

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Rutiane Ullmann Thoen

**EFEITOS DA INGESTÃO DE REFRIGERANTE CALÓRICO E NÃO CALÓRICO
SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR E PARÂMETROS MORFOLÓGICOS EM
RATOS SUBMETIDOS A DIETA DE CAFETERIA**

Porto Alegre, 2015.

Rutiane Ullmann Thoen

**EFEITOS DA INGESTÃO DE REFRIGERANTE CALÓRICO E NÃO CALÓRICO
SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR E PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE
RATOS WISTAR SUBMETIDOS A DIETA DE CAFETERIA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Curso de Nutrição da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do
Título de Bacharel em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Martine Elisabeth Kienzle Hagen

Porto Alegre, 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

Ullmann Thoen, Rutiane

EFEITOS DA INGESTÃO DE REFRIGERANTE CALÓRICO E NÃO
CALÓRICO SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR E PARÂMETROS
MORFOLÓGICOS EM RATOS SUBMETIDOS A DIETA DE CAFETERIA
/ Rutiane Ullmann Thoen. -- 2015.
64 f.

Orientadora: Martine Elisabeth Kienzle Hagen.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. obesidade . 2. dieta de cafeteria. 3.
refrigerante. I. Elisabeth Kienzle Hagen, Martine ,
orient. II. Título.

Rutiane Ullmann Thoen

**EFEITOS DA INGESTÃO DE REFRIGERANTE CALÓRICO E NÃO CALÓRICO
SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR E PARÂMETROS MORFOLÓGICOS EM
RATOS SUBMETIDOS A DIETA DE CAFETERIA**

**Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para a obtenção do Título de Bacharel em
Nutrição.**

Porto Alegre, 08 de junho de 2015.

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso, elaborado por Rutiane Ullmann Thoen, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

Profª. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro - UFRGS

Profª. MSc Sônia Alscher - PUCRS

Profª. Dra. Martine Elisabeth Kienzle Hagen – orientadora – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ernani Thoen e Edeltraud Ullmann Thoen e ao meu irmão querido Isaías pelo amor, apoio e compreensão durante minha trajetória, por me guiarem ao melhor caminho, não me deixarem desistir e me ajudarem a ser cada vez mais uma pessoa melhor.

Ao meu marido, Gabriel Bões Lazzaretti, por ter paciência em momentos difíceis e por me apoiar nesta importante etapa da minha vida. E por sempre querer e pensar no meu bem-estar.

À minha orientadora, nutricionista Martine Elisabeth Kienzle Hagen, agradeço pelos ensinamentos durante o período de graduação, pela amizade, paciência e confiança depositadas em mim. És uma pessoa que admiro muito como profissional e como pessoa.

A todos os colaboradores do projeto, que foram fundamentais em todas as etapas. Em especial à colega, colaboradora e amiga Vanessa Giacomeli pelas trocas de conhecimentos e companhia nos últimos anos.

Agradeço a todas as colegas e amigas pela ajuda e apoio nos momentos difíceis.

Por fim, à Universidade, por proporcionar o desenvolvimento do conhecimento e por apresentar um novo mundo.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da ingestão de refrigerante calórico e não calórico sobre o consumo alimentar e parâmetros morfológicos de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria. Foram utilizados ratos Wistar machos divididos em seis grupos: CON, RC, RNC, DC, DC+ RC e DC+RNC. O grupo RC apresentou redução de 30% na ingestão de alimentos sólidos e de 29% de proteínas, comparado com o CON e RNC. Porém, o grupo RC consumiu três vezes mais líquidos que o CON e a ingestão de energia total e de carboidratos foram de 17% e 33%, respectivamente, superiores aos grupos CON e RNC. Os grupos que receberam dieta de cafeteria consumiram 4,5 vezes mais lipídeos comparados aos grupos CON, RC e RNC e o consumo de proteínas foi em torno de 50% menor. A ingestão de energia foi maior nos grupos DC, DC+RC e DC+RNC (32%, 71% e 34%) em relação ao CON, RC e RNC, respectivamente. Os grupos DC, DC+RC e DC+RNC consumiram três vezes mais sódio total comparado aos controles e apresentaram maior ganho de peso e índice lipossomático. Concluiu-se que o refrigerante reduziu o consumo de alimentos sólidos, a dieta de cafeteria aumentou a ingestão de alimentos e ambos influenciaram negativamente a qualidade da alimentação, refletindo no aumento do ganho de peso e de gordura visceral, podendo aumentar os riscos para o desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis. No entanto, o consumo de refrigerante não calórico minimizou o acúmulo da gordura visceral no DC+RNC, sugerindo o refrigerante não calórico como auxiliar no tratamento da obesidade.

Palavras-chave: dieta de cafeteria, obesidade, sobrepeso, refrigerante, ganho de peso.

ABSTRACT

This study provides an analysis of the effect of caloric and non-caloric soft drinks intake on food consumption and morphometric parameters of Wistar rats fed with cafeteria diet. The male Wistar rats were divided into six groups: CON, RC, RNC, DC, DC+ RC and DC+RNC. The RC group presented a 30% reduction in the intake of solid foods and 29% protein in relation to CON and RNC. However, the RC group consumed three times more liquids than the CON group and the total intake of energy and carbohydrates was 17% and 33% respectively, higher than the CON and the RNC groups. The groups that received cafeteria diet consumed 4.5 times more lipids compared to the CON, RC and RNC groups and the consumption of protein was around 50% lower. The energy intake was higher in the DC, DC+RC and DC+RNC groups (32%, 71% and 34%) compared to the CON, RC and RNC, respectively. The Groups DC, DC+RC e DC+RNC consumed three times more total sodium when compared to controls and presented a higher weight gain and liposomal index. Soft drinks intake has reduced the consumption of solid food, cafeteria diet increased food intake and both had a negative influence on the quality of food, resulting in increased weight gain and visceral fat, which may increase the risk of developing DCNT. However, the consumption of non-caloric soft drinks has minimized the accumulation of visceral fat in the DC + RNC, suggesting that non-caloric soft drinks can be helpful in the treatment of obesity.

Keywords: cafeteria diet, obesity, soft drink, food consumption.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1. Composição nutricional da Ração Padrão Nuvilab CR-1®	29
Tabela 2. Composição nutricional da Dieta de Cafeteria.....	30
Tabela 3. Valores nutricionais de Coca-cola® tradicional e Coca-cola® zero.....	31
Tabela 4. Consumo médio de nutrientes das 12 semanas.....	51

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figura 1. Consumo de Alimentos Sólidos	46
Figura 2. Consumo de Líquidos.....	47
Figura 3. Consumo de Energia	48
Figura 4. Ganho de Peso Corporal.....	49
Figura 5. Índice Lipossomático	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CON – Grupo controle

DC – Grupo dieta de cafeteria

DC+RC – Grupo dieta de cafeteria e refrigerante calórico

DC+RNC – Grupo dieta de cafeteria e refrigerante não calórico

DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis

DM2 – Diabetes Mellitus tipo dois

EUA – Estados Unidos da América

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IMC- Índice de Massa Corporal

OMS- Organização Mundial da Saúde

PNS – Pesquisa Nacional de Saúde

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar

RC – Grupo refrigerante calórico

RNC- Grupo refrigerante não calórico

SM – Síndrome Metabólica

UEA – Unidade Experimental Animal

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
$>$	Maior
$<$	Menor
g	Gramas
kcal	Quilocalorias
KJ	Quilojoule

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.1 MUDANÇA NO PADRÃO ALIMENTAR	12
1.2 INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE REFRIGERANTE NA INGESTÃO DE ALIMENTOS SÓLIDOS	14
1.3 INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE REFRIGERANTE NO PESO E NA GORDURA INTRA- ABDOMINAL	16
1.4 DIETA DE CAFETERIA E SÍNDROME METABÓLICA	17
2. HIPÓTESE.....	17
3. JUSTIFICATIVA	18
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. OBJETIVO GERAL.....	18
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. REFERÊNCIAS.....	20
6. ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO À BRITISH JOURNAL OF NUTRITION ...	24
ANEXO 1. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA BRITISH JOURNAL OF NUTRITION	52

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Mudança no padrão alimentar

Importantes modificações no padrão alimentar humano surgiram nas últimas décadas, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, a China, o México, entre outros. Essas modificações são caracterizadas pelo aumento na ingestão de alimentos industrializados, ricos em gordura e sacarose (POPKIN, 2001; POPKIN, 2004; RIVERA, et al., 2004). Simultaneamente a essas alterações no comportamento alimentar, encontra-se maior prevalência de sobrepeso e obesidade (RIVERA, et al., 2004), que são definidos como acúmulo de gordura anormal ou excessivo e que podem prejudicar a saúde (WHO, 2007). Em 2008, quase um quarto dos adultos (24% dos homens e 25% das mulheres com idade de 16 anos ou mais) na Inglaterra foi classificado como obeso (IMC 30 kg/m² ou maior) (NHSIC, 2010), enquanto no Brasil, 13,9% dos adultos são obesos (BRASIL, 2010a). A obesidade e o excesso de tecido adiposo estão intimamente associados a doenças cardiovasculares, dislipidemia, esteatose hepática, diabete mellitus, resistência à insulina, asma, artrite, além de outros distúrbios endócrinos (DBO – Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009-2010; MOKDAD, 2003), especialmente quando associada à deposição visceral de gordura (DESPRÉS et al., 2008; ROSINI et al, 2012; VOLTERA et al., 2008).

O aumento no número de casos de obesidade parece ser o resultado de mudanças na ingestão de alimentos, hábitos alimentares e diminuição da atividade física. Dados recentes indicam que a indústria alimentar aumentou gradativamente o tamanho das porções dos alimentos (YOUNG et al., 2002). Este aumento, juntamente com um maior consumo de alimentos e maior ingestão de energia, desenvolve o acúmulo de gordura corporal (NIELSEN et al., 2004). Além disso, alguns autores sugerem que a epidemia da obesidade, observada principalmente nos EUA, pode ter sido o resultado da excessiva ingestão de refrigerante (MALIK et al., 2010).

O consumo frequente de refeições tipo *fast food*, lanches processados e industrializados, doces e alimentos com alto teor calórico que possuem excesso de gordura e sacarose e baixa concentração de fibras são comportamentos que promovem a obesidade (KANT et al., 2006; PIERNAS et al., 2010; YOUNG et al., 2002). Além disso, em comparação com indivíduos não obesos, as pessoas obesas tendem a seguir dietas com elevado teor de calorias e de gordura (SATIJA et al., 2012). Os alimentos palatáveis ricos em

gordura saturada (MEMISOGLU et al., 2003) e carboidratos simples (MARTINEZ et al., 2003) são alimentos de baixa qualidade nutricional (HILL et al., 1999).

A Pesquisa Nacional de Saúde – PNS (IBGE, 2013) investigou os hábitos de consumo alimentar por meio de indicadores marcadores de padrões saudáveis e não saudáveis. São considerados marcadores de padrão saudável de alimentação o consumo diário de frutas, legumes e verduras e o consumo regular de feijão. O consumo recomendado de frutas e hortaliças foi investigado por meio da frequência semanal de consumo de verduras e legumes nas refeições e de frutas ou de sucos de frutas. No Brasil, entre indivíduos maiores de 18 anos, o consumo recomendado de frutas e hortaliças atingiu somente 37,3% da população. As mulheres consumiram mais que os homens, 39,4% e 34,8% respectivamente. Na mesma pesquisa, foi identificado o consumo regular de refrigerantes ou sucos artificiais, considerando pelo menos cinco dias por semana. Os resultados mostraram que, no Brasil, quase $\frac{1}{4}$ (23,4%) das pessoas de 18 anos ou mais consomem regularmente refrigerantes, sendo o hábito mais frequente entre homens (26,6%) do que entre mulheres (20,5%).

A Organização Mundial da Saúde - OMS (World Health Organization - WHO, 2015) recomenda a ingestão diária de pelo menos 400 gramas, equivalente ao consumo de cinco porções diárias desses alimentos, para a prevenção de doenças crônicas como doenças cardíacas, câncer, diabetes e obesidade.

A ingestão excessiva de bebidas açucaradas como o refrigerante pode contribuir para o aumento da epidemia de obesidade, alterando o padrão de alimentação e promovendo o ganho de peso (LINDQVIST et al., 2008; MALIK et al., 2010) e está relacionada ao risco de incidência de síndrome metabólica (SM) (NETTLETON et al., 2009). Assim também, dados epidemiológicos relacionam a ingestão de refrigerantes como contribuindo para a obesidade e problemas de saúde relacionados (VARTANIAN et al., 2007; MALIK. et al., 2010), como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a SM (BRAY, 2010; VARTANIAN, et al., 2007; HOSTMARK, 2010; MALIK, et al., 2010). Entretanto, tais estudos apresentam limitações, pois não é possível estabelecer relação de causa e efeito.

Um estudo realizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (ROMBALDI et al., 2011), verificou que a frequência do consumo de refrigerante não dietético foi maior entre os homens, os fumantes e os que comem lanches semanalmente, mas não houve diferença significativa relativa a idade, nível socioeconômico e raça. Também não foi encontrada associação entre excesso de peso e consumo de refrigerante não dietético. Já em uma revisão sistemática (MALIK et al., 2006), foi encontrada a associação positiva entre maior consumo de bebidas açucaradas e ganho de peso e obesidade em crianças e adultos. Assim como uma

metanálise de 88 estudos (VARTANIAN et al., 2007) encontrou correlação entre a ingestão de refrigerantes e o aumento da ingestão de energia corporal.

Os refrigerantes não calóricos, por outro lado, representam uma parcela menor das bebidas ingeridas em alguns países. Aqueles que relataram beber refrigerantes não calóricos ingeriram porções semelhantes às consumidas pelos que relataram ingerir refrigerantes calóricos. Nos EUA, o número de indivíduos que ingerem produtos adoçados com edulcorantes aumentou mais que o dobro no período de 1987-2000 (SWITHERS et al., 2008). Estudos que analisaram o período de 2003-2004 indicaram que 15,1% de todos os norte-americanos consumiam alimentos ou bebidas adoçadas com edulcorantes (MATTESS, et al., 2009) enquanto a prevalência de ingestão de refrigerantes não calóricos no Brasil é de aproximadamente 1,6% (BRASIL, 2011). Um levantamento feito em 2012 com adultos norte-americanos, realizado pelo *International Food Information Council Foundation*, relata que muitos indivíduos consomem refrigerantes não calóricos por estes serem considerados uma opção para diabéticos, para reduzir o teor calórico dos alimentos e para controlar ou perder peso (GARDNER et al., 2012).

1.2. **Influência do consumo de refrigerante na ingestão de alimentos sólidos**

Em estudos realizados com animais, foi evidenciada a redução da ingestão de alimentos sólidos durante a exposição a refrigerantes calóricos (MILEI et al., 2011; CONTRERAS-GARCÍA et al., 2000; BELPOGGI et al., 2006; GOULARTE et al., 2012) e outras bebidas adoçadas com sacarose (LINDVIST et al., 2005; LINDQVIST et al., 2008; SWITHERS, et al., 2008). Apesar de haver uma redução na ingestão de alimentos sólidos pelos animais, foi observado um aumento na ingestão energética total, devido principalmente a uma maior ingestão de refrigerante (MILEI et al., 2011; CONTRERAS-GARCÍA et al., 2000). Animais com acesso *ad libitum* a refrigerantes calóricos apresentaram redução da ingestão energética de alimentos sólidos (ração padrão e dieta de cafeteria) como demonstrado em alguns estudo em que a ingestão de refrigerante calórico por ratos contribuiu tanto para a redução da ingestão de ração padrão quanto para os alimentos sólidos da dieta de cafeteria (CONY et al, 2012; GOULARTE et al., 2012), sendo esta última considerada altamente palatável. No entanto, em uma pesquisa envolvendo um grupo de 44 mulheres que receberam bebidas calóricas (leite com 1% de gordura, suco de fruta e refrigerante de cola calórico) ou não calóricas (refrigerante de cola não calórico e água) para ingerir simultaneamente com uma única refeição, um almoço *ad libitum*, por seis semanas, não foi

observada diferença na ingestão de alimentos sólidos, a única diferença foi o aumento da ingestão energética, resultado do conteúdo de energia das bebidas (DELLA VALLE et al., 2005).

