida: revisão da literatura. *Revista Medica de Minas Gerais*, 20(3), 359-366. <<http://rmmg.org/artigo/detalhes/371>>.

Tehrani, A.B., Nezami, B.G., Gewirtz, A. & Srinivasan, S. (2012). Obesity and its associated disease: a role for microbiota? *Neurogastroenterol Motil*, 24(4), 305-11. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01895.x.

Truter, D., Strijdom, H., Everson, F., & Kotzé, S. H. (2017). Mucin secreting cells in the stomach and colon are altered by combination antiretroviral treatment in an obese rat model. *Acta Histochemica*, 119(2), 122–128. doi:10.1016/j.acthis.2016.11.014

Tungland, B. C. & Meyer, D. (2002). Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 90–109. doi:10.1111/j.1541-4337.2002.tb00009.x.

Turnbaugh, P.J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R. & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice, *Science Translational Medicine*, 1(6), 6ra14–6ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3000322.

Vicentini F.A.; Barbosa M.M.C.; Fortunato M.C.; Amado C. A. B; Comar J. F; Longhini R.; Mello J. C. P & Natali M. R. M. (2018). Treatment with *Trichilia catigua* ethylacetate fraction improves healing and reduces oxidative stress in TNBS-induced colitis in rats. *Biomed Pharmacother*, 107:194-202. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.160.

Voss, U., Sand, E., Olde, B. & Ekblad, E. (2013). A neuropatia entérica pode ser induzida por dieta rica em gordura in vivo e exposição ao ácido palmítico in vitro. *PLoS ONE*, 8(12), e81413. Doi:10.1371/journal.pone.0081413.

Wang, H., Tang, X., Cheserek, M. J., Shi, Y. & Le, G. (2015). Obesity prevention of synthetic polysaccharides in high-fat diet fed C57BL/6 mice, *Journal of Functional Foods*, 17, 563-574. doi:10.1016/j.jff.2015.06.012.

Wang, J., Hu, Y., Wang, D., Zhang, F., Zhao, X., Abula, S., Fã, Y. & Guo, L. (2010). *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;46(2):212–216. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2009.11.011.

Wang, Y.R., Zhao, H., Sheng, X.S., Gambino, P.E., Costelo, B. & Bojanowski, K. (2002). Protective effect of fructus lycii polysaccharides against time and hyperthermia-induced damage in cultures seminiferous epithelium. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3), 169-75. doi: 10.1016/s0378-8741(02)00169-1.

WHO - World Health Organization. (2022). *Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation*. (WHO technical report series; 894) Recuperado de <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>> Acesso em 03 de março de 2022. Geneva, Switzerland.

- Xing, J. & Chen, J. D. Z. (2004). Alterations of gastrointestinal motility in obesity. *Obesity Research*, 12(11), 1723-32. doi: 10.1038/oby.2004.213.
- Yang, Y., Chang, Y., Wu, Y., Liu, H.; Liu Q., Kang, Z., Wu, M., Yin, H. & Duan, J. (2021). A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: Structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 2074-2087. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.209.
- Yang, Y., Li, W., Li, Y., Wang, Q., Gao, L. & Zhao, J. (2014). Dietary *Lycium barbarum* polysaccharide induces Nrf2/ARE pathway and ameliorates insulin resistance induced by high-fat via activation of PI3K/AKT signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014:145641. doi: 10.1155/2014/145641.
- Youyuan, L.; Sheng, G.; Fang, Z.; Hui, Y.; Da-Wei, Q.; Han-Qing, W.; Ling, J. & Jin Ao, D. (2019). Comparison of functional components and antioxidant activity of *Lycium barbarum* L. fruits from different regions in china. *Molecules*, 24(12), 2228. doi:10.3390/molecules24122228.
- Yu, M.S., Leung, S.K., Lai, S.W., Che, C. M., Zee, S. Y., So, K. F., Yuen, W. H. & Chang, R. C. C. (2005) Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine *Lycium barbarum* against b-amyloid peptide neurotoxicity. *Experimental Gerontology*. 2005;40(8-9):716-727. doi: 10.1016/j.exger.2005.06.010.
- Zhao, R.; Li, Q. & Xiao, B. (2005). Effect of *Lycium barbarum* Polysaccharide on the Improvement of Insulin Resistance in NIDDM Rats. *Yakugaku Zasshi*, 125(12), 981-988. doi:10.1248/yakushi.125.981.
- Zhu, W., Zhou, S., Liu, J., McLean, R. J. C. & Chu, W. (2020). Prebiotic, immunostimulating and gut microbiota-modulating effects of *Lycium barbarum* polysaccharide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, 109591. doi:10.1016/j.biopha.2019.109591.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) SOBRE A MORFOFISIOLOGIA DO INTESTINO DELGADO E O METABOLISMO HEPÁTICO DE RATOS OBESOS", protocolada sob o CEUA nº 2072240419 (ID 002227), sob a responsabilidade de **Maria Montserrat Diaz Pedrosa e equipe; Isabela Ramos Mariano; Maria Raquel Marçal Natali; Rosângela Fernandes Garcia; Nayra Thais Delatorre Branquinho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 07/06/2019.

We certify that the proposal "Effects of Goji berry (*Lycium barbarum*) on the morphophysiology of the small intestine and the liver metabolism of obese rats", utilizing 100 Heterogenics rats (100 males), protocol number CEUA 2072240419 (ID 002227), under the responsibility of **Maria Montserrat Diaz Pedrosa and team; Isabela Ramos Mariano; Maria Raquel Marçal Natali; Rosângela Fernandes Garcia; Nayra Thais Delatorre Branquinho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 06/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [06/2019](#) a [03/2022](#)

Área: [Dfs-Fisiologia](#)

Origem: [Biotério Central da UEM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [21 a 22 dias](#)

N: [100](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [50 a 60 g](#)

Local do experimento: manutenção dos grupos durante o período de acompanhamento/tratamento (21 a 150 dias): biotério setorial do DFS (bloco H79 salas 119 e 123) experimentos de incubação de hepatócitos, dosagens, remoção de tecidos etc: laboratório de fisiologia (bloco H79 sala 112) experimentos in vivo: sala 114a bloco H79

Maringá, 10 de junho de 2019

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos  
Coordenadora da CEUA/UEM  
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares  
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM  
Universidade Estadual de Maringá





### TABLE OF CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.2
- **Impact Factor** p.2
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2 ● **Guide for Authors** p.5



ISSN: 1756-4646

### DESCRIPTION

**Announcement:** From January 2020, *Journal of Functional Foods* is an open access journal. Authors who publish in the Journal will be able to make their work immediately, permanently, and freely accessible.

*Journal of Functional Foods* continues with the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review. We give authors the possibility to publish their top-quality papers in a well-established leading journal in the food and nutrition fields. The Journal will keep its rigorous criteria to screen high impact research addressing relevant scientific topics and performed by sound methodologies.

Elsevier works with institutions and funding bodies to help authors publishing in our journals comply with open access policies. Find out [here](#) if your institute is part of an Elsevier agreement.

The *Journal of Functional Foods* aims to bring together the results of fundamental and applied research into healthy foods and biologically active food ingredients.

The Journal is centered in the specific area at the boundaries among food technology, nutrition and health welcoming papers having a good interdisciplinary approach. The Journal will cover the fields of plant bioactives; dietary fibre, probiotics; functional lipids; bioactive peptides; vitamins, minerals and botanicals and other dietary supplements. Nutritional and technological aspects related to the development of functional foods and beverages are of core interest to the journal. Experimental works dealing with food digestion, bioavailability of food bioactives and on the mechanisms by which foods and their components are able to modulate physiological parameters connected with disease prevention are of particular interest as well as those dealing with personalized nutrition and nutritional needs in pathological subjects.

Papers will cover topics such as new food bioactives; efficacy and safety of bioactive compounds, and other healthy food constituents using genomic, chemical and biochemical technologies. Characterisation of healthy foods and functional constituents with reference to product development; preparation of natural and synthetic ingredients for use in foods, effects of processing (including packaging and storage) on functionality and improvement of product quality; verification, quality control and traceability of natural and synthetic functional food ingredients and products will be considered.