Entre os compostos presentes nos refrigerantes não calóricos e que parecem afetar a saciedade estão os edulcorantes, um grupo de substâncias que produzem sabor doce e que contêm poucas calorias ou nenhuma (GARDNER et al., 2012). A intensidade do sabor doce dos edulcorantes é maior que a encontrada em adoçantes calóricos como a sacarose e o xarope de milho de alta frutose. Os principais edulcorantes utilizados como adoçantes em refrigerantes não calóricos e alimentos são o aspartame, o acesulfame de potássio, a sucralose e a sacarina (GARDNER et al., 2012). A relação entre a ingestão de edulcorante e o apetite é controversa. Algumas revisões de literatura sugerem aumento no apetite em indivíduos que foram submetidos à exposição aguda a edulcorantes em produtos contendo pouca ou nenhuma energia; porém, outros sugerem não haver alteração no apetite quando indivíduos são expostos a produtos adoçados com edulcorantes se comparados com produtos adoçados com sacarose (MATTEI, et al., 2009). Em experimentos realizados com animais, Milei e colaboradores (2011) não observaram alteração na ingestão de alimentos e na ingestão energética total em animais tratados com refrigerante não calórico se comparados aos animais tratados com água. Por outro lado, Swithers e Davidson (2007) identificaram aumento na ingestão energética total dos animais tratados com uma bebida não calórica.

Pesquisas sobre os efeitos da ingestão de refrigerante nos hábitos alimentares são recentes (YAMADA et al., 2008; VARTANIAN et al., 2007). Alguns trabalhos sugerem que a ingestão de refrigerante parece influenciar a qualidade e a quantidade da ingestão de nutrientes em humanos. Uma revisão da literatura sugeriu associação positiva entre a ingestão de refrigerante e o aumento da ingestão total de energia e de carboidratos e redução na ingestão de proteínas, fibras dietéticas, cálcio e riboflavina (VARTANIAN et al., 2007). Outro estudo demonstrou associação positiva entre ingestão de refrigerantes, e a ingestão de doces e gorduras e associação negativa entre a ingestão de refrigerantes e a ingestão de legumes, frutas, leguminosas, peixes, arroz, ovos e leite (YAMADA et al., 2008). Portanto, a ingestão de refrigerante parece estar associada à dieta de baixa qualidade (YAMADA et al., 2008; VARTANIAN et al., 2007).

1.3. **Influência do consumo de refrigerante no peso e na gordura intra-abdominal**

A influência do consumo de refrigerante sobre o peso corporal é controversa. Revisões da literatura apontam a ingestão de bebidas calóricas (adoçadas com açúcar) como principal contribuinte para o ganho de peso (MALIK et al., 2010). Estudos realizados com animais identificaram aumento no peso corporal nos grupos tratados com refrigerante calórico, como substituto da água, quando comparado aos grupos que foram tratados com água em um período igual ou superior a seis meses (BELPOGGI et al., 2006; MILEI et al., 2011). Por outro lado, outros trabalhos não encontraram diferença no peso corporal dos animais tratados com refrigerante calórico como única fonte de líquido comparado ao grupo tratado com água como única fonte de líquido no período de dois meses (CONTRERAS-GARCÍA, 2000).

Pesquisas epidemiológicas mostraram relação positiva entre a ingestão de bebidas não calóricas e o ganho de peso (FOWLER et al., 2008). Contudo, por serem estudos observacionais, não foi possível estabelecer relação de causa e efeito. Além disso, indivíduos com excesso de peso podem optar pelo uso de alimentos e/ou bebidas adoçados com edulcorantes não calóricos com o objetivo de ingerir menos calorias e perder peso (GARDNER et al., 2012) e, assim, constituem um viés para esses trabalhos. De La Hunty e colaboradores (2006) analisaram a relação do uso de edulcorantes e o ganho de peso por meio de estudos realizados com humanos e concluíram que o uso de edulcorantes como substituto da sacarose auxilia na perda de peso. Em um total de nove estudos, quatro identificaram menor ganho de peso em indivíduos tratados com edulcorantes, enquanto nos demais não foi observada diferença significativa no ganho de peso. Raben e colaboradores (2002) observaram aumento de peso corporal e gordura corporal em indivíduos que receberam bebidas e alimentos adoçados com sacarose e ocorreu redução no peso corporal e na gordura corporal dos indivíduos que receberam bebidas e alimentos adoçados com edulcorantes. Do mesmo modo, uma pesquisa realizada com 641 crianças tratadas com bebidas calóricas e não calóricas, no período de 18 meses, identificou menor ganho de peso e gordura corporal nas crianças tratadas com bebida não calórica quando comparadas com as crianças tratadas com refrigerante calórico (RUYTER et al., 2012).

Em outro estudo realizado por nosso grupo, foi avaliado o efeito do consumo de refrigerante calórico e não calórico sobre a ingestão de alimentos sólidos em ratos durante 17 semanas. Observou-se que o consumo de refrigerante, tanto calórico quanto não calórico, não provocou mudanças na ingestão total de energia, peso corporal e gordura intra-abdominal no período do estudo. Entretanto, o consumo de refrigerante calórico resultou na redução da

ingestão de alimentos sólidos, aumento do consumo de carboidratos e elevada ingestão total de líquidos enquanto a ingestão de refrigerante não calórico não influenciou a ingestão total de alimentos sólidos no final do tratamento. A partir dos resultados, concluiu-se que ratos tratados com dieta padrão e com a oferta de refrigerante calórico e não calórico não apresentaram mudanças na ingestão total de energia, peso corporal e gordura intra-abdominal no período avaliado. Entretanto, a ingestão de refrigerante calórico influenciou a quantidade e a qualidade de alimentos sólidos consumidos; porém, a ingestão de refrigerante não calórico não influenciou na ingestão de alimentos (CONY et al., 2012).

1.4. **Dieta de cafeteria e síndrome metabólica**

A dieta de cafeteria é amplamente utilizada como modelo para o estudo da obesidade, consistindo em vários alimentos altamente palatáveis que produzem hiperfagia, consumo elevado de energia e estando associada à epidemia da obesidade, ganho de peso corporal, tecido adiposo aumentado, intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e resposta pró-inflamatória (SHAFAT et al., 2009, SAMPEY et al., 2011; SAMPEY et al., 2012). Devido a esses efeitos, a dieta de cafeteria tem sido usada como um modelo para o estudo da obesidade e SM.

A SM é estabelecida quando o indivíduo apresenta três ou mais dos seguintes sintomas: 1) intolerância à glicose com glicemia de jejum maior ou igual a 110 mg/dL; 2) obesidade abdominal ou maior quantidade de gordura visceral com circunferência da cintura maior que 102 cm para homens e maior que 88 cm para mulheres; 3) concentração sérica de triglicérides maior ou igual a 150 mg/dL; 4) concentração sérica de HDL-colesterol menor que 40 mg/dL para homens e menor que 50 mg/dL para mulheres e 5) pressão arterial maior ou igual a 130 x 85 mmHg ou terapia anti-hipertensiva vigente (NCEP, 2002; GRUNDY et al., 2005).

2. **HIPÓTESE**

A alta palatabilidade dos alimentos da dieta de cafeteria com refrigerante calórico pode levar ao aumento do consumo de energia, ao ganho de peso e a mudanças na composição corporal. Porém, o consumo de refrigerante não calórico pode minimizar o

aumento de peso e outras consequências relacionadas ao aumento do consumo de alimentos palatáveis e refrigerante calórico.

3. JUSTIFICATIVA

O consumo de refrigerantes e de alimentos altamente palatáveis está modificando os hábitos alimentares da população, causando um acentuado descontrole alimentar que resulta no aumento da epidemia de obesidade no mundo.

Em estudo realizado por nosso grupo (CONY et al., 2012), a oferta de alimentação equilibrada e de refrigerante calórico ou não calórico não provocou mudanças na ingestão total de energia, peso corporal e deposição de gordura intra-abdominal e perigonadal em ratos no período de 17 semanas. Entretanto, a ingestão de refrigerante calórico influenciou a quantidade e a qualidade dos alimentos sólidos ingeridos. A ingestão de refrigerante não calórico não influenciou a ingestão de alimentos, mas levou à maior ingestão de sódio. Tanto o refrigerante calórico quanto o não calórico levaram à maior ingestão total de líquidos e menor ingestão de água, que foi substituída pelo refrigerante. Esses resultados motivaram a investigação sobre o comportamento alimentar dos animais com a exposição a refrigerante calórico e não calórico e oferta de alimentos sólidos mais palatáveis e que induzem à hiperfagia.

Devido à ausência de evidências sobre os efeitos da associação da elevada ingestão de refrigerantes calóricos e não calóricos com uma alimentação industrializada e altamente palatável, justifica-se este estudo que avaliou o efeito da ingestão de refrigerantes calóricos e não calóricos sobre o consumo alimentar e parâmetros morfológicos em ratos submetidos a dieta de cafeteria.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Analisar o efeito do consumo de refrigerante calórico e não calórico sobre o consumo alimentar e parâmetros morfológicos de ratos Wistar submetidos a dieta de cafeteria.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1 Verificar o efeito do consumo de refrigerante calórico e não calórico sobre a ingestão de ração padrão, de dieta de cafeteria, de líquidos totais, de nutrientes e de energia nos distintos grupos experimentais;

4.2.2. Avaliar o ganho de peso nos distintos grupos experimentais;

4.2.3. Avaliar a gordura visceral nos distintos grupos experimentais.

5. REFERÊNCIAS

BELPOGGI, F. et al. Results of Long-Term Carcinogenicity Bioassays on Coca-Cola Administered to Sprague-Dawley Rats. **New York Acad Scienc**, 1076, 736-752, 2006.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Gestão e Estatística (IBGE). **Pesquisa de Orçamento Familiar (POF). Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos – período 2008-2009.** (2010a) Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicao_devida/pof/2008_2009_aquisicao/tabelas_pdf/tab111.pdf> Acesso em Outubro de 2012.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Gestão e Estatística (IBGE). **Pesquisa de Orçamento Familiar (POF). Prevalência de consumo alimentar, por sexo, segundo os alimentos - Brasil - período 2008-2009.** (2011). Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicao_devida/pof/2008_2009_analise_consumo/tabelas_pdf/tab_1_2.pdf> Acesso Outubro de 2012.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Gestão e Estatística (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013.** Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/comentarios.pdf> Acesso em junho de 2015.

BRAY, GA. Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose. **Cur Opin Lipidol**, 21, 51–57, 2010.

CONY, K.V.; GOULARTE, J.F.; SANVITTO, G.L.; HAGEN, M.E.K. Efeito do consumo de refrigerante sobre a ingestão alimentar em ratos. Trabalho de conclusão (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina, Porto Alegre, BR-RS, 2012, 53 p.

CONTRERAS-GARCÍA, F. et al. Cola Beverage Consumption Induces Bone Mineralization Reduction in Ovariectomized Rats. **Arch Med Res**, 31, 360–365, 2000.

DBO – Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009-2010 ABESO – **Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica.** 3ª Ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.

DE LA HUNTY, A.; GIBSON, S.; ASHWELL, M. A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control. **Brit Nut Found**, 31, 115–128, 2006.

DELLA VALLE, DM.; ROE, LS.; ROLLS, BJ. Does the consumption of caloric and non-caloric beverages with a meal affect energy intake? **Appetite**, 44, 187–193, 2005.

DESPRÉS, JP; LEMIEUX, I; BERGERON, J et al. Abdominal obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to global Cardiometabolic Risk. **Atheros Thromb Vasc Biol**, 28, 1039-1049, 2008.

FOWLER, SP. et al. Fueling the Obesity Epidemic? Artificially Sweetened Beverage Use and Long-term Weight Gain. **Obesity**, 16, 1894–1900, 2008.

GARDNER, C; WYLIE-ROSETT, J, GIDDING, SS et al. Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives. **Diab Care**, 9, 1798-1808, 2012.

GOULARTE, JF; FERREIRA, MBC; SANVITTO, GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. **Brit J Nutr**, 1, 1-8, 2012.

GRUNDY, SM; CLEEMAN, JI; DANIELS, SR; DONATO, KA; ECKEL RH; FRANKLIN, BA. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI). Scientific statement. **Circulation**, 112, 2735-52, 2005.

HILL JO, MELANSON EL. Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. **Med Sci Sports Exerc** 31, 515-21, 1999.

KANT AK, GRAUBARD BI. Secular trends in patterns of self-reported food consumption of adult Americans: NHANES 1971-1975 to NHANES 1999-2002. **Am J Clin Nutr** 84:1215-23, 2006.

LINDQVIST, A et al. Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. **Regul Pept**, 130, 123 – 132, 2005.

LINDQVIST, A; BAELEMANS, A; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. **Regul Pept**, 150, 26-32, 2008.

MACEDO, IC; et al. Obesidade induzida por dieta de cafeteria associada ao estresse crônico altera a hidrólise dos nucleotídeos e nocicepção em ratos Wistar. **Revista do HCPA** 32. : 27-31, 2012.

MALIK, VS et al. Sugar-Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease Risk. **Circulation**, 121, 1356-1364, 2010.

MALIK, VS et al. Intake of sugar- sweetened beverages and weight gain: a systematic review. **An J Clin Nutr**; 84 (2): 274-88, 2006.

MATTES, DR; POPKIN, BM. Non-nutritive sweetener consumption in humans: Effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. **Am J Clin Nutr**, 89, 1-14, 2009.

MARTINEZ JA, CORBALAN MS, SANCHEZ-VILLEGAS A et al. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. **J Nutr**. 133, 2549-54, 2003.

MEMISOGLU A, HU FB, HANKINSON SE et al. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. **Hum Mol Genet** 12, 2923-9, 2003.

MILAGRO, FI; CAMPÓN, J; MARTÍNEZ, JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. **Obesity**, 14, 7, 1118-23, 2006.

MILEI, J. et al. Chronic cola drinking induces metabolic and cardiac alterations in rats. **World J Cardiol**, 26, 111-116, 2011.

MOKDAD AH, FORD ES, BOWMAN BA et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **The Journal of the American Medical Association** 289, 76–79, 2003.

NCEP – Third Report of the National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report. **Circulation**, 106, 3143-421, 2002.

NETTLETON, JA; LUTSEY, P ;WANG, Y; LIMA, JA; MICHO, ED; JACOBS Jr, DR. Diet Soda Intake and Risk of Incident Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Diab Care**, 32, 4, 688-694, 2009.

NHSIC – The Health and Social Care Information Centre. Statistics on obesity, physical activity and diet England. http://www.ic.nhs.uk/webfiles/publications/opad10/Statistics_on_Obesity_Physical_Activity_and_Diet_England_2010.pdf (acesso em Novembro de 2012).

NIELSEN, SJ; POPKIN, BM. Changes in Beverage Intake Between 1977 and 2001. **Am J Prev Med**, 27, 205–210, 2004.

PIERNAS C, POPKIN BM. Snacking increased among U.S. adults between 1977 and 2006. **J Nutr** 140:325–32, 2010.

POPKIN, BM. The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. **J Nutr**, 131, 871S-873S, 2001.

POPKIN, BM; LARSEN, PG. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. **Int J Obes**, 28, 2-9, 2004.

RABEN, A et al. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. **Am J Clin Nutr**, 76,721–729, 2002.

RIVERA, JA et al. Nutrition Transition in Mexico and in Other Latin American Countries. **Nutrition Reviews**, 62, 149-157, 2004.

ROMBALDI AJ et al. Fatores associados ao consumo regular de refrigerante não dietético em adultos de Pelotas, RS. **Rev Saúde Pública** 45(2):382-90, 2011.

ROSINI TC, RAMOS DA SILVA AS, MORAES C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev Assoc Med Bras** 58, 383-387, 2012.

RUYTER, JC et al. A Trial of Sugar-free or Sugar-Sweetened Beverages and Body Weight in Children. **N Engl J Med**, 367, 2012.

SAMPEY, BP; VANHOOSE, AM; WINFIELD, HM; et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high fat diet. **Obesity**, 19, 1109–1117, 2011.

SAMPEY, BP; FREERMERMAN, AL; ZHANG, J et al. Metabolomic profiling reveals mitochondrial-derived lipid biomarkers that drive obesity-associated inflammation. **PLoS One**, 7, 6, e38812, 2012.

SATIJA A, TAYLOR FC, KHURANA S, et al. Differences in consumption of food items between obese and normal-weight people in India. **Natl Med J India**;25:10–3, 2012.

SHAFAT, A; MURRAY, B; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite** 52, 34–38, 2009.

SWITHERS, SE; DAVIDSON, TL. A Role for Sweet Taste: Calorie Predictive Relations in Energy Regulation by Rats. **Behavioral Neuroscience**, 122, 1, 161-173, 2008.

VARTANIAN, LR; SCHWARTZ, MB; BROWNELL, KD. Effects of Soft Drink Consumption on Nutrition and Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Am J Pub Health**, 97, 4, 2007.

VOLTERA, AF; CESARETTI, MLR; GINOZA, M; KOHLMANN Jr, O. Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 52, 1, 47-54, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007) ICD-10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision. <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/> (acesso em Dezembro, 2012).

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Global Strategy on Diet, Physical Activity & Health. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/index2.html> (acesso em junho de 2015).

YOUNG, LR; NESTLE, M. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. **Am J Public Health**, 92, 246–249, 2002.

YAMADA, M et al. Soft Drink Intake Is Associated with Diet Quality Even among Young Japanese Women with Low. **J Am Diet Assoc**, 108, 1997-2004, 2008.

5 ARTIGO ORIGINAL “Efeitos da ingestão de refrigerante calórico e não calórico sobre o consumo alimentar e parâmetros morfológicos em ratos alimentados com dieta de cafeteria.”.

5.1 Revista de escolha: British Journal of Nutrition

Título:

Efeitos da ingestão de refrigerante calórico e não calórico sobre o consumo alimentar e parâmetros morfológicos em ratos alimentados com dieta de cafeteria.

Título em Inglês:

Effects of caloric and non-caloric soft drink intake on food consumption and morphological parameters in rats fed with cafeteria diet

Autores:

Rutiane Ullmann Thoen^{1,2}, Vanessa Giacomeli^{1,2}, Martine Elisabeth Kienzle Hagen^{1,2}

Afiliações

¹Departamento de Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2.400, 4º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Centro de Estudos em Alimentação e Nutrição - HCPA/UFRGS.

Endereço do autor principal, telefone e e-mail

Martine Elisabeth Kienzle Hagen

Rua Ramiro Barcelos, 2400 – 4º andar – COMGRAD Nutrição

CEP: 90035-903

Telefone: 51 99595299

E-mail: martine.hagen@ufrgs.br

Financiado por

Pesquisa financiada pelo Fundo de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e CNPq.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da ingestão de refrigerante calórico e não calórico sobre o consumo alimentar e parâmetros morfológicos de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria. Foram utilizados ratos Wistar machos divididos em seis grupos: CON, RC, RNC, DC, DC+ RC e DC+RNC. O grupo RC apresentou redução de 30% na ingestão de alimentos sólidos e de 29% de proteínas, comparado com o CON e RNC. Porém, o grupo RC consumiu três vezes mais líquidos que o CON e a ingestão de energia total e de carboidratos foram de 17% e 33%, respectivamente, superiores aos grupos CON e RNC. Os grupos que receberam dieta de cafeteria consumiram 4,5 vezes mais lipídeos comparados aos grupos CON, RC e RNC e o consumo de proteínas foi em torno de 50% menor. A ingestão de energia foi maior nos grupos DC, DC+RC e DC+RNC (32%, 71% e 34%) em relação ao CON, RC e RNC, respectivamente. Os grupos DC, DC+RC e DC+RNC consumiram três vezes mais sódio total comparado aos controles e apresentaram maior ganho de peso e índice lipossomático. Concluiu-se que o refrigerante reduziu o consumo de alimentos sólidos, a dieta de cafeteria aumentou a ingestão de alimentos e ambos influenciaram negativamente a qualidade da alimentação, refletindo no aumento do ganho de peso e de gordura visceral, podendo aumentar os riscos para o desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis. No entanto, o consumo de refrigerante não calórico minimizou o acúmulo da gordura visceral no DC+RNC, sugerindo o refrigerante não calórico como auxiliar no tratamento da obesidade.

Palavras-chave: dieta de cafeteria, obesidade, refrigerante, ganho de peso.

ABSTRACT

This study provides an analysis of the effect of caloric and non-caloric soft drinks intake on food consumption and morphometric parameters of Wistar rats fed with cafeteria diet. The male Wistar rats were divided into six groups: CON, RC, RNC, DC, DC+ RC and DC+RNC. The RC group presented a 30% reduction in the intake of solid foods and 29% protein in relation to CON and RNC. However, the RC group consumed three times more liquids than the CON group and the total intake of energy and carbohydrates was 17% and 33% respectively, higher than the CON and the RNC groups. The groups that received cafeteria diet consumed 4.5 times more lipids compared to the CON, RC and RNC groups and the consumption of protein was around 50% lower. The energy intake was higher in the DC, DC+RC and DC+RNC groups (32%, 71% and 34%) compared to the CON, RC and RNC, respectively. The Groups DC, DC+RC e DC+RNC consumed three times more total sodium when compared to controls and presented a higher weight gain and liposomal index. Soft drinks intake has reduced the consumption of solid food, cafeteria diet increased food intake and both had a negative influence on the quality of food, resulting in increased weight gain and visceral fat, which may increase the risk of developing DCNT. However, the consumption of non-caloric soft drinks has minimized the accumulation of visceral fat in the DC + RNC, suggesting that non-caloric soft drinks can be helpful in the treatment of obesity.

Keywords: cafeteria diet, obesity, soft drink, food consumption.

INTRODUÇÃO

O consumo de refrigerantes e de alimentos altamente palatáveis está modificando os hábitos alimentares de muitas pessoas, causando um acentuado descontrole alimentar. O refrigerante calórico é uma bebida que contém alto teor de sacarose, açúcar simples, resultando seu consumo em adição de calorias vazias na dieta¹. Os alimentos palatáveis ricos em gordura saturada² e carboidratos simples³ são alimentos de baixa qualidade que contribuem para o aumento da epidemia de obesidade no mundo⁴.

A obesidade é uma doença multifatorial associada a diversas causas, mas o excesso de alimentos palatáveis resulta em um consumo excessivo de energia. O ato de comer tem um envolvimento complexo de prazer e de recompensa com motivações e comportamentos que envolvem vários sistemas neurais⁴⁻⁷.

O sobrepeso e obesidade são os principais fatores de risco para uma série de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença cardíaca e hipertensão, asma, artrite⁸, entre outras. Além disso, o excesso de tecido adiposo também provoca alterações metabólicas como as dislipidemias, complicações cardiovasculares, a resistência à insulina e o DM2⁹.

O excesso de peso e a obesidade não são mais uma características dos países desenvolvidos, mas também dos países em desenvolvimento, especialmente em ambientes urbanos. Segundo a World Health Organization, em 2014 mais de 1,9 bilhão de adultos foram diagnosticados com excesso de peso, dos quais 600 milhões eram obesos; 39% dos adultos estavam acima do peso e 13% eram obesos. Em 2013, mais de 42 milhões de crianças menores de cinco anos estavam acima do peso¹⁰.

A dieta hipercalórica tem sido muito utilizada como um modelo de indução de obesidade em animais de laboratório. Este modelo em particular é extremamente útil em pesquisas sobre obesidade em animais de laboratório devido à sua grande semelhança com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos^{9,11}.

Em um estudo realizado por nosso grupo¹², a oferta de alimentação equilibrada e de refrigerante calórico ou não calórico não provocou mudanças na ingestão total de energia, peso corporal e deposição de gordura intra-abdominal e perigonadal em ratos no período de 17 semanas. Entretanto, a ingestão de refrigerante calórico resultou na diminuição do consumo de ração padrão que foi substituída pelo consumo de refrigerante. Desta forma, os animais reduziram o consumo de nutrientes como vitaminas e minerais. A ingestão de refrigerante não calórico não influenciou no consumo de alimentos, mas levou à maior

ingestão de sódio. Tanto o refrigerante calórico quanto o não calórico levaram à maior ingestão total de líquidos e menor ingestão de água, que foi substituída pelo refrigerante. Esses resultados motivaram a investigação do comportamento alimentar dos animais diante da exposição a refrigerantes calóricos e não calóricos e da oferta de alimentos sólidos mais palatáveis e que induzem à hiperfagia.

Devido à ausência de evidências sobre os efeitos da associação entre a elevada ingestão de refrigerantes calóricos e não calóricos e uma alimentação industrializada e altamente palatável, justifica-se este estudo, que propõe a avaliação do efeito da ingestão de refrigerantes calóricos e não calóricos sobre a ingestão alimentar e parâmetros morfológicos em ratos submetidos a dieta de cafeteria.

MÉTODOS

Delineamento Experimental

Estudo de intervenção experimental em animais.

Animais

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com auxílio do Software WINPEPI v. 11.1. Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 80%, tendo como referência o estudo de MILAGRO e colaboradores¹³, que relataram um DP de 2,83 para o Grupo Controle e um DP de 31,11 para o Grupo Dieta de Cafeteria, considerando uma diferença de ingestão de calorias de 30 kcal/dia, o N amostral calculado por grupo foi de dez animais.

Sessenta ratos machos Wistar com dois meses de idade foram fornecidos pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do HCPA sob nº 13.0136. Todos os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (2 animais/caixa) em ciclo de claro-escuro de 12 horas, umidade entre 70 a 80% e temperatura igual a 22 ± 2 °C. Os animais foram randomizados de acordo com o ângulo de fase determinado por Bioimpedância elétrica e separados em seis grupos experimentais: Controle (CON, n=10) – ração padrão e água *ad libitum*; Refrigerante Calórico (RC, n=10) – ração padrão, água e refrigerante calórico *ad libitum*; Refrigerante Não Calórico (RNC, n=10) – ração padrão, água e refrigerante não calórico *ad libitum*; Ração e Dieta de Cafeteria (DC, n=10) – ração padrão, dieta de cafeteria e água *ad libitum*; Refrigerante Calórico e Dieta de Cafeteria (RC+DC, n=10) – ração padrão,

dieta de cafeteria, água e refrigerante calórico *ad libitum*; Refrigerante Não Calórico e Dieta de Cafeteria (RNC+DC, n=10) – ração padrão, dieta de cafeteria, água e refrigerante não calórico *ad libitum*.

Ração Padrão

A ração padrão utilizada foi a ração para ratos e camundongos da marca Nuvilab CR-1 com a composição nutricional apresentada na tabela 1. A composição básica do produto consiste em milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

Tabela 1. **Composição nutricional da Ração Padrão Nuvilab CR-1®**

Ração Padrão Nuvilab CR-1®		
Energia	kcal/100g	295kcal
	g/100g	40,5g
Carboidratos	Percentual de energia	55%
	g/100g	16,2g
Proteína	Percentual de energia	22%
	g/100g	1,5g
Lipídeo	Percentual de energia	4,5%
Fibras	g/100g	7g
Sódio	mg/100g	0,27mg

Dados fornecidos pelo fabricante

Dieta de Cafeteria

A dieta de cafeteria foi baseada em um estudo prévio¹⁴ que utilizou salgadinho Yokito (Yoki), biscoito wafer de chocolate (Bauduco), bolacha recheada de morango (Trakinas), leite condensado (Elegê) e salsicha (Excelsior). A dieta de cafeteria foi oferecida com a ração

padrão, água e refrigerante *ad libitum*. Os valores da composição nutricional da dieta de cafeteria são apresentados na tabela 1.

Tabela 2. Composição nutricional da dieta de cafeteria

	Energia		Carboidratos		Proteína		Lipídeo		Sódio mg/100g
	kcal/100g	g/100g	Percentual de energia	g/100g	Percentual de energia	g/100g	Percentual de energia		
Salgadinho Yokitos (Yoki)	496	60	48,4	5,2	4,2	26	47,1	600	
Bolacha recheada morango (Trakinas)	490	66,6	54,43	5,33	4,36	21	38,57	213,3	
Wafer chocolate (Balduco)	523,3	63,3	48,4	4,66	3,56	28	48,15	176,6	
Leite condensado (Elegê)	320	55	68,75	7,5	9,38	8	22,5	90	
Salsicha (Excelsior)	192,8	4,2	8,7	12	24,9	14,2	66,29	1463,2	

Dados obtidos através das embalagens dos alimentos

Refrigerante calórico e não calórico (tradicional e zero)

Os refrigerantes à base de cola foram adquiridos no comércio local e os valores nutricionais foram obtidos em consultoria ao site do fabricante de uma marca desse tipo de refrigerante (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores nutricionais de Coca-cola® tradicional e Coca-cola® zero.

	Qtd (mL)	Kcal	Carboidratos (g)	Sódio (mg)	Cafeína (mg)
Coca-cola tradicional®	1	0,43	0,11	0,05	0,1
Coca-cola zero®	1	0,00	0,00	0,28	0,1

Dados obtidos no site do fabricante

Avaliação de ingestão alimentar

A avaliação de ingestão alimentar foi realizada por meio da pesagem diária de todos os alimentos da dieta que eram oferecidos e tudo o que sobrava da oferta. A ingestão do volume de líquidos foi determinada com o auxílio de uma proveta.

A ingestão diária de ração e de líquidos foi calculada a partir da subtração do que foi oferecido e do que restou após 24 horas. Os dados diários obtidos para a ração, a dieta de cafeteria e os líquidos de cada caixa foram somados e divididos pelo número de animais de cada caixa (no caso, dividido por 2), resultando na quantidade individual de cada alimento por dia.

Avaliação do peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente em uma balança semianalítica, sendo o peso representado em gramas. Para obter o ganho de peso final total dos animais, subtraiu-se o peso do início do tratamento do último peso registrado antes da eutanásia.

O índice lipossomático é representado pela divisão do peso total de gordura visceral pelo peso corporal do animal. A gordura visceral foi obtida por meio da dissecação da gordura do animal após a eutanásia.

Bioimpedância elétrica

A mensuração da resistência corporal total (RsCT) e a reactância corporal total (RcCT) foram realizadas por meio de um analisador de impedância tetrapolar de fase sensível (Byodynamics BIA 450E) com agulhas hipodérmicas usadas como eletrodos. Os ratos foram anestesiados com isoflurano e colocados na posição de decúbito ventral em superfície não

condutora para eliminar interferências vindas da indução elétrica. A água corporal total (WTBW) foi estimada a partir da fórmula empírica $WTBW = 15,47 + 97,44 L / WBR$, onde L é o comprimento do corpo (cm) e WBR é a resistência corporal total a partir de medições de bioimpedância¹⁵.

Morte dos animais, coleta de sangue e coleta de tecido adiposo

Ao final de 12 semanas de tratamento e após 12 horas de jejum, os animais foram pesados e submetidos a eutanásia por meio de decapitação. A decapitação é considerada um método indolor, em que o animal perde rapidamente a consciência (menos que 2,7 segundos)^{16,17}. Além disso, não influencia nas dosagens feitas posteriormente com o sangue do animal, ao contrário da anestesia, que poderia causar alterações substanciais em alguns parâmetros¹⁸, e do gás inalatório, que poderia causar alterações decorrente do estresse oxidativo. A decapitação ocorreu com o auxílio de uma guilhotina e este procedimento foi realizado em uma sala afastada dos outros animais.

O tecido adiposo perigonadal e intra-abdominal (retroperitoneal e mesentérico) foi dissecado, pesado, congelado e armazenado em freezer a -80°C.

Análise Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do software SPSS[®] versão 18.0. Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a ingestão de alimentos, ingestão de nutrientes, ingestão de energia, ingestão de líquidos, peso corporal, peso do tecido adiposo visceral, foram analisados ao final do tratamento por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para a análise da ingestão de energia do refrigerante no final do experimento, foi utilizado o Teste *t*-Student. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Consumo de alimentos sólidos

O consumo de alimentos sólidos está representado como média diária em gramas de alimentos por animal (Figura 1). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos na ingestão de alimentos sólidos [$F(5;54) = 356.283$; $P < 0,001$]. O grupo RC consumiu a menor quantidade total de alimentos sólidos em relação aos outros grupos; a

exposição ao refrigerante calórico levou a uma queda de 30% na ingestão de ração padrão comparado aos grupos CON e RNC ($P < 0,001$). Todos os grupos que consumiram dieta de cafeteria com ou sem refrigerante apresentaram uma redução no consumo de ração padrão em torno de 90%, em relação aos animais dos grupos CON, RC e RNC. Os animais dos grupos DC, DC+RC e DC+RNC consumiram quantidades semelhantes de dieta de cafeteria [$F(2;27) = 0.690$; $P > 0,05$]. A ingestão de alimentos sólidos foi significativamente superior no grupo DC à dos grupos que não receberam dieta de cafeteria ($P < 0,001$).

Consumo de Líquidos

O consumo de líquidos está representado como média diária em miligramas de líquido por animal (Figura 2). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença na ingestão de água entre os grupos [$F(5;54) = 39.408$; $P < 0,001$]. Os grupos RC e RNC consumiram, respectivamente, 69% e 42% menos água em relação ao CON. O grupo DC consumiu 29% menos água que o CON; o grupo DC+RC consumiu 42% menos água que o DC, e o DC+RNC consumiu 52% menos água que o DC. Os animais que receberam refrigerante calórico (RC e DC+RC) consumiram, respectivamente, 68% e 38% mais refrigerante se comparados aos grupos que receberam refrigerante não calórico (RNC e DC+RNC). O total de líquidos consumidos pelos grupos RC e DC+RC foi três vezes maior se comparado aos dos grupos CON e DC; contudo, o grupo RC consumiu uma quantidade significativamente maior de refrigerante (39%) e de líquidos totais (31%) quando comparado ao DC+RC ($P < 0,05$). A ingestão de refrigerante não calórico foi semelhante nos grupos RNC e DC+RNC ($P > 0,05$). O grupo RNC ingeriu maior quantidade de água se comparado ao grupo DC+RNC ($P < 0,05$), mas a quantidade de líquidos totais não foi significativamente diferente ($P > 0,05$).