The regulatory aspects of functional foods and related issues e.g. labelling, substantiation of health claims are also of interest together with those dealing with the value creation on the food chains based on the nutritional/healthy aspects.

The following papers are not within the scope of the Journal: Papers only dealing with food analysis and characterization of food structure and composition Papers focusing on the absorption kinetic of single bioactives Papers dealing with pure compounds having no connection with food

## AUDIENCE

---

Academics, scientists, nutraceutical and functional foods industries

## IMPACT FACTOR

---

2020: 4.451 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Directory of Open Access Journals (DOAJ)

ScienceDirect

Scirus

Scopus

Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Journal Citation Reports - Science Edition

Science Citation Index Expanded

## EDITORIAL BOARD

---

### ***Editor-in-Chief***

**Vincenzo Fogliano**, Wageningen University & Research Food Quality and Design Group, Wageningen, Netherlands  
Food biochemistry, Acrylamides, Functional foods, Food analysis & quality, Product development

**Mingfu Wang**, Shenzhen University Institute for Advanced Study, 518060, Shenzhen, China  
Nutrition, Food analysis, Polyphenols, Phytochemicals

### ***Associate Editors***

**Adele Costabile**, University of Roehampton Health Science Research Centre, London, United Kingdom  
Microbiota, Metabolism, Nutrition

**Linda Giblin**, Teagasc Food Research Centre Moorepark, Moorepark, Ireland  
Gut barrier, food digestion, bioactive peptides, bioavailability, satiety

**Dejian Huang**, National University of Singapore Department of Food Science and Technology, Singapore, Singapore  
Detection of bioactive molecules, Food chemistry, ,

**Mario Roberto Marostica Junior**, State University of Campinas Department of Food and Nutrition, CAMPINAS, Brazil

Nutrition

**Kazuo Miyashita**, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine Center for Regional Collaboration in Research and Education, Obihiro, Japan

Lipid oxidation, Carotenoids, Marine products, Omega-3 Fatty acids, Algae

**Kieran Tuohy**, Edmund Mach Foundation Agrarian Institute of San Michele, Trento, Italy

Nutrition, Food quality, Nutrigenomics, Microbiota, Metabolomics

**Li-Shu Wang**, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, United States of America

Cancer prevention, Nutrition, Clinical trials, Animal models

**Jianping Wu**, University of Alberta Department of Agricultural Food and Nutritional Science, Edmonton, Alberta, Canada

Food Biochemistry, Food Processing and Engineering, Peptides

#### ***Founding Editor***

**Fereidoon Shahidi**, Memorial University of Newfoundland Department of Biochemistry, St John's, Newfoundland and Labrador, Canada  
Functional Foods

#### ***Editorial Board Members***

**Maurizio Battino**, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy

mitochondria, berries, honey, olive oil, polyphenols

**Haixia Chen**, Tianjin University, School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin, China  
natural products; chemistry; bioactivities; drug discovery; functional food

**Wei Chen**, Zhejiang University Department of Food Science and Nutrition, Hangzhou, China

Antioxidants and Anthocyanins, Function food ingredients, Glucose and Lipid Metabolism, Gut microbiota, Apoptosis and Autophagy

**Zhen-Yu Chen**, Chinese University of Hong Kong, School of Life Sciences, Hong Kong, China

Functional Foods, Nutraceuticals, Lipids, Cholesterol, Microbiota, Fatty acids

**Antonio Cilla**, University of Valencia Faculty of Pharmacy, Burjassot, Spain  
functional foods, bioactive compounds, bioaccessibility, bioactivity, oxidative stress

**Alie De Boer**, Maastricht University, Food Claims Centre Venlo, Venlo, Netherlands

Health claims, Functional foods, Food information, EU food law, Risk assessment

**Cristina Delgado Andrade**, Institute of Science and Technology Food and Nutrition, Madrid, Spain

Health-diet interactions, Food processing contaminants, Bioavailability

**Richard J. FitzGerald**, University of Limerick Department of Biological Sciences, Limerick, Ireland

Food Proteins and Peptides, Enzymatic Hydrolysis, Bioactive Peptides, Functional Foods

**Tara Grauwet**, Katholieke Universiteit Leuven Faculty of Bioscience Engineering Laboratory of Food Technology, Heverlee, Belgium

Food digestion, Food structure

**Rita Hickey**, Teagasc Food Research Centre Moorepark, Moorepark, Ireland

Milk glycobiology and host-microbial interactions in the gastro-intestinal tract

**Amin Ismail**, Putra Malaysia University Faculty of Medicine and Health Sciences, Serdang, Malaysia

Protein, Underutilised plants, Food composition database

**Kazuki Kanazawa**, Kobe University Faculty of Agriculture Graduate School of Agricultural Science, Kobe, Japan

Reactive oxygen species (ROS), Lipid metabolism, Polyphenols, Flavonoids, Functional Food Factors

**Paola Lavermicocca**, Institute of Sciences of Food Production National Research Council, Bari, Italy

Food microbiology, Probiotic foods, Technological bacteria, Food quality, Food preservation

**Junsoo Lee**, Chungbuk National University, Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk, South Korea

Antioxidant, elicitation, cell signaling, phenolic acid

**Hua-Bin Li**, Sun Yat-Sen University School of Public Health, Guangzhou, China

Antioxidants, Medicinal Plants, Chromatography, Antioxidants, ,

**Shiming Li**, Huanggang Normal University, Huanggang, China

Functional food, Food bioactive ingredients, Biological activity of phytochemicals, Identification, characterization and analyses of bioactives in foods

**Ivan Luzardo-Ocampo**, National Autonomous University of Mexico Institute of Neurobiology, Queretaro, Mexico In vitro gastrointestinal digestion models, Inflammation, functional foods, polyphenols, food technology.

**Zeynep Madak-Erdogan**, University of Illinois Urbana-Champaign Department of Food Science and Human Nutrition, Urbana, Illinois, United States of America

Areas of expertise, Estrogen receptors, Breast Cancer, Menopause, Metabolic syndrome, Liver, System's biology, Genomics, Metabolomics, Transcriptomics, ,

**Sajid Maqsood**, United Arab Emirates University College of Food and Agriculture Department of Food Nutrition and Health, Al Ain, United Arab Emirates

Bioactive peptides, Polyphenols, Encapsulation, anti-diabetic markers, Functional foods.

**Elvira de Mejia**, University of Illinois Urbana-Champaign Department of Food Science and Human Nutrition, Urbana, Illinois, United States of America

Nutrition, Anthocyanins, Peptides

**Leticia Mora**, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Paterna, Spain

The development of mass spectrometry imaging methodologies for the quality and safety control of foods, The use of 'green' cost-effective innovative technologies for the protein treatment and extraction to be applied in different materials/foods and The revalorization of protein by-products though the production of hydrolysates and the development of their applications

**Sergej Ostojic**, University of Novi Sad Applied Bioenergetics Lab, Novi Sad, Serbia metabolism, nutraceuticals, bioenergetics, brain, nutrition

**Min-Hsiung Pan**, National Taiwan University Institute of Food Science and Technology, Taipei, Taiwan

Food chemistry, Health and Functional Foods, Disease Chemoprevention

**Glauca Maria Pastore**, State University of Campinas Faculty of Food Engineering, Campinas, São Paulo, Brazil Food Biochemistry, ,

**Jakub P. Piwowarski**, Medical University of Warsaw, Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy, Warszawa, Poland

Gut microbiota, metabolism, polyphenols, postbiotics, inflammation

**Shengmin Sang**, North Carolina Agricultural and Technical State University Center for Excellence in Post-Harvest Technologies, Kannapolis, North Carolina, United States of America

Metabolomics, Bioactive natural products, Bioactive components structure, ,

**Ken Sato**, Kyoto University Graduate School of Agriculture Division of Applied Biosciences, Kyoto, Japan

Food chemistry, food function, nutrition, peptides, protein chemistry

**Gautam Sethi**, National University of Singapore Department of Pharmacy, Singapore, Singapore Cancer, Chemoprevention, Natural Products, Functional Foods, Transcription Factor

**Ping Shao**, Zhejiang University of Technology, Department of Food Science and Technology, Hangzhou, China plant polysaccharide, functional food, food preservation.