Consumo de Energia

O consumo de energia nos líquidos e nos alimentos sólidos está representado como média diária em kilojoules por animal (Figura 3). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa na ingestão de energia total entre os grupos [$F(5;54) = 18.793$; $P < 0,001$]. O grupo RC consumiu significativamente menos energia proveniente dos alimentos sólidos quando comparado aos demais grupos. Já em relação à energia total, o grupo RC consumiu uma quantidade significativamente maior que os grupos CON e RNC e uma quantidade menor que os grupos DC, DC+RC e DC+RNC. A dieta de cafeteria foi responsável pelo aumento do consumo de energia em alimentos sólidos nos grupos DC, DC+RC e DC+RNC, representando 32%; 71% e 34% mais do que o CON, RC e RNC,

respectivamente ($P < 0,001$), assim como o consumo de energia total dos animais que receberam a dieta de cafeteria foi significativamente maior em comparação ao consumo de animais dos grupos que receberam apenas ração padrão ($P < 0,001$). O grupo DC+RC consumiu menos energia proveniente dos alimentos sólidos quando comparado aos grupos DC e DC+RNC ($P < 0,001$), mas a ingestão de energia total não foi diferente da encontrada nesses grupos ($P > 0,05$).

O consumo de refrigerante calórico foi responsável por 43% do total de energia consumida pelo grupo RC e por 19% da energia total consumida pelo grupo DC+RC. O teste *t* mostrou um aumento significativo (46%) no consumo de energia do refrigerante do grupo RC se comparado ao grupo DC+RC [$t(1;16) = 5.689$; $P < 0,001$].

Consumo de Carboidratos

O consumo de carboidratos dos alimentos sólidos, dos líquidos e totais está expresso em média diária de gramas por animal (Tabela 3). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos na ingestão de carboidratos dos alimentos sólidos [$F(5;54) = 13.448$; $P < 0,001$]. A ingestão de refrigerante calórico, no grupo RC, levou à redução de 30% do consumo de carboidratos em alimentos sólidos quando comparada à ingestão encontrada no grupo CON, e a dieta de cafeteria foi responsável pela redução de 14% na quantidade de carboidratos sólidos ingerida pelo DC em relação ao CON. O consumo do refrigerante do RC aumentou em 33% a ingestão de carboidratos totais em relação ao CON e foi responsável por aumentar em 18% a ingestão de carboidratos totais quando comparado ao grupo DC+RC [$F(3;36) = 137.557$; $P < 0,001$]. Os animais do grupo DC+RC ingeriram 28% e 17% mais carboidratos em comparação ao DC e ao DC+RNC, respectivamente. Os animais dos grupos RNC e DC+RNC consumiram menos carboidratos totais (26% e 17%, respectivamente) quando comparados aos grupos RC e DC+RC.

Consumo de Proteínas

O consumo de proteínas nos alimentos está expresso como média diária em gramas por animal (Tabela 3). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos na ingestão de proteínas [$F(5;54) = 99.693$; $P < 0,01$]. O grupo RC consumiu 29% menos proteína quando comparado aos grupos CON e RNC. A ingestão da dieta de cafeteria resultou na redução do consumo de proteínas em 50% no grupo DC comparado ao CON, 34% no grupo DC+RC comparado ao RC e 50% no grupo DC+RNC comparado ao RNC ($P > 0,05$).

Consumo de Lipídeos

O consumo de lipídeos dos alimentos está representado como média diária em gramas por animal (Tabela 3). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos na ingestão de lipídeos [$F(5;54) = 206.026$; $P < 0,001$]. Os grupos que receberam dieta de cafeteria (DC, DC+RC e DC+DNC) consumiram uma quantidade 4,5 vezes maior de lipídeos se comparados aos grupos CON, RC e RNC, mas quantidades semelhantes de lipídeos entre si ($P > 0,05$). Os grupos CON, RC e RNC consumiram quantidades semelhantes de lipídeos entre si ($P > 0,05$).

Consumo de Sódio

O consumo de sódio nos alimentos, nos líquidos e sódio total está representado como média diária em miligramas por animal (Tabela 3). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos na ingestão de sódio total [$F(5;54) = 59.019$; $P < 0,001$]. O consumo de sódio total pelos grupos que receberam dieta de cafeteria (DC, DC+RC e DC+RNC) foi significativamente superior (em torno de 3 vezes maior) quando comparado ao encontrado nos grupos CON, RC e RNC. O consumo de sódio total foi semelhante entre os grupos CON, RC e RNC ($P > 0,05$).

Consumo de cafeína

O consumo de cafeína nos refrigerantes calórico e não calórico está representado como média diária em miligramas por animal (Tabela 3). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa no consumo de cafeína entre os grupos que receberam refrigerante [$F(3;36) = 23.750$; $P < 0,001$]. Os grupos RC e DC+RC apresentaram um maior consumo de cafeína devido à grande quantidade de refrigerante calórico ingerido, totalizando um consumo de 68% maior no grupo RC comparado ao RNC e 38% maior no grupo DC+RC comparado ao DC+RNC. Mas os grupos RNC e DC+RNC não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$).

Ganho de Peso Corporal

O ganho de peso corporal no final do tratamento está representado em gramas por animal (Figura 4). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa no ganho de peso entre os grupos [$F(5;54) = 6.731$; $P < 0,001$]. Os grupos que receberam a dieta de cafeteria apresentaram aumento significativo no ganho peso em relação aos seus controles. O grupo

DC apresentou um ganho de peso 60% maior do que o CON; o DC+RC aumentou em 35% em relação ao RC; e o DC+RNC aumentou em 45% o ganho de peso em relação ao RNC.

Índice Lipossomático

O índice lipossomático (IL) foi calculado dividindo-se o peso do tecido adiposo visceral pelo peso corporal dos animais no final do tratamento, após as 12 semanas (Figura 5). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa no IL entre os grupos [$F(5;54) = 23.002$; $P < 0,001$]. Os grupos DC e DC+RC apresentaram um aumento de 175% do IL quando comparados aos grupos CON e RC. O grupo DC+RNC teve um aumento no IL em 65% em relação ao RNC. Por outro lado, o IL do grupo DC+RNC foi 30% menor quando comparado aos grupos DC e DC+RC.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo analisar o efeito da ingestão de refrigerante calórico e não calórico e de alimentos palatáveis (dieta de cafeteria) sobre o consumo de alimentos, nutrientes, energia, o ganho de peso e o ganho de tecido adiposo visceral após 12 semanas de tratamento. Os resultados demonstraram que o grupo RC ingeriu menor quantidade de ração padrão e uma quantidade significativamente maior de líquido total comparado ao CON e ao RNC, pois os animais substituíram a ração padrão por refrigerante calórico. A maior ingestão de refrigerante calórico resultou em aumento significativo do consumo de carboidratos, enquanto o consumo de lipídeos e de proteínas foi inferior ao dos grupos CON e RNC. Já com a ingestão de refrigerante não calórico, não houve diferença no consumo de alimentos sólidos totais, energia, ganho de peso corporal e índice lipossomático quando comparado ao CON. A ingestão de refrigerante calórico, neste estudo, resultou em um aumento significativo no consumo de energia total do grupo RC em relação aos grupos CON e RNC, mas não houve aumento de peso corporal. Os animais dos grupos RC e RNC, que receberam apenas ração padrão como alimentos sólidos, consumiram menor quantidade de água em relação ao CON, devido à maior ingestão dos refrigerantes. A água foi substituída pelo refrigerante calórico por apresentar um alto teor de sacarose (carboidrato simples) e ser altamente palatável. Esse fator é considerado um dos principais contribuintes para o grande número de pessoas com sobrepeso e obesidade¹⁹⁻²² e aumento da adiposidade abdominal²³. Resultados semelhantes foram encontrados em outra pesquisa do nosso grupo, que analisou o consumo de refrigerante

calórico e não calórico em 17 semanas de tratamento em animais¹². Em outro estudo, realizado com brasileiros por meio de um inquérito telefônico que investigava o consumo de alimentos nos anos de 2007 a 2009, verificou-se um aumento de 60 para 67% no consumo de refrigerante calórico²⁴.

O sistema dopaminérgico (sistema de recompensa) pode estar envolvido no aumento do consumo do refrigerante, e a redução da ingestão de ração padrão pode ser atribuída à distensão gástrica causada pela ingestão excessiva de refrigerante. O sistema de recompensa é complexo e compreende algumas fases. A fase do pensamento, onde é criada a expectativa com relação ao alimento/sacarose; seguida pela fase da aquisição com a tomada da decisão avaliando o risco benefício; passando pelo consumo, onde se tem um feedback pela análise sensorial no primeiro contato com o alimento e que pode aumentar a motivação e o apetite (fase cefálica); chegando à fase do pós-consumo, que vai até o início do outro ciclo. Quando os alimentos palatáveis como a sacarose são efetivamente consumidos, ocorre um aumento da dopamina no núcleo *accumbens*, desempenhando estes papéis nas fases preparatórias e de consumo dos alimentos^{6,7}. Outro fator que parece contribuir para a geração de recompensa durante e após uma refeição é a ação dos sensores de nutrientes no trato gastrointestinal^{5,25}. Os receptores gustativos encontrados na cavidade oral também podem se expressar em células epiteliais do intestino e no hipotálamo. A sensação de satisfação ao se ingerirem alimentos palatáveis, ao invés de gerar um prazer agudo, perdura por algum tempo, o que muito provavelmente contribui para o desejo de comer novamente²⁵.

A ingestão de refrigerante calórico e a consequente diminuição na ingestão de alimentos sólidos podem ser explicadas pela alta palatabilidade e a saciedade que a concentração de energia do refrigerante calórico proporciona. A hiperglicemia pós-prandial ativa o núcleo da saciedade no hipotálamo ventromedial, que inibe o núcleo relacionado à alimentação do hipotálamo lateral e induz à supressão da ingestão alimentar^{26,27}, este fator é denominado teoria glicostática da fome. A quantidade de refrigerante calórico ingerida pelo grupo RC foi superior ao grupo DC+RC devido ao fato de que o segundo, além de receber o refrigerante calórico, recebeu alimentos sólidos palatáveis na dieta de cafeteria.

O consumo de alimentos sólidos totais foi semelhante entre os grupos que receberam a dieta de cafeteria; contudo, todos consumiram uma quantidade superior de lipídeos e inferior de proteínas devido ao fato de a dieta de cafeteria ser rica em gorduras. O consumo de alimentos sólidos totais pelo grupo DC foi significativamente maior se comparado ao encontrado nos grupos CON, RC e RNC. Entretanto, a quantidade de ração padrão consumida pelos animais que receberam a dieta de cafeteria foi significativamente menor quando

comparada à encontrada nos grupos CON, RC e RNC. A dieta de cafeteria, por apresentar uma variedade de alimentos altamente palatáveis, foi preferida pelos animais. Segundo Castro e colaboradores²⁸, essa dieta provoca uma disfunção no controle da ingestão alimentar e induz o acúmulo de gordura corporal e aumento do risco metabólico, como observado nos animais que receberam dieta de cafeteria em nosso estudo. Essa dieta foi utilizada em vários estudos como um modelo para o aumento do consumo de energia, o aumento de gordura corporal e para o desenvolvimento da obesidade^{14, 28-31}.

O consumo insuficiente de frutas e hortaliças e a ingestão de açúcares simples e gordura saturada são hábitos relacionados à dieta que têm sido considerados importantes fatores de risco para Doenças Crônicas Não Transmissíveis, e o consumo destes alimentos é preconizado nas Recomendações de Alimentação Saudável no Brasil (Ministério da Saúde, 2014) e no Sistema Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico²⁴. Assim também, o Guia Alimentar para a População Brasileira recomenda como base da alimentação saudável o consumo de alimentos *in natura* ou minimamente processados³².

Um estudo de Schröder e colaboradores³³ mostrou que dietas com alta densidade de energia estão diretamente relacionadas à adiposidade abdominal na juventude espanhola. Outra pesquisa realizada por Schröder e colaboradores³⁴ analisou o consumo de alimentos em grupos de meninos e meninas com três tipos de bebidas: grupo de meninos, “leite integral; “leite semidesnatado” e “refrigerante”; grupos de meninas, “leite integral”, “leite semidesnatado” e “suco”. Os autores relataram que o consumo da dieta com alta densidade energética foi característico do grupo que recebeu refrigerante. Esse grupo consumiu uma dieta de baixa qualidade e apresentou um risco ligeiramente maior de aumento da gordura abdominal comparado ao grupo de meninos que consumiu “leite integral”. Esses resultados estão em conformidade com outras pesquisas que mostraram que o consumo de refrigerante está associado com baixa ingestão de nutrientes, como fibras, e micronutrientes, como ácido fólico e cálcio, entre crianças e jovens³⁵⁻³⁸. Balcells e colaboradores³⁹ demonstraram que o consumo frequente de refrigerante aumenta o risco de baixa adesão à dieta do Mediterrâneo e foi relacionado com um conjunto de preferências alimentares pouco saudáveis. Semelhantes resultados foram relatados por estudos anteriores^{35, 36}.

O aumento de peso excessivo dos grupos que receberam dieta de cafeteria, como 60% a mais no grupo DC em comparação ao CON, pode ser explicado pela grande palatabilidade da dieta, que leva a um aumento no consumo total de sólidos e, conseqüentemente, um aumento no consumo de energia. Além disso, existe a influência da qualidade da dieta. Para

manter um estado de equilíbrio, o balanço de cada macronutriente parece possuir um rigoroso controle para ajustar seu consumo com a oxidação. O balanço de carboidratos e de nitrogênio é facilitado pela capacidade do organismo de ajustar as taxas de oxidação de glicose e de aminoácidos, respectivamente, em relação aos seus consumos alimentares. Já no caso de gorduras, o aumento no seu consumo não é oxidado na mesma proporção. Além disso, cerca de 96% do lipídeo ingerido pela dieta induz ao balanço lipídico positivo e é estocado como gordura corporal^{40,41}. No presente estudo, observou-se que a dieta de cafeteria foi responsável pelo aumento de 4,5 vezes no consumo de lipídeos nos grupos que a receberam se comparados aos grupos que receberam apenas ração padrão. Por consequência, o consumo de proteínas foi 50% menor nos animais que receberam a dieta de cafeteria.

Os animais submetidos à dieta de cafeteria consumiram quase três vezes mais sódio quando comparados aos grupos CON, RC e RNC. Esse resultado já era esperado, uma vez que os alimentos industrializados são ricos em sódio.

O uso de bebidas adoçadas com ingredientes que não proporcionam calorias é controverso segundo alguns autores. Este estudo verificou que, apesar de ter um consumo de alimentos sólidos e energia total serem semelhantes ao dos grupos DC e DC+RC, o grupo DC+RNC apresentou um IL significativamente menor, demonstrando menor deposição de gordura visceral. Os resultados deste estudo foram diferentes daqueles obtidos pelos trabalhos de Swithers e colaboradores⁴² e Feijó e colaboradores⁴³, que identificaram que a utilização de adoçantes artificiais provocou um aumento no ganho de peso corporal em relação ao grupo que recebeu sacarose, mas o consumo de energia total não foi significativamente diferente. Porém, Raben e colaboradores⁴⁴ observaram aumento de peso e gordura corporal em indivíduos que receberam bebidas e alimentos adoçados com sacarose, e ocorreu redução no peso corporal e na gordura corporal dos indivíduos que receberam bebidas e alimentos adoçados com edulcorantes. Assim também, Choi e colaboradores⁴⁵ encontraram menor ganho de peso em ratos que receberam bebida à base de cola e dieta rica em gordura quando comparados aos controles que receberam a mesma dieta, mas beberam água durante 28 semanas. O menor ganho de peso foi atribuído ao possível aumento da termogênese muscular induzido pela cafeína contida no refrigerante de cola.

O menor IL no grupo DC+RNC pode ter relação com o menor efeito insulínogênico do refrigerante não calórico devido à maior disponibilidade de cafeína presente na bebida e à redução de 17% de carboidrato em relação ao DC+RC. A cafeína possui efeito lipolítico por meio da estimulação da liberação da adrenalina pelas glândulas suprarrenais⁴⁶⁻⁴⁷, propiciando menor lipogênese. Um estudo de Zheng e colaboradores⁴⁸ relatou redução significativa no

ganho de peso e no depósito de gordura em animais que receberam ração padrão misturada com 0,05% de cafeína. Outros estudos demonstraram efeitos benéficos do consumo de cafeína na saúde e uma associação negativa da incidência de DM2, assim como auxiliar no controle do peso corporal⁴⁹.

A cafeína do refrigerante também pode ter influenciado os grupos que consumiram o refrigerante calórico. O grupo RC ingeriu 17% mais energia e 33% mais carboidrato que os grupos CON e RNC, porém não apresentou ganho de peso e IL estatisticamente diferentes. Esse resultado pode ser explicado pelo consumo diário de 8,54 mg de cafeína do refrigerante pelo RC, que corresponde a 68% a mais se comparado ao RNC. Assim também, no grupo DC+RC, a cafeína pode ter minimizado o efeito do consumo da sacarose do refrigerante calórico, pois os animais consumiram 28% mais carboidrato comparado aos animais dos grupos DC, mas não apresentaram maior ganho de peso e IL. O grupo DC+RC também ingeriu 17% mais carboidratos do que o DC+RNC, e o consumo de cafeína foi de 5,2 mg no grupo DC+RC, o que correspondeu a 38% mais comparado ao DC+RNC.

A cafeína é um derivado de metilxantina e um potente antagonista do receptor de adenosina, exercendo seus efeitos tanto em nível central quanto periféricamente por atravessar a barreira hematoencefálica. Estudos realizados em animais indicaram que as metilxantinas estão envolvidas no metabolismo da glicose mediado pela insulina e na capacidade de resposta à insulina em tecido adiposo e tecido muscular. Em ratos Zucker obesos, o antagonista do receptor de adenosina relacionado à cafeína, 1,3 dipropil-8- (acrílico) fenilxantina, inibiu a captação de glicose no tecido, enquanto foi observado o inverso no músculo esquelético⁵⁰. Ambos os efeitos foram atribuídos ao antagonismo do receptor da adenosina no local do tecido, pois o composto não atravessa a barreira hematoencefálica. Estudos que mostram que a adenosina ou os agonistas da adenosina aumentam a sensibilidade à insulina no tecido adiposo⁵¹ e no músculo cardíaco^{52,53} e diminuem a sensibilidade à insulina no músculo esquelético⁵⁴ apresentam resultados semelhantes a estes. Conseqüentemente, o efeito final do antagonismo do receptor de adenosina na captação da glicose, no corpo inteiro, é a soma total de todos os efeitos combinados e depende da quantidade relativa de músculo, de tecido adiposo e do grau de sensibilidade à insulina. Além do bloqueio do receptor de adenosina periférica, as metilxantinas que atravessam a barreira hematoencefálica, como a cafeína, também aumentam a liberação de catecolaminas, especialmente a adrenalina, que exerce uma atividade antagonista em relação à insulina, incluindo a inibição da captação da glicose periférica⁵⁵. Os efeitos da adrenalina no metabolismo da glicose são opostos aos da insulina e incluem a promoção da produção de

glicose hepática e a inibição da captação de glicose no músculo e no tecido adiposo. A cafeína também estimula a produção de ácidos graxos livres, quer como consequência da lipólise mediada por adrenalina ou por inibição da supressão da lipólise induzida por adenosina⁵⁶. Os ácidos graxos livres do plasma podem diminuir a absorção de glicose hepática e periférica e correlacionam-se negativamente com a sensibilidade à insulina⁵⁷.

CONCLUSÃO

Observando-se os resultados, pode-se concluir que, durante o período estudado e com a oferta de alimentação equilibrada, a ingestão de refrigerante calórico reduziu o consumo do alimento sólido e de água, aumentou o consumo de energia e aumentou o consumo de líquidos totais. Dessa forma, influenciou negativamente na quantidade e na qualidade dos alimentos sólidos ingeridos, causando um desequilíbrio nutricional. A ingestão de refrigerante não calórico não alterou a ingestão de alimentos nem o consumo de energia, mas induziu um maior consumo de líquidos e menor consumo de água. Ambos os refrigerantes não alteraram o peso corporal e a deposição de gordura visceral. Porém, os animais que receberam dieta de cafeteria consumiram mais os alimentos processados oferecidos e praticamente não ingeriram ração padrão, tornando sua alimentação de baixa qualidade e causando um aumento no consumo de energia proveniente dos açúcares e dos lipídios, maior ganho de peso e de gordura visceral. Por outro lado, os animais que receberam dieta de cafeteria e refrigerante não calórico apresentaram redução da gordura visceral em relação aos outros dois grupos que receberam dieta de cafeteria. Esse resultado sugere que o consumo da cafeína presente no refrigerante não calórico do tipo cola pode auxiliar na prevenção e no tratamento da obesidade, relacionado à ausência de sacarose e ao conteúdo da cafeína. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre os efeitos do consumo de refrigerante calórico e não calórico com dieta de cafeteria no metabolismo. Também é necessária a investigação do efeito da ingestão de bebidas açucaradas e com edulcorantes, porém sem cafeína, associadas à dieta de cafeteria.

REFERÊNCIAS

1. Milei J, Losada OM, Liambí HG et al. (2011) Chronic cola drinking induces metabolic and cardiac alterations in rats. *World J Cardiol* 3, 111-116.

2. Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE et al. (2003) Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet* 12, 2923-9.
3. Martinez JA, Corbalan MS, Sanchez-Villegas A et al. (2003) Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. *J Nutr*. 133, 2549-54.
4. Hill JO, Melanson EL. (1999) Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc* 31, 515-21.
5. Berthoud HR, Lenard NR, Shin AC. Food reward, hyperphagia, and obesity. (2011) *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, 1266-1277.
6. Hajnal A, Smith GP, Norgren R. (2004) Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, 31–37.
7. Smith GP. (2004) Accumbens dopamine mediates the rewarding effect of orosensory stimulation by sucrose. *Appetite* 43, 11–13.
8. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA et al. (2003) Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *The Journal of the American Medical Association* 289, 76–79.
9. Rosini TC, Ramos da Silva AS, Moraes C. (2012) Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras* 58, 383-387.
10. World Health Organization – WHO. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (acessado maio de 2015).
11. Tschop M, Heiman ML. (2001) Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109, 307-19.
12. Cony KV, Goularte JF, Sanvitto GL, Hagen MEK. Efeito do consumo de refrigerante sobre a ingestão alimentar em ratos. Trabalho de conclusão (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina, Porto Alegre, BR-RS, 2012, 53p.
13. Milagro, FI; Campón, J; Martinez, JA. (2006) Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity*, 14, 7, 1118-23.
14. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C et al. (2012) Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38, 189–196.
15. Ruyter JC, Olthof MR, Seidell JC et al. (2012) A Trial of Sugar-free or Sugar-Sweetened Beverages and Body Weight in Children. *N Engl J Med* 367, 1397-1406.

16. Allred, B.; Berntson, GG. (1986) Is euthanasia of rats by decapitation inhumane? *J Nutr*, 116, 1859-1861.
17. Derr RF. (1991) Pain perception in decapitated rat brain. *Life Sci*, 49, 1399-1402.
18. Bhathena SJ. (1992) Comparison of effects of decapitation and anesthesia on metabolic and hormonal parameters in Sprague-Dawley rats. *Life Sci*. 50, 1649-1655.
19. Malik VS, Schulze MB, Hu FB. (2006) Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 84, 274–88.
20. Morrill AC, Chinn CD. (2004) The Obesity Epidemic in the United States. *Journal of Public Health Policy*.
21. Smith GP. (2000) The controls of eating: a shift from nutritional homeostasis to behavioral neuroscience. *Nutrition* 16, 814-820.
22. Pan, A; Hu, F.B. (2011) Effects of carbohydrates on satiety: differences between liquid and solid food. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14, 385-390.
23. Funtikova AN, Subirana I, Gomez SF, et al. (2014) Soft Drink Consumption Is Positively Associated with Increased Waist Circumference and 10-Year Incidence of Abdominal Obesity in Spanish Adults. *American Society for Nutrition*, 10.3945.
24. Souza AM, Bezerra IN, Cunha DB e Sichieri R. (2011) Avaliação dos marcadores de consumo alimentar do Vigitel (2007-2009). *Rev Bras Epidemiol* 14, 44-52.
25. Sclafani A, Ackroff K. (2004) The relationship between food reward and satiation revisited. *Physiol Behav* 82, 89–95.
26. Widmaier EP, Raff H, Strang KT Vander. (2013) *Fisiologia Humana: os mecanismos das funções corporais*, 12ª ed, 594-597 RJ, Guanabara Koogan.
27. Mayer J, Thomas DW. (1967) Regulation of food intake and obesity. *Science* 156, 328-37.
28. Castro H, Pomar CA, Picó C, Sánchez J and Palou A. (2015) Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *International Journal of Obesity* 39, 430–437.
29. Akyol A, McMullen S and Langley-Evans SC. (2012) Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. *British Journal of Nutrition* 107, 964–978.
30. Pinto Júnior DAC, Seraphim PM. (2012) Cafeteria diet intake for fourteen weeks can cause obesity and insulin resistance in Wistar rats. *Rev Nutr* 25, 313-319.
31. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. (2006) Citokines, endothelial dysfunction and insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50, 304-12.

32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2ª Ed. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2014.
33. Schröder H, Mendez MA, Gomez SF et al. (2013) Energy density, diet quality, and central body fat in a nationwide survey of young Spaniards. *Nutrition* 29, 1350–1355.
34. Schröder H, Mendez MA, Ribas L et al. (2014) Caloric beverage drinking patterns are differentially associated with diet quality and adiposity among Spanish girls and boys. *Eur J Pediatr* 173, 1169–1177.
35. Ballew C, Kuester S, Gillespie C. (2000) Beverage choices affect adequacy of children's nutrient intakes. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154, 1148–1152.
36. Frary CD, Johnson RK, Wang MQ. (2004) Children and adolescents' choices of foods and beverages high in added sugars are associated with intakes of key nutrients and food groups. *J Adolesc Health* 34, 56–63.
37. Yamada M, Murakami K, Sasaki S et al. (2008) Soft drink intake is associated with diet quality even among Young Japanese women with low soft drink intake. *J Am Diet Assoc* 108, 1997–2004.
38. Libuda L, Alexy U, Buyken AE, et al. (2009) Consumption of sugar-sweetened beverages and its association with nutrient intakes and diet quality in German children and adolescents. *British J Nutrition* 101, 1549–1557.
39. Balcells E, Delgado-Noguera M, Pardo-Lozano R et al. (2011) Soft drinks consumption, diet quality and BMI in a Mediterranean population. *Public Health Nutrition* 14(5), 778–784.
40. Flatt JP. (1987) Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr* 45, 296-306.
41. Flatt JP. (1995) Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr* 61, 952-9.
42. Swithers SE; Davidson TL. (2008) A Role for Sweet Taste: Calorie Predictive Relations in Energy Regulation by Rats. *Behavioral Neuroscience* 122, 161-173.
43. Feijó FM, Ballard CR, Foletto KC, et al. (2013) Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite* 60, 203–207.
44. Raben A, Vasilaras TH, Moller AC et al. (2002) Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr* 76, 721–9.
45. Choi SB, Park CH, Park S. (2002) Effect of cola intake on insulin resistance in moderate fat-fed weaning male rats, *J Nutr Biochem*; 13:727–33.

46. Smits P, Pieters G, Thien T. (1986) The role of epinephrine in the circulatory effects of coffee. *Clin Pharmacol Ther* 40:431–437.
47. Hulston CJ, Jeukendrup AE. 2008. Substrate metabolism and exercise performance with caffeine and carbohydrate intake. *Med Sci Sport Exer* 40, 12, 2096-2104.
48. Zheng G, Sayama K, Okubo T et al. (2004) Anti-obesity Effects of Three Major Components of Green Tea, Catechins, Caffeine and Theanine, in Mice. *In vivo* 18, 55-62.
49. Heckman MA, Weil J, Demejia EG. (2010) Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *J Food Sci* 75, 3 R77-R87.
50. Crist GH, Xu B, LaNoue KF, Lang CH. (1998) Tissue-specific effects of in vivo adenosine receptor blockade on glucose uptake in Zucker rats. *FASEB J* 12:1301–1308.
51. Vannucci SJ, Nishimura H, Satoh S, Cushman SW, Holman GD, Simpson IA. (1992) Cell surface accessibility of GLUT4 glucose transporters in insulin-stimulated rat adipose cells: modulation by isoprenaline and adenosine. *Biochem J* 288:325–330.
52. Law WR, Raymond RM. (1988) Adenosine potentiates insulin-stimulated myocardial glucose uptake in vivo. *Am J Physiol* 254: H970–H975.
53. Wyatt DA, Edmunds MC, Rubio R, Berne RM, Lasley RD, Mentzer RMJr. (1989) Adenosine stimulates glycolytic flux in isolated perfused rat hearts by A1-adenosine receptors. *Am J Physiol* 257:H1952–H1957.
54. Budohoski L, Challiss RA, McManus B, Newsholme E. (1984) Effects of analogues of adenosine and methyl xanthines on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett* 167:1–4.
55. Deibert DC, DeFronzo RA. (1980) Epinephrine induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* 65:717–721.
56. Fredholm BB. (1978) Effect of adenosine, adenosine analogues and drugs inhibiting adenosine inactivation on lipolysis in rat fat cells. *Acta Physiol Scand* 102:191–198.
57. Andersson P, Lind L, Berne C, Berglund L, Lithell HO. (1999) Insulin-mediated vasodilation and glucose uptake are independently related to fasting serum nonesterified fatty acids in elderly men. *J Intern Med* 246:529–537.

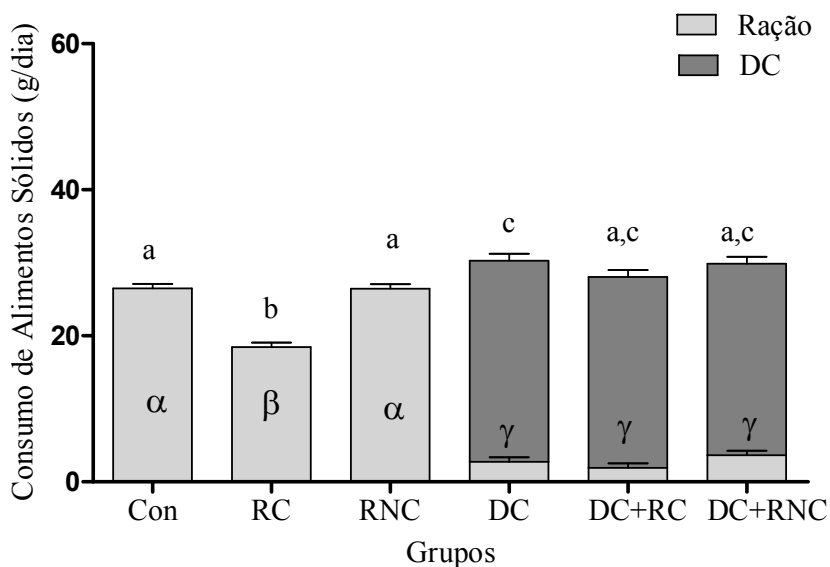


Figura 1 – Média de Consumo diário em gramas de ração, de dieta de cafeteria e de sólidos totais nas 12 semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm EP de dez animais por grupo. CON (controle); RC (refrigerante calórico); RNC (refrigerante não calórico); DC (dieta de cafeteria); DC+RC (dieta de cafeteria mais refrigerante calórico); DC+RNC (dieta de cafeteria mais refrigerante não calórico). α , β , γ Símbolos diferentes significam diferença estatística em relação ao consumo de ração padrão e **a,b,c** Letras diferentes significam diferença estatística em relação ao consumo de alimentos sólidos totais ($P < 0,001$; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls).

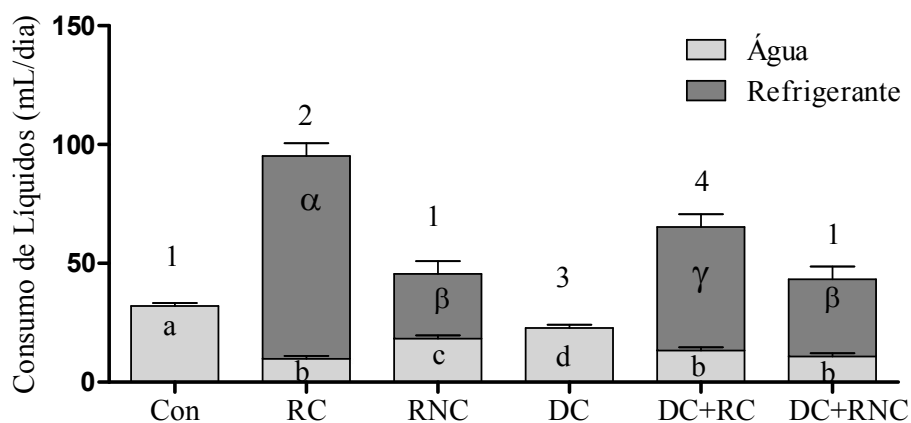


Figura 2 – Média de Consumo diário em miligramas de líquidos por animal nas 12 semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm EP de dez animais por grupo. CON (controle); RC (refrigerante calórico); RNC (refrigerante não calórico); DC (dieta de cafeteria); DC+RC (dieta de cafeteria mais refrigerante calórico); DC+RNC (dieta de cafeteria mais refrigerante não calórico). **a,b,c,d** Letras diferentes significam diferença estatística em relação ao consumo de água; **α, β, γ** Símbolos diferentes significam diferença estatística em relação ao consumo de refrigerante e 1,2,3,4 Números diferentes significam diferença significativa no consumo de líquidos totais ($P < 0,001$; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls).