**Veronika Somoza**, University of Vienna Department of Physiological Chemistry, Wien, Austria

Nutrition, Molecular food science, Food bioactives, Biochemistry, ,

**Chibuïke C. Udenigwe**, University of Ottawa Department of Chemistry and Biomolecular Sciences, Ottawa, Ontario, Canada

Food biochemistry, Food proteins, Bioactive peptides, Functional foods, Food nanotechnology

**Paola Vitaglione**, University of Napoli Federico II Department of Agriculture, Portici, Italy

Bioavailability of bioactive compounds, Food composition/structure, Food in disease prevention, ,

**Luis Vitetta**, The University of Sydney Faculty of Medicine and Health, Sydney, Australia

Intestinal microbiome, Functional nutrition / foods, Immunological function, Pro-oxidant signalling systems

**Paul de Vos**, Academic Medical Centre Groningen Department of Pathology and Medical Biology, Groningen, Netherlands

Dietary fibers, microbiota, intestinal immunology, diabetes

**Jianhua Xie**, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang, China Polysaccharide,

Dietary fiber, Bioactivities

**Gow-Chin Yen**, National Chung Hsing University Department of Food Science, Taichung, Taiwan

Functional foods, Nutraceuticals, Gut health, Microbiome, Disease prevention

**Xiaoxiong Zeng**, Nanjing Agricultural University College of Food Science and Technology, Nanjing, China

Dietary carbohydrates, Functional foods, Food nanotechnology, Gut microbiota

**Xiuhua Zhao**, Northeast Forestry University, College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Haerbin, China

Nanoparticles, Nanotechnology, Pharmacology, Functional component analysis, Biological macromolecules

**Zhongkai Zhou**, Tianjin University of Science and Technology College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin, China

Starch digestion, Carbohydrates, Microbiota, Polyphenols

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

*Journal of Functional Foods* follows the publishing practices by Elsevier. Please read carefully this guide and especially the "Essentials" at the end of the file before submitting your article.

#### *Types of paper*

Original research articles, review papers, perspective commentaries and opinion pieces, and rapid communications.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and which should not exceed 7,500 words. (excluding abstract, references and no more than 8 tables and illustrations)
2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words. (excluding abstract, references and no more than 8 tables and illustrations)
3. Perspective commentaries and opinion pieces - These should be concise, on hot topics and describing cutting-edge developments and technologies. They should not exceed 2000 words.
4. Rapid communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

**Graphical Reviews (GRs)** are a short, structured article type, which primarily use illustrative schematic summaries to convey only key concepts and novel ideas on a major research interest. GRs are designed to communicate information in a visually appealing representation of the current state of research on a specific topic. The overall message should be accessible to a broad scientific audience. GRs have a format of 3-5 (color) schemes/figures, ideally formatted as easily downloadable (PowerPoint) slides or the like, for use by readers for educational purposes. The text body should provide the reader with 'backbone' information and context, connecting the material presented in the figures. GRs cannot include unpublished data, new hypotheses, formal mathematical models, or meta-analysis. GR Article Structure: **Abstract:** up to 250 words **Body** (exclusive of figure legends): up to 2000 words 3-5 color schemes/figures summarizing the state of the specific topic covered. Each figure needs to be self-explanatory, including sufficient annotations to allow the readers to quickly grasp the content of the figure. Figure legends must be straight to the point, providing additional details which deepen the message of the figure itself. Please ensure that the reader, who may not be a direct expert in the field, can easily grasp the information provided. References: no more than 25 key articles that exemplify the most significant recent advances in the field. An example of GR is available [here](#).