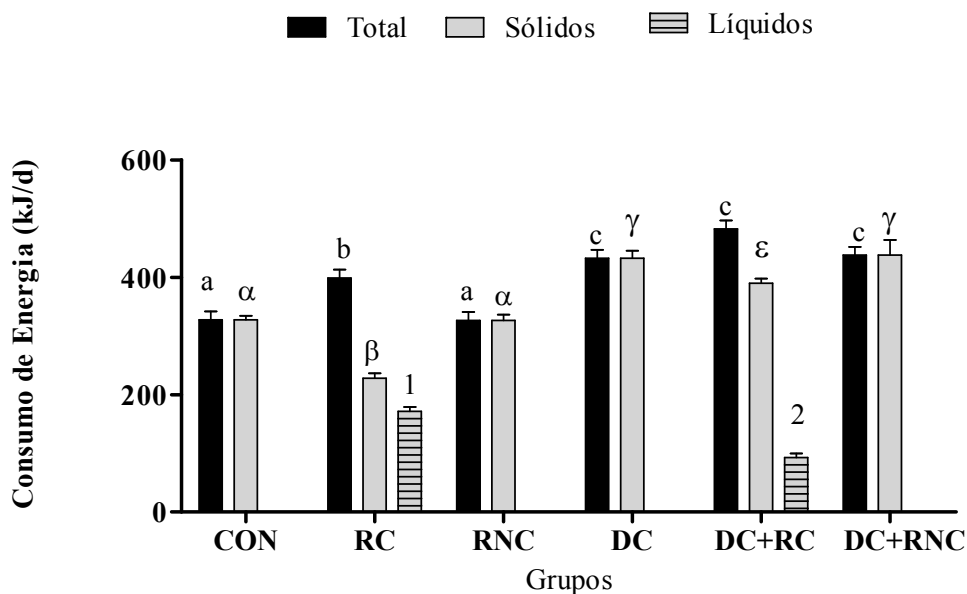


Figura 3 - Média de consumo diário de energia dos líquidos e dos alimentos sólidos está representado como média diária em kilojoules por animal nas 12 semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm EP de dez animais por grupo. CON (controle); RC (refrigerante calórico); RNC (refrigerante não calórico); DC (dieta de cafeteria); DC+RC (dieta de cafeteria mais refrigerante calórico); DC+RNC (dieta de cafeteria mais refrigerante não calórico). α , β , γ , ϵ Símbolos diferentes significam diferença estatística em relação ao consumo de energia total; **a,b,c** Letras diferentes significam diferença estatística em relação ao consumo de energia de alimentos sólidos totais e 1,2 Números diferentes significam diferença significativa no consumo de energia do refrigerante ($P < 0,001$; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls. O teste t de Student foi utilizado para comparar o consumo de energia entre os grupos que receberam o refrigerante calórico).

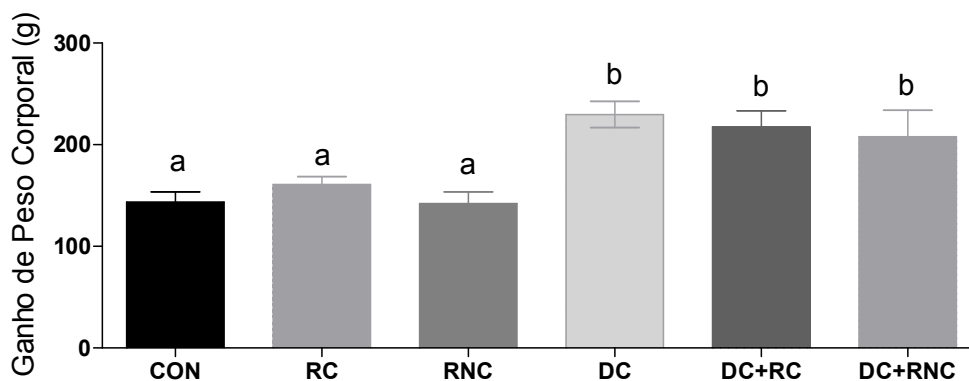


Figura 4 - Ganho de peso corporal no final do experimento (12 semanas). Dados expressos em média \pm EP de dez animais por grupo. CON (controle); RC (refrigerante calórico); RNC (refrigerante não calórico); DC (dieta de cafeteria); DC+RC (dieta de cafeteria + refrigerante calórico); DC+RNC (dieta de cafeteria + refrigerante não calórico). a, b Letras diferentes significam diferença estatística ($P < 0,001$; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls post-hoc).

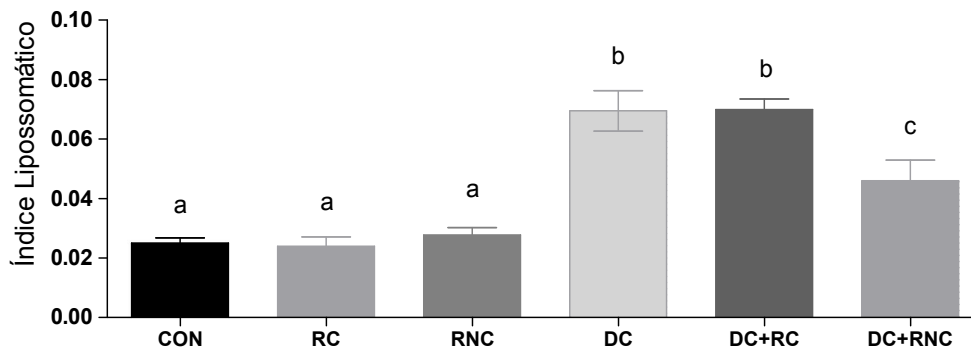


Figura 5 - Índice Lipossomático no final do experimento (12 semanas). Dados expressos em média \pm EP de dez animais por grupo. IL= total de tecido adiposo visceral dividido pelo peso corporal. CON (controle); RC (refrigerante calórico); RNC (refrigerante não calórico); DC (dieta de cafeteria); DC+RC (dieta de cafeteria + refrigerante calórico); DC+RNC (dieta de cafeteria + refrigerante não calórico). a, b, c Letras diferentes significam diferença estatística ($P < 0,001$; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela 4. Consumo médio de nutrientes das 12 semanas de tratamento

	CON (n 10)	EP	RC (n 10)	EP	RNC (n 10)	EP	DC (n 10)	EP	DC+RC (n 10)	EP	DC+RNC (n 10)	EP
CHO Sól. (g)	14,6 ^a	0,3	10,2 ^b	0,4	14,5 ^a	0,4	12,5 ^c	0,5	10,6 ^b	0,4	13,3 ^{a,c}	0,9
CHO Líq. (g)	-	-	9,3 ^a	0,7	-	-	-	-	5,5 ^b	0,3	-	-
CHO Total (g)	14,6 ^{a,c}	0,3	19,5 ^b	0,5	14,5 ^{a,c}	0,4	12,5 ^a	0,5	16,1 ^c	0,6	13,3 ^a	0,9
PTN (g)	5,8 ^a	0,12	4,1 ^b	0,15	5,8 ^a	0,17	2,9 ^c	0,16	2,7 ^c	0,19	2,9 ^c	0,12
LIP (g)	1,06 ^a	0,02	0,7 ^a	0,02	1,06 ^a	0,03	4,8 ^b	0,2	4,4 ^b	0,12	4,5 ^b	0,2
Sódio Sólidos (mg)	71,6 ^a	1,5	49,9 ^a	1,8	71,4 ^a	2,1	180,7 ^b	10,9	189,6 ^b	13,7	161 ^b	8,7
Sódio Líquidos (mg)	-	-	4,3 ^a	0,3	3,8 ^a	0,3	-	-	2,8 ^b	0,3	4,5 ^a	0,3
Sódio Total (mg)	71,6 ^a	1,5	54,3 ^a	1,6	75,2 ^a	2,3	180,7 ^b	10,9	192,4 ^b	13,7	165,5 ^b	8,9
Caféina (mg)	-	-	8,54 ^a	0,9	2,72 ^b	0,6	-	-	5,2 ^c	0,8	3,24 ^b	1,5

CON (controle); RC (refrigerante calórico); RNC (refrigerante não calórico); DC (dieta de cafeteria); DC+RC (dieta de cafeteria e refrigerante calórico); DC+RNC (dieta de cafeteria e refrigerante não calórico). ^{a,b,c} Letras diferentes representam diferença significativa (P<0,05; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls ou Teste t Student para carboidratos do líquido).

ANEXO 1

Normas para publicação

Directions to Contributors

British Journal of Nutrition

(Revised April 2014)

The *British Journal of Nutrition* is an international peer-reviewed journal that publishes original papers and review articles in all branches of nutritional science. The underlying aim of all work should be to develop nutritional concepts.

[Please note that URLs cited in this document may not work with all internet browsers. It is recommended that URLs are copied and pasted into the browser address bar]

The publication remit of the journal. The *British Journal of Nutrition* encompasses the full spectrum of nutritional science and reports of studies in the following areas will be considered for publication: Epidemiology, dietary surveys, nutritional requirements and behaviour, metabolic studies, body composition, energetics, appetite, obesity, ageing, endocrinology, immunology, neuroscience, microbiology, genetics and molecular and cell biology.

The journal does not publish papers on the following topics: Case studies; papers on food technology, food science or food chemistry; studies of primarily local interest; papers on pharmaceutical agents or substances that are considered primarily as medicinal agents; studies in which a nutrient or extract is administered by a route other than orally (unless the specific aim of the study is to investigate parenteral nutrition) nor studies using supra-physiological amounts of nutrients (unless the specific aim of the study is to investigate toxic effects).

Guidelines on studies reporting *in vivo* or *in vitro* models. Studies involving animal models of human nutrition and health or disease will be considered for publication provided that the amount of a nutrient or combination of nutrients used could reasonably be expected to be achieved in humans.

Studies involving *in vitro* models will be considered for publication provided that the amount of a nutrient or combination of nutrients is within the range that could reasonably be expected to be encountered *in vivo* and that the molecular form of the nutrient or nutrients is the same as what the cell type used in the model would encounter *in vivo*.

Guidelines on studies reporting the effects of extracts. Studies involving extracts will be considered for publication provided that the source of starting material is readily accessible to other researchers and that there are appropriate measures for quality control, that the method of extraction is described in sufficient detail with appropriate quality control measures, that the nutrient composition of the extract is characterised in detail and that there are measures to control the quality of the composition of the extract between preparations, and that the amount of extract used could reasonably be expected to be achieved in humans (or in animals if they are the specific target of an intervention).

Studies involving extracts in *in vitro* models will be considered for publication provided that the above guidelines for studies involving extracts are followed and that the amount and molecular form of the extract is the same as that which would be encountered by the cell type used in the model *in vivo*.

Ethical standards for studies involving humans or other vertebrate animals

Experiments involving human subjects. The notice of contributors is drawn to the guidelines in the World Medical Association (2000) Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, with notes of clarification of 2002 and 2004 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>), the *Guidelines on the Practice of Ethics Committees Involved in Medical Research Involving Human Subjects* (3rd ed., 1996; London: The Royal College of Physicians) and the Guidelines for the ethical conduct of medical research involving children, revised in 2000 by the Royal College of Paediatrics and Child Health: Ethics Advisory Committee (*Arch Dis Child* (2000) **82**, 177–182). A paper describing any experimental work on human subjects must include the following statement in the materials/methods section: "This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the [insert name of the ethics committee; a specific ethics number may be inserted if you wish]. Written [or Verbal] informed consent was obtained from all subjects/patients. [Where verbal consent was obtained this must be followed by a statement such as: Verbal consent was witnessed and formally recorded]."

Experiments involving the use of other vertebrate animals. Papers that report studies involving vertebrate animals must conform to the 'ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research' detailed in Kilkenny *et al.* (*J Pharmacol Pharmacother* (2010) **1**,94-99) and summarised at www.nc3rs.org.uk. Authors must ensure that their manuscript conforms to the checklist that is available from the nc3Rs website. The attention of authors is drawn particularly to the ARRIVE guidelines point 3b ('Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology', point 9c ('Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment') and point 17a ('Give details of all important adverse events in each experimental group'). The Editors will not accept papers reporting work carried out using inhumane procedures, or

experiments that have not been reviewed and approved by an animal experimentation ethics committee. When reporting on experiments involving the use of vertebrate animals, authors must state the institutional and national guidelines for the care and use of animals that were followed and that all experimental procedures involving animals were approved by the [insert name of the ethics committee or other approving body; wherever possible authors should also insert a specific ethics/approval number].

General guidelines

As a contributor you must follow the guidelines set out below. Prospective authors may contact the Publications Office directly on +44 (0)1223 347954 (telephone) or bjn.edoffice@cambridge.org (email).

Papers submitted for publication must be written in English and be as concise as possible. If English is not the first language of the authors, then the paper should be checked by an English speaker. It is the responsibility of the author to ensure that the use of English in a manuscript meets the required standard for publication. **The *British Journal of Nutrition* operates an on-line submission and reviewing system (eJournalPress). Authors should submit to the following address: <http://bjn.msubmit.net/>** Receipt of papers will be acknowledged immediately.

Papers should be accompanied by a cover letter including a statement of acceptance of the conditions laid down in the Directions to Contributors. The statement must affirm that the submission represents original work that has not been published previously, that it is not currently being considered by another journal, and that if accepted for the *British Journal of Nutrition* it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Nutrition Society. It should also confirm that each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript. **At the time of acceptance the authors should provide a completed copy of the ‘Licence to Publish’ (in lieu of copyright transfer), which is available on the Nutrition Society’s web pages (<http://www.nutritionociety.org/publications/nutrition-society-journals/british-journal-of-nutrition>); the Society no longer requires copyright of the material published in the journal, only a ‘Licence to Publish.’ The authors or their institutions retain the copyright.**

Conflicts of interest and contributions of funding organisations

The manuscript must include statements reporting any conflicts of interest, all sources of funding and the contribution of each author to the manuscript. These statements should be placed at the end of the text of the manuscript before the references are listed, as instructed below.

This journal adheres to the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on research and publications ethics <http://publicationethics.org/resources/guidelines>

Types of papers published by the *British Journal of Nutrition*

The *British Journal of Nutrition* publishes the following: Full Papers, Review Articles, Systematic Reviews, Horizons in Nutritional Science, Workshop Reports, Invited Commentaries, Letters to the Editor/Nutrition Discussion Forums, Obituaries, and Editorials.

Full Papers, Reviews, Systematic Reviews, Horizons Articles and Workshop Reports should be submitted to: <http://bjn.msubmit.net/> Please contact the Publications Office on edoffice@nutsoc.org.uk regarding any other types of article. Articles reporting randomised trials must conform to the standards set by the Consolidated Standards of Reporting Trials consortium <http://www.consort-statement.org/>. Studies reporting the findings of microarray analyses must comply with the “Minimum Information about a Microarray Experiment” (MIAME) guidelines (<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>) and the data must be deposited in a publically accessible repository.

Review Articles The BJN is willing to accept critical reviews that are designed to advance knowledge, policy and practice in nutritional science. Current knowledge should be appropriately contextualised and presented such that knowledge gaps and research needs can be characterised and prioritised, or so that changes in policy and practice can be proposed along with suggestions as to how any changes can be monitored. The purpose or objective of a review should be clearly expressed, perhaps as question in the Introduction, and the review’s conclusions should be congruent with the initial objective or question. Reviews will be handled by specialist Reviews Editors. Please contact the Publications Office with any queries regarding the submission of potential review articles. All reviews, including systematic reviews and meta-analyses should present the uncertainties and variabilities associated with the papers and data being reviewed; in particular the BJN cautions against uncritical acceptance of definitions and non-specific global terminology, the advice of advisory bodies, and reference ranges for example.

Reviews. These articles are written in a narrative style which aim to critically evaluate a specific topic in nutritional science.

Horizons in Nutritional Science. These are shorter than Review articles and aim to critically evaluate recent novel developments which are likely to produce substantial advances in nutritional science. These articles should be thought-provoking and possibly controversial.

Systematic Reviews and meta-analyses. The journal endorses the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement, a guideline to help authors report a systematic review and meta-analysis <http://prisma-statement.org> (see *British Medical Journal* (2009) **339**, b2535). A systematic review or meta-analysis of randomised trials and other evaluation studies should follow the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (<http://prisma-statement.org>).

Letters to the Editor/Nutrition Discussion Forum. Letters are invited that discuss, criticise or develop themes put forward in papers published in the *British Journal of Nutrition* or that deal with matters relevant to it. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue.

Revision of manuscripts following review. When substantial revisions are required to manuscripts, authors are normally given the opportunity to do this once only; the need for any further changes should at most reflect only minor issues. If a paper requiring revision is not resubmitted within 2 months, it may, on resubmission, be deemed a new paper and the date of receipt altered accordingly.

Form of full papers submitted for publication. The onus of preparing a paper in a form suitable for sending to press lies with the author. Authors are advised to consult a current issue in order to make themselves familiar with the *British Journal of Nutrition* as to typographical and other conventions, layout of tables etc. Sufficient information should be given to permit repetition of the published work by any competent reader of the *British Journal of Nutrition*. The requirements of *British Journal of Nutrition* are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), and authors are encouraged to consult the latest guidelines, which contain a lot of useful generic information about preparing scientific papers <http://www.icmje.org/>.

Plagiarism: Text taken directly or closely paraphrased from earlier published work that has not been acknowledged or referenced will be considered plagiarism. Submitted manuscripts in which such text is identified will be withdrawn from the editorial process. If a concern is raised about possible plagiarism in an article published in the *British Journal of Nutrition*, this will be investigated fully and dealt with in accordance with the Committee on Publication Ethics guidelines ([www.http://publicationethics.org/](http://publicationethics.org/)).

Authors are invited to nominate up to four potential referees who may then be asked by the Editorial Board to help review the work.

Typescripts should be prepared with 1.5 line spacing and wide margins (2 cm), the preferred font being Times New Roman size 12. At the ends of lines words should not be hyphenated unless hyphens are to be printed. Line numbering and page numbering is required.

Spelling should generally be that of the *Concise Oxford Dictionary* (1995), 9th ed. Oxford: Clarendon Press. Papers should normally be divided into the following parts:

(a) **Title page:** authors' names should be given without titles or degrees and one forename may be given in full. The name and address of the institution where the work was performed should be given, as well as the main address for each author. The name and address of the author to whom correspondence should be sent should be clearly stated, together with telephone and fax numbers and email address. Other authors should be linked to their address using superscript Arabic numerals. Any necessary descriptive material about the authors, e.g. Beit Memorial Fellow, should appear at the end of the paper in the Acknowledgments.

Authorship. Although discretion is allowed, authors must fulfill the criteria set out by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>) and described by as follows by Calder (*Br J Nutr* (2009) **101**, 775). Authors should meet each of the following requirements by substantial contributions to '(a) the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) the drafting the article or revising it critically for important intellectual content; (c) final approval of the version to be published'. The contribution of individuals who were involved in the study, but do not meet these criteria should be acknowledged in the Acknowledgments section.

If the paper is one of a series of papers that have a common main title followed by a subtitle specific to the individual paper, numbering should not be used to indicate the sequence of papers. The format should be 'common title: specific subtitle', with a short common title, e.g. Partitioning of limiting protein and energy in the growing pig: testing quantitative rules against experimental data.

The title page should also contain a shortened version of the paper's title, not exceeding forty-five letters and spaces in length, suitable for use as a running title in the published paper.

Authors are asked to supply three or four key words or phrases (each containing up to three words) on the title page of the typescript.

(b) **Abstract:** each paper must open with an abstract of **not more than 250 words**. The abstract should be a single paragraph of continuous text outlining the aims of the work, the experimental approach taken, the principal results and the conclusions and their relevance to nutritional science.

(c) **Introduction:** it is not necessary to introduce a paper with a full account of the relevant literature, but the introduction should indicate briefly the nature of the question asked and the reasons for asking it. It should be **no longer than two pages**.

(d) **Experimental methods:** methods should appear after the introduction. The methods section must include a subsection that describes the methods used for statistical analysis (see the section on statistical analysis below) and the sample size must be justified by the results of appropriate calculations and related to the study outcomes.

All analytical procedures must be accompanied by a statement of within and between assay precision.

(e) **Results:** these should be given as concisely as possible, using figures or tables as appropriate. Data must not be duplicated in tables and figures.

(f) *Discussion*: while it is generally desirable that the presentation of the results and the discussion of their significance should be presented separately, there may be occasions when combining these sections may be beneficial. Authors may also find that additional or alternative sections such as 'conclusions' may be useful. The discussion should be **no longer than five pages**.

(g) *Acknowledgments*: here you may acknowledge individuals or organizations that provide advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

(h) *Financial Support*: please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. This is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis; all such support must be disclosed here and if no such support was received this must be stated. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors." In addition to the source of financial support, please state whether the funder contributed to the study design, conduct of the study, analysis of samples or data, interpretation of findings or the preparation of the manuscript. If the funder made no such contribution, please provide the following statement: "[Funder's name] had no role in the design, analysis or writing of this article."

(i) *Conflict of Interest*: Conflict of interest exists when an author has interests that might inappropriately influence his or her judgement, even if that judgement is not influenced; for further detail, see http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html. Because of this, authors must disclose potentially conflicting interests so that others can make judgements about such effects. At the time of submission authors should disclose any financial arrangements or connections they may have that are pertinent to the submitted manuscript and that may be perceived as potentially biasing their paper. Non-financial interests that could be relevant in this context should also be disclosed. If there are no interests to declare, the title should be inserted followed by "None".

(j) *Authorship*: Please provide a very brief description of the contribution of each author to the research. Their roles in formulating the research question(s), designing the study, carrying it out, analysing the data and writing the article should be made plain.

(k) *References*: these should be given in the text using the Vancouver system. They should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text using superscript Arabic numerals in parentheses, e.g. 'The conceptual difficulty of this approach has recently been highlighted^(1,2-4)'. If a reference is cited more than once the same number should be used each time. References cited only in tables and figure legends and not in the text should be numbered in sequence from the last number used in the text and in the order of mention of the individual tables and figures in the text. At the end of the paper, on a page(s) separate from the text, references should be listed in numerical order. When an article has more than three authors only the names of the first three authors should be given followed by 'et al.'. The issue number should be omitted if there is continuous pagination throughout a volume. Names and initials of authors of unpublished work should be given in the text as 'unpublished results' and not included in the References. Titles of journals should appear in their abbreviated form using the NCBI LinkOut page <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/linkout/journals/jourlists.fcgi?typeid=1&type=journals&operation>Show> References to books and monographs should include the town of publication and the number of the edition to which reference is made. Thus:

1. Setchell KD, Faughnan MS, Avades T *et al.* (2003) Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **77**, 411–419.
2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C *et al.* (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **ii**, 577–580.
3. Forchielli ML & Walker WA (2005) The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* **93**, Suppl. 1, S41–S48.
4. Bradbury J, Thomason JM, Jepson NJA *et al.* (2003) A nutrition education intervention to increase the fruit and vegetable intake of denture wearers. *Proc Nutr Soc* **62**, 86A.
5. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal FJ *et al.* (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E827–E847.
6. Han KK, Soares JM Jr, Haidar MA *et al.* (2002) Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obst Gynecol* **99**, 389–394.
7. Uhl M, Kassie F, Rabot S *et al.* (2004) Effect of common Brassica vegetables (Brussels sprouts and red cabbage) on the development of preneoplastic lesions induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in liver and colon of Fischer 344 rats. *J Chromatogr* **802B**, 225–230.
8. Hall WL, Vafeiadou K, Hallund J *et al.* (2005) Soy isoflavone enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. *Am J Clin Nutr* (In the Press).

9. Skurk T, Herder C, Kraft I *et al.* (2004) Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology* (Epublication ahead of print version).
 10. Skurk T, Herder C, Kraft I *et al.* (2005) Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology* **146**, 1006–1011; Epublication 2 December 2004.
 11. Bradbury J (2002) Dietary intervention in edentulous patients. PhD Thesis, University of Newcastle.
 12. Ailhaud G & Hauner H (2004) Development of white adipose tissue. In *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology*, 2nd ed., pp. 481–514 [GA Bray and C Bouchard, editors]. New York: Marcel Dekker.
 13. Bruinsma J (editor) (2003) *World Agriculture towards 2015/2030: An FAO Perspective*. London: Earthscan Publications.
 14. Griinari JM & Bauman DE (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol. 1, pp. 180–200 [MP Yurawecz, MM Mossoba, JKG Kramer, MW Pariza and GJ Nelson, editors]. Champaign, IL: AOCS Press.
 15. Henderson L, Gregory J, Irving K *et al.* (2004) *National Diet and Nutrition Survey: Adults Aged 19 to 64 Years*. vol. 2: *Energy, Protein, Fat and Carbohydrate Intake*. London: The Stationery Office.
 16. International Agency for Research on Cancer (2004) *Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates and Indoles*. *IARC Handbooks of Cancer Prevention* no. 9 [H Vainio and F Bianchini, editors]. Lyon, France: IARC Press.
 17. Linder MC (1996) Copper. In *Present Knowledge in Nutrition*, 7th ed., pp. 307–319 [EE Zeigler and LJ Filer Jr, editors]. Washington, DC: ILSI Press.
 18. World Health Organization (2003) *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series* no. 916. Geneva: WHO.
 19. Keiding L (1997) *Astma, Allergi og Anden Overfølsomhed i Danmark – Og Udviklingen 1987–1991 (Asthma, Allergy and Other Hypersensitivities in Denmark, 1987–1991)*. Copenhagen, Denmark: Dansk Institut for Klinisk Epidemiologi.
- References to material available on websites should include the full Internet address, and the date of the version cited. Thus:
20. Department of Health (1997) Committee on Toxicity of Chemicals in Food Consumer Products and the Environment. Statement on vitamin B₆ (pyridoxine) toxicity. <http://www.open.gov.uk/doh/hef/B6.htm>
 21. Kramer MS & Kakuma R (2002) *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding: A Systematic Review*. Rome: WHO; available at http://www.who.int/nut/documents/optimal_duration_of_exc_bfeeding_review_eng.pdf
 22. Hooper L, Thompson RL, Harrison RA *et al.* (2004) Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 4, CD003177. <http://www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsysrev/articles/CD003177/frame.html>
 23. Nationmaster (2005) HIV AIDS – Adult prevalence rate. http://www.nationmaster.com/graph-T/hea_hiv_aid_adu_pre_rat (accessed June 2005).
- (I) *Supplementary data*: Additional data (e.g. data files, large tables) relevant to the paper can be submitted for publication online only, where they are made available via a link from the abstract and the paper. The paper should stand alone without these data. Supplementary data should be supplied as a PDF for the review process and must be cited in a relevant place in the text of the paper.

Mathematical modelling of nutritional processes. Papers in which mathematical modelling of nutritional processes forms the principal element will be considered for publication provided: (a) they are based on sound biological and mathematical principles; (b) they advance nutritional concepts or identify new avenues likely to lead to such advances; (c) assumptions used in their construction are fully described and supported by appropriate argument; (d) they are described in such a way that the nutritional purpose is clearly apparent; (e) the contribution of the model to the design of future experimentation is clearly defined.

Units. Results should be presented in metric units according to the International System of Units (see Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, 3rd ed. (2007) Cambridge: RSC Publishing), and Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences (1972) London: The Royal Society – as reproduced in *Proceedings of the Nutrition Society* (1972) **31**, 239–247). SI units should be used throughout the paper. The author will be asked to convert any values that are given in any other form. The only exception is where there is a unique way of expressing a particular variable that is in widespread use. Energy values must be given in Joules (MJ or kJ) using the conversion factor 1 kcal = 4.184 kJ. If required by the author, the value in kcal can be given afterwards in parentheses. Temperature is given in degrees Celsius (°C). Vitamins should be given as mg or µg, not as IU. For substances of known molecular mass (Da) or relative molecular mass, e.g. glucose, urea, Ca, Na, Fe, K, P, values should be expressed as mol/l; for substances of indeterminate molecular mass (Da) or relative molecular mass, e.g. phospholipids, proteins, and for trace elements, e.g. Cu, Zn, then g/l should be used. Time. The 24 h clock should be used, e.g. 15.00 hours. Units are: year, month, week, d, h, min, s, kg, g, mg, µg, litre, ml, µl, fl. To avoid misunderstandings, the word litre should be used in full, except in terms like g/l. Radioactivity should be given in becquerels (Bq or GBq) not in Ci. 1 MBq = 27.03 µCi (1Bq = 1 disintegration/s).

Statistical treatment of results. Data from individual replicates should not be given for large experiments, but may be given for small studies. The methods of statistical analysis used should be described, and references to statistical analysis packages included in the text, for example: Statistical Analysis Systems statistical software package version 6.11 (SAS

Institute, Cary, NC, USA). The description should provide enough information for a statistician with access to the data to reproduce the results presented. Information such as analysis of variance tables should be given in the paper only if they are relevant to the discussion. A statement of the number of replicates, their average value and some appropriate measure of variability is usually sufficient. Authors must state whether their data follow a Gaussian distribution or not, and the choice of statistical tests must be consistent with the distribution of the data.

Justification for the sample size must be given. If the study is based on a power calculation, details of this should be provided including the desired effect size and power as well as the estimate of variability that was used. Comparisons between means can be made by using either confidence intervals (CI) or significance tests. The most appropriate of such measures is usually the standard error of a difference between means (SED) or the standard errors of the means (SEM). The SEM represents the uncertainty associated with the estimation of a given mean and is not directly related to the SED or comparisons among means in mixed models as it is in fixed effects models. The SED estimates the uncertainty associated with the difference between two means; because it is used in various mean comparisons tests, SED can be implied within the tests *per se*. The standard deviation (SD) is more useful only when there is specific interest in the variability of individual values and no treatment means are being compared. The sample size (n per treatment) should also be stated in text or in the table. Standard analysis of variance assumes homogeneous variance. Unless there is heterogeneous variance, as tested by an appropriate statistic, or there is unequal n, a pooled SEM or SED simplifies tables and is preferred. The number of decimal places quoted should be sufficient but not excessive. If data transformations are being used, text should clearly state which variables have been transformed in which way and how that was decision was reached (e.g., tests for normality, diagnostic plots).

Authors should consider whether their study is rather of explorative (hypothesis-generating) or confirmative (hypothesis-testing) nature. This is particularly important when results from multiple tests are being presented, which can be the case when various treatments are being compared, multiple endpoints are considered, or different subgroups are being analysed. Such multiple testing issues occur often in exploratory studies, and authors should take care not to overstate findings in these situations. At least the number of significant results should be compared to the number of tests compared, where 1 in 20 findings would be expected by chance alone. Methods that control certain error rates (experiment-wise error rate, false discovery rate, etc...) such as post-hoc tests can be used in this context, but are not obligatory, as long as the exploratory nature of the results is made clear. In confirmative studies, pre-planned comparisons or primary endpoints should be stated upfront and analysed by appropriate tools such as contrast testing for pre-planned comparisons. Unnecessary multiple testing corrections with respect to secondary comparisons or endpoints should be avoided to not compromise the power of the study.

Measurements on the same experimental unit over time or in different sections of tissue generally are not independent. If the repeated measures are taken from the same animal or human subject, which are expected to be randomly chosen to represent a population, an appropriate mixed model should be fitted while investigating the best covariance of error structures. All major statistical software packages offer a wide variety of structures; the one chosen should be stated.

If comparisons between means are made using CI, the format for presentation is, e.g. 'difference between means 0.73 (95 % CI 0.314, 1.36) g'. If significance tests are used, a statement that the difference between the means for two groups of values is (or is not) statistically significant should include the level of significance attained, preferably as an explicit *P* value (e.g. $P=0.016$ or $P=0.32$) rather than as a range (e.g. $P<0.05$ or $P>0.05$). It should be stated whether the significance levels quoted are one-sided or two-sided (when relevant). Where a multiple comparison procedure is used, a description or explicit reference should be given. Where appropriate, a superscript notation may be used in tables to denote levels of significance; similar superscripts should denote lack of a significant difference.

When the method of analysis is unusual, or if the experimental design is at all complex, further details (e.g., experimental plan, raw data, confirmation of assumptions, analysis of variance tables, etc.) should be included. Adequate detail should be provided for a subsequent reader to interpret and potentially repeat the approach used. For example, the statistical model should be provided or described in adequate detail, and all blocking factors and criteria should be provided. Regressions should provide appropriate estimates of parameter uncertainty (not necessarily provided by graphing software).

Figures. Figures should not be incorporated into the article file and should be supplied as separate electronic files. Figure legends should be grouped in a section at the end of the text. Each figure should be clearly marked with its number and separate panels within figures should be clearly marked (a), (b), (c) etc. so that they are easily identifiable when the article and figure files are merged for review.

In curves presenting experimental results the determined points should be clearly shown, the symbols used being, in order of preference, ○, ●, △, ▲, □, ■, ×, +. Curves and symbols should not extend beyond the experimental points. Scale-marks on the axes should be on the inner side of each axis and should extend beyond the last experimental point. Ensure that lines and symbols used in graphs and shading used in histograms are large enough to be easily identified when the figure is reduced to fit the printed page.

Figures and diagrams can be prepared using most applications but please do not use the following: cdx, chm, jnb or PDF. All figures should be numbered and legends should be provided. Each figure, with its legend, should be comprehensible without reference to the text and should include definitions of abbreviations. Latin names for unusual species should be included unless they have already been specified in the text. Each figure will be positioned near the point in the text at which it is first introduced unless instructed otherwise.