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## BEFORE YOU BEGIN

### **Ethics in publishing**

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

### **Studies in humans and animals**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests

include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

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

### **Preprints**

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

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### **Author contributions**

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

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that

they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

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

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

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

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

#### *Language (usage and editing services)*

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

Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

### **Submission**

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

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in Editorial Manager, or a department.

### **Referees**

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The suggested reviewers should not come from the same institute, and should not all come from the same country.



## **Review Policy**

A peer review system involving two or more reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) present limited innovation and originality;
- 4) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 5) fragmentary and providing marginally incremental results; or 6) is poorly written.

## **PREPARATION**

### **Queries**

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final and although often disappointing it is not useful to send complaint letters to them. [More information on types of peer review](#).

#### *Use of word processing software*

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

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

### **Cover Letter**

Manuscript submissions must be accompanied by a cover letter. The corresponding author must state explicitly in a paragraph how the paper fits the [Aims and Scope](#) of the journal. The cover letter should also outline the significance and novelty of the work. Make clear in the letter to the editor the relevance of your paper to the area of the interest for JFF and to the specific research field. Authors are invited to briefly comment on their expertise in the subject matter and if appropriate, provide examples of their own related publications on this topic, explaining how the presented research relates to recently published (or submitted) work from the corresponding author's own research group.

Any statement regarding ethics, conflict of interest or duplicate submission should be included in the cover letter.

For Review type of articles, authors must also comment on related reviews published on the topic and how their manuscript provides relevant new insights and perspective beyond the available reviews.

Only submissions following these requests will be considered.

## **Article structure**

### *Subdivision - numbered sections*

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

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. The last sentence of the introduction should state the aim of the paper.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published on peer reviewed articles could be indicated by a reference and only relevant modifications should be described. Authors must provide all the details about their starting material, the source, the bioactive components responsible for the observed effects and changes in their content upon processing. Details of the ethical committees authorization should provide here when necessary. The last paragraph of the session should provide the details of the statistical methodology.

### *Results*

Results should be clear and concise. The figures to highlight the most relevant findings of the paper and do not replicate the same data both in figures and tables. Be sure the numbers and the letters are not too small and in the different colors are clearly distinguishable.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate for the type of article published.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of the Results and Discussion section. The conclusions should be supported by the study results and not be overstated.

### *Supplementary material/Appendices*

JFF do not encourage the use of supplementary material however when providing additional data is necessary to support paper results and favor the repeatability of the study you can upload this on a separate file.

Tables and figures should be given separate numbering: Table S1; Figure S1,...

### *Title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

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

### **Abstract**

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

### **Abstracts should not exceed 150 words.**

#### *Graphical abstract*

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

#### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 4 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

#### *Keywords*

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

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

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

#### *Formatting of funding sources*

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

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

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

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:  
This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Units*

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

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit "billion" is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Formulae must be typewritten, each on a separate line. Leave ample space around the formulae. Subscripts and superscripts should be clear. All symbols used in the formulae should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ . In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$  or  $\text{CO}_3^{--}$ . Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ . The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetraacetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### *Footnotes*

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

## Artwork

### *Electronic artwork General points*

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

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

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

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

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

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

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

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

#### **Please do not:**

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

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### *Figure captions*

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

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### *Citation in text*

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

### *Web references*

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

### *Data references*

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

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

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

### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-3215-4, copies of which may be [ordered online](#).

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, *163*, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, *19*, Article e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style* (4th ed.). Longman (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). E-Publishing Inc. Reference to a website:

Powertech Systems. (2015). *Lithium-ion vs lead-acid cost analysis*. Retrieved from <http://www.powertechsystems.eu/home/tech-corner/lithium-ion-vs-lead-acid-cost-analysis/>. Accessed January 6, 2016 Reference to a dataset:

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

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). *The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales*. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S. (2020, March 25). *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

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

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers

to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

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

#### *Data linking*

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

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

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

#### *Mendeley Data*

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

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data statement*

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

## AFTER ACCEPTANCE

### **Online proof correction**

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



If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

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

### Offprints

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

### ESSENTIALS TO FASTER HANDLING OF PAPERS

Please go carefully through the following points dealing with the main weak points often detectable in the current submission. The presentation language must be adequate for submission to JFF as an English journal. If not done adequately, the manuscript may be rejected without review. An English language editing service is available through Elsevier at:

<https://webshop.elsevier.com/languageediting-services/language-editing/> Avoid as much as possible

the use of acronyms in the abstract and limit their use also in the text. A graphical abstract is mandatory. Double-spaced text of your paper and number both the pages and lines; continuous line numbering is essential as it allows reviewers to easily locate their comments. Use 4 Highlights of maximum one line. Do not contact the editor-in-chief to ask if your manuscript is suitable for submission to the journal.

This is a decision you have to make. There is no pre-screening of papers outside the electronic system. All papers should be submitted via the electronic submission system. Authorship, include only those who have meaningfully contributed to the work; others could be placed in the acknowledgement section. For more information on authorship please refer to:

<https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#authorship> When suggesting 3 potential reviewers

for your paper, please note that: These should not be from your own institution and possibly no more than one be from your country. These must be expert in the field and not suggested for other reasons (such as collaborators of any sort). Please note that your reviewer suggestions will not always be used. Make clear in the letter to the editor the relevance of your paper to the area of the interest for JFF and to the specific research field. Novelty of the work and how it contributes to the knowledge in the field must be highlighted and explained both in the text of the manuscript and briefly in the cover letter. For review papers list in the cover letter the review recently published on related topic and explain why the submitted review is needed and differs from those already published. Proper review and citation of key papers in the field is essential and their absence causes paper rejection. Especially previous paper from your own group must be highlighted and when needed explain in the letter to the editor while the manuscript brings new results respect to those already provided in your previous paper. Do not split your research in two or more papers if this is not absolutely necessary. JFF rejects papers merely reporting side data from other studies.

Credit must be given to prior work explicitly or else quoting of sentences, paragraphs or tables without citation is prohibited and results in rejection of papers. It should be noted that all manuscripts are screened through anti-plagiarism software, and excessive reproduction of previously

published text will result in rejection of manuscripts without review. Further information can be obtained from: <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#writing-an-article> Submission to more than one journal is a very serious breach of publication ethics and such papers will be rejected, as would be use of other authors' work or even your own without reference citation. Further information can be obtained from: <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#writing-an-article> When using human or animal subjects, protocols as well as permission details must be provided. Further information can be found at: <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#conducting-research> For full papers the usual length is 7500 words (excluding references) with no more than 8 illustrations (tables plus figures). For short communication, 2500 words (excluding references) and a maximum of 4 illustrations (tables plus figures) is permitted. For review articles, it is best to keep them at 10,000-12,000 (excluding references) words. The usual number of references for full papers is about 40, for short communication 20-25 and for reviews may vary but usually up to 150. All tables, figures should be understandable without reference to the text and be able to stand alone; abbreviations must therefore be defined in table headings / footnotes and figure captions. Abbreviations should also be fully defined on first use in the abstract and the main text. The style of the Journal of Functional Foods for referencing, both in the text and at the end must be followed. Please avoid using words that are not usually used or abbreviations that are confusing. Authors must define the starting materials and details of bioactives responsible for the observed effects, both by identifying and quantifying them. Structure-activity relationships discussion is essential in most cases. In case you are asked to revise your manuscript prepare the rebuttal in the point to point" form writing your answer below the question raised by Editors and reviewers and indicating which part of the manuscript was modified when necessary. In the revised version all the modifications respect to the original submission must be highlighted The editor-in-chief or associate editors should not be contacted for purposes of the review process or otherwise unless there is a special circumstance. Problems associated with submission and technical issues should be addressed to Elsevier's staff For retrieving of password and other related issues such as your Elsevier consolidated account, you also need to contact the Elsevier [Publishing Support Center](#) and not the editors. The review process takes usually between 30 and 60 days. It can be delayed because it is quite challenging to find good reviewers. Before complaining ask yourself how many times you decline or even do not reply when you are requested to peer review a paper "

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