If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect Author Charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Image integrity. Images submitted with a manuscript should be minimally processed (e.g. the addition of labelling). Authors should retain their original data, as Editors may request them for comparison during manuscript review. If such data are unavailable the manuscript may be withdrawn from the review process. Submitted manuscripts in which there appear to be manipulation of images will be withdrawn from the editorial process.

Some image processing is acceptable (and may be unavoidable), but the final image must accurately represent the original data. Authors should provide sufficient detail of image-gathering procedures and process manipulation in the Methods sections to enable the accuracy of image presentation to be assessed. Grouping or cropping of images must be identified in the legend and indicated by clear demarcation. Adjustment of brightness, contrast or colour balance is acceptable if applied to the whole image and to controls and if data do not disappear as the result of the manipulation. If a concern is raised about possible image manipulation in an article published in the *British Journal of Nutrition*, this will be investigated fully and dealt with in accordance with the Committee on Publication Ethics guidelines ([www.http://publicationethics.org/](http://publicationethics.org/)).

Plates. The *British Journal of Nutrition* will also consider the inclusion of illustrations and photomicrographs. The size of photomicrographs may have to be altered in printing; in order to avoid mistakes the magnification should be shown by scale on the photograph itself. The scale with the appropriate unit together with any lettering should be drawn by the author, preferably using appropriate software.

Tables. Tables should carry headings describing their content and should be comprehensible without reference to the text. Tables should not be subdivided by ruled lines. The dimensions of the values, e.g. mg/kg, should be given at the top of each column. Separate columns should be used for measures of variance (SD, SE etc.), the \pm sign should not be used. The number of decimal places used should be standardized; for whole numbers 1.0, 2.0 etc. should be used. Shortened forms of the words weight (wt) height (ht) and experiment (Expt) may be used to save space in tables, but only Expt (when referring to a specified experiment, e.g. Expt 1) is acceptable in the heading.

Footnotes are given in the following order: (1) abbreviations, (2) superscript letters, (3) symbols. Abbreviations are given in the format: RS, resistant starch. Abbreviations appear in the footnote in the order that they appear in the table (reading from left to right across the table, then down each column). Abbreviations in tables must be defined in footnotes. Symbols for footnotes should be used in the sequence: *†‡§||¶, then ** etc. (omit * or †, or both, from the sequence if they are used to indicate levels of significance).

For indicating statistical significance, superscript letters or symbols may be used. Superscript letters are useful where comparisons are within a row or column and the level of significance is uniform, e.g. ^{a,b,c}Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$). Symbols are useful for indicating significant differences between rows or columns, especially where different levels of significance are found, e.g. 'Mean values were significantly different from those of the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ '. The symbols used for P values in the tables must be consistent.

Tables should be placed at the end of the text. Each table will be positioned near the point in the text at which it is first introduced unless instructed otherwise.

Please refer to a recent copy of the journal for examples of tables.

Chemical formulas. These should be written as far as possible on a single horizontal line. With inorganic substances, formulas may be used from first mention. With salts, it must be stated whether or not the anhydrous material is used, e.g. anhydrous CuSO_4 , or which of the different crystalline forms is meant, e.g. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Descriptions of solutions, compositions and concentrations. Solutions of common acids, bases and salts should be defined in terms of molarity (M), e.g. 0.1 M- NaH_2PO_4 . Compositions expressed as mass per unit mass (w/w) should have values expressed as ng, μg , mg or g per kg; similarly for concentrations expressed as mass per unit volume (w/v), the denominator being the litre. If concentrations or compositions are expressed as a percentage, the basis for the composition should be specified (e.g. % (w/w) or % (w/v) etc.). The common measurements used in nutritional studies, e.g. digestibility, biological value and net protein utilization, should be expressed as decimals rather than as percentages, so that amounts of available nutrients can be obtained from analytical results by direct multiplication. See *Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences*. London: The Royal Society, 1972 (para. 8).

Cell lines. The Journal expects authors to deposit cell lines (including microbial strains) used in any study to be published in publicly accessible culture collections, for example, the European Collection of Cell Cultures (ECACC) or the American Type Culture Collection (ATCC) and to refer to the collection and line or strain numbers in the text (e.g. ATCC 53103). Since the authenticity of subcultures of culture collection specimens that are distributed by individuals cannot be ensured, authors should indicate laboratory line or strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

Gene nomenclature and symbols. The use of symbols and nomenclature recommended by the HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>) is encouraged. Information on human genes is also available from Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>), on mouse genes from the Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org/>) and on rat genes from the Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>).

Nomenclature of vitamins. Most of the names for vitamins and related compounds that are accepted by the Editors are those recommended by the IUNS Committee on Nomenclature. See *Nutrition Abstracts and Reviews* (1978) **48A**, 831–835.

*Acceptable name Other names**

Vitamin A

Retinol Vitamin A₁

Retinaldehyde, retinal Retinene

Retinoic acid (all-*trans* or 13-*cis*) Vitamin A₁ acid

3-Dehydroretinol Vitamin A₂

Vitamin D

Ergocalciferol, ercalciol Vitamin D₂ calciferol

Cholecalciferol, calciol Vitamin D₃

Vitamin E

α-, β- and γ-tocopherols plus

tocotrienols

Vitamin K

Phylloquinone Vitamin K₁

Menaquinone-n (MK-n)[†] Vitamin K₂

Menadione Vitamin K₃,

menaquinone,

menaphthone

Vitamin B₁

Thiamin Aneurin(e), thiamine

Vitamin B₂

Riboflavin Vitamin G, riboflavine,

Lactoflavin

Niacin

Nicotinamide Vitamin PP

Nicotinic acid

Folic Acid

Pteroyl(mono)glutamic acid Folacin, vitamin B_c or M

Vitamin B₆

Pyridoxine Pyridoxol

Pyridoxal

Pyridoxamine

Vitamin B₁₂

Cyanocobalamin

Hydroxocobalamin Vitamin B_{12a} or B_{12b}

Aquocobalamin

Methylcobalamin

Adenosylcobalamin

Inositol

Myo-inositol Meso-inositol

Choline

Pantothenic acid

Biotin Vitamin H

Vitamin C

Ascorbic acid

Dehydroascorbic acid

*Including some names that are still in use elsewhere, but are not used by the *British Journal of Nutrition*.

[†]Details of the nomenclature for these and other naturally-occurring quinones should follow the Tentative Rules of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (see *European Journal of Biochemistry* (1975) **53**, 15–18)

Generic descriptors. The terms **vitamin A**, **vitamin C** and **vitamin D** may still be used where appropriate, for example in phrases such as 'vitamin A deficiency', 'vitamin D activity'.

Vitamin E. The term **vitamin E** should be used as the descriptor for all tocol and tocotrienol derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of α-tocopherol. The term **tocopherols** should be used as the generic descriptor for all methyl tococls. Thus, the term **tocopherol** is not synonymous with the term **vitamin E**.

Vitamin K. The term **vitamin K** should be used as the generic descriptor for 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menaphthone) and all derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of phylloquinone (phytylmenaquinone).

Niacin. The term **niacin** should be used as the generic descriptor for pyridine 3-carboxylic acid and derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of nicotinamide.

Vitamin B₆. The term **vitamin B₆** should be used as the generic descriptor for all 2-methylpyridine derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of pyridoxine.

Folate. Due to the wide range of C-substituted, unsubstituted, oxidized, reduced and mono- or polyglutamyl side-chain derivatives of pteroylmonoglutamic acid that exist in nature, it is not possible to provide a complete list. Authors are encouraged to use either the generic name or the correct scientific name(s) of the derivative(s), as appropriate for each circumstance.

Vitamin B₁₂. The term **vitamin B₁₂** should be used as the generic descriptor for all corrinoids exhibiting qualitatively the biological activity of cyanocobalamin. The term **corrinoids** should be used as the generic descriptor for all compounds containing the corrin nucleus and thus chemically related to cyanocobalamin. The term **corrinoid** is not synonymous with the term **vitamin B₁₂**.

Vitamin C. The terms **ascorbic acid** and **dehydroascorbic acid** will normally be taken as referring to the naturally-occurring L-forms. If the subject matter includes other optical isomers, authors are encouraged to include the L- or D- prefixes, as appropriate. The same is true for all those vitamins which can exist in both natural and alternative isomeric forms.

Amounts of vitamins and summation. Weight units are acceptable for the amounts of vitamins in foods and diets. For concentrations in biological tissues, SI units should be used; however, the authors may, if they wish, also include other units, such as weights or international units, in parentheses.

See *Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences* (1972) paras 8 and 14–20. London: The Royal Society.

Nomenclature of fatty acids and lipids. In the description of results obtained for the analysis of fatty acids by conventional GLC, the shorthand designation proposed by Farquhar JW, Insull W, Rosen P, Stoffel W & Ahrens EH (*Nutrition Reviews* (1959), **17**, Suppl.) for individual fatty acids should be used in the text, tables and figures. Thus, 18 : 1 should be used to represent a fatty acid with eighteen carbon atoms and one double bond; if the position and configuration of the double bond is unknown. The shorthand designation should also be used in the abstract. If the positions and configurations of the double bonds are known, and these are important to the discussion, then a fatty acid such as linoleic acid may be referred to as *cis*-9,*cis*-12-18 : 2 (positions of double bonds related to the carboxyl carbon atom 1). However, to illustrate the metabolic relationship between different unsaturated fatty acid families, it is sometimes more helpful to number the double bonds in relation to the terminal methyl carbon atom, *n*. The preferred nomenclature is then: 18 : 3*n*-3 and 18 : 3*n*-6 for α -linolenic and γ -linolenic acids respectively; 18 : 2*n*-6 and 20 : 4*n*-6 for linoleic and arachidonic acids respectively and 18 : 1*n*-9 for oleic acid. Positional isomers such as α - and γ -linolenic acid should always be clearly distinguished. It is assumed that the double bonds are methylene-interrupted and are of the *cis*-configuration (see Holman RT in *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* (1966) vol. 9, part 1, p. 3. Oxford: Pergamon Press). Groups of fatty acids that have a common chain length but vary in their double bond content or double bond position should be referred to, for example, as C₂₀ fatty acids or C₂₀ PUFA. The modern nomenclature for glycerol esters should be used, i.e. triacylglycerol, diacylglycerol, monoacylglycerol *not* triglyceride, diglyceride, monoglyceride. The form of fatty acids used in diets should be clearly stated, i.e. whether ethyl esters, natural or refined fats or oils. The composition of the fatty acids in the dietary fat and tissue fats should be stated clearly, expressed as mol/100 mol or g/100 g total fatty acids.

Nomenclature of micro-organisms. The correct name of the organism, conforming with international rules of nomenclature, should be used: if desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Names of bacteria should conform to the current Bacteriological Code and the opinions issued by the International Committee on Systematic Bacteriology. Names of algae and fungi must conform to the current International Code of Botanical Nomenclature. Names of protozoa should conform to the current International Code of Zoological Nomenclature.

Nomenclature of plants. For plant species where a common name is used that may not be universally intelligible, the Latin name in italics should follow the first mention of the common name. The cultivar should be given where appropriate.

Other nomenclature, symbols and abbreviations. Authors should consult recent issues of the *British Journal of Nutrition* for guidance. The IUPAC rules on chemical nomenclature should be followed, and the recommendations of the Nomenclature Committee of IUBMB and the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature and Nomenclature Commission of IUBMB in *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (1992), 2nd ed., London: Portland Press (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html>). The symbols and abbreviations, other than units, are essentially those listed in *British Standard 5775* (1979–1982), *Specifications for Quantities, Units and Symbols*, parts 0–13. Day should be abbreviated to d, for example 7 d, except for 'each day', '7th day' and 'day 1'.

Elements and simple chemicals (e.g. Fe and CO₂) can be referred to by their chemical symbol (with the exception of arsenic and iodine, which should be written in full) or formula from the first mention in the text; the title, text and table headings, and figure legends can be taken as exceptions. Well-known abbreviations for chemical substances may be used without explanation, thus: RNA for ribonucleic acid and DNA for deoxyribonucleic acid. Other substances that are mentioned frequently (five or more times) may also be abbreviated, the abbreviation being placed in parentheses at the first mention, thus: lipoprotein lipase (LPL), after that, LPL, and an alphabetical list of abbreviations used should be included. Only accepted abbreviations may be used in the title and text headings. If an author's initials are mentioned in the text, they should be distinguished from other abbreviations by the use of stops, e.g. 'one of us (P. J. H.)...'. For UK counties the official names given in the *Concise Oxford Dictionary* (1995) should be used and for states of the USA two-letter abbreviations should be used, e.g. MA (not Mass.) and IL (not Ill.). Terms such as 'bioavailability' or 'available' may be used providing that the use of the term is adequately defined.

Spectrophotometric terms and symbols are those proposed in *IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units* (1979) London: Butterworths. The attention of authors is particularly drawn to the following symbols: m (milli, 10^{-3}), μ (micro, 10^{-6}), n (nano, 10^{-9}) and p (pico, 10^{-12}). Note also that ml (millilitre) should be used instead of cc, μm (micrometre) instead of μ (micron) and μg (microgram) instead of γ .

Numbers. Numerals should be used with units, for example, 10 g, 7 d, 4 years (except when beginning a sentence, thus: 'Four years ago...'); otherwise, words (except when 100 or more), thus: one man, ten ewes, ninety-nine flasks, three times (but with decimal, 2.5 times), 100 patients, 120 cows, 136 samples.

Abbreviations. The following abbreviations are accepted without definition by the *British Journal of Nutrition*:

ADP (GDP) adenosine (guanosine) 5'-disphosphate
 AIDS acquired immune deficiency syndrome
 AMP (GMP) adenosine (guanosine) 5'-monophosphate
 ANCOVA analysis of covariance
 ANOVA analysis of variance
 apo apolipoprotein
 ATP (GTP) adenosine (guanosine) 5'-triphosphate
 AUC area under the curve
 BMI body mass index
 BMR basal metabolic rate
 bp base pair
 BSE bovine spongiform encephalopathy
 CHD coronary heart disease
 CI confidence interval
 CJD Creutzfeldt-Jacob disease
 CoA and acyl-CoA co-enzyme A and its acyl derivatives
 CV coefficient of variation
 CVD cardiovascular disease
 Df degrees of freedom
 DHA docosahexaenoic acid
 DM dry matter
 DNA deoxyribonucleic acid dpm disintegrations per minute
 EDTA ethylenediaminetetra-acetic acid
 ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
 EPA eicosapentaenoic acid
 Expt experiment (for specified experiment, e.g. Expt 1)
 FAD flavin-adenine dinucleotide
 FAO Food and Agriculture Organization (except when used as an author)
 FFQ food-frequency questionnaire
 FMN flavin mononucleotide
 GC gas chromatography
 GLC gas-liquid chromatography
 GLUT glucose transporter
 GM genetically modified
 Hb haemoglobin
 HDL high-density lipoprotein
 HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
 HIV human immunodeficiency virus
 HPLC high-performance liquid chromatography
 Ig immunoglobulin
 IHD ischaemic heart disease
 IL interleukin
 IR infra red
 kb kilobases
 K_m Michaelis constant
 LDL low-density lipoprotein
 MHC major histocompatibility complex
 MRI magnetic resonance imaging
 MS mass spectrometry
 MUFA monounsaturated fatty acids
 NAD⁺, NADH oxidized and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide
 NADP⁺, NADPH oxidized and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
 NEFA non-esterified fatty acids
 NF- κ B nuclear factor kappa B
 NMR nuclear magnetic resonance

NS not significant
 NSP non-starch polysaccharide
 OR odds ratio
 PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
 PBS phosphate-buffered saline
 PCR polymerase chain reaction
 PG prostaglandin
 PPAR peroxisome proliferator-activated receptor
 PUFA polyunsaturated fatty acids
 RDA recommended dietary allowance
 RER respiratory exchange ratio
 RIA radioimmunoassay
 RMR resting metabolic rate
 RNA, mRNA etc. ribonucleic acid, messenger RNA etc.
 rpm revolutions per minute
 RT reverse transcriptase
 SCFA short-chain fatty acids
 SDS sodium dodecyl sulphate
 SED standard error of the difference between means
 SFA saturated fatty acids
 SNP single nucleotide polymorphism
 TAG triacylglycerol
 TCA trichloroacetic acid
 TLC thin-layer chromatography
 TNF tumour necrosis factor
 UN United Nations (except when used as an author)
 UNICEF United Nations International Children's Emergency Fund
 UV ultra violet
 VLDL very-low-density lipoprotein
 V_{O_2} O_2 consumption
 $V_{O_{2max}}$ maximum O_2 consumption
 WHO World Health Organization (except when used as an author)

Use of three-letter versions of amino acids in tables: Leu, His, etc.
 CTP, UTP, GTP, ITP, as we already use ATP, AMP etc.

Disallowed words and phrases. The following are disallowed by the *British Journal of Nutrition*:

deuterium or tritium (use 2H and 3H)
 c.a. or around (use approximately or about)
 canola (use rapeseed)
 ether (use diethyl ether)
 free fatty acids (use NEFA)
 isocaloric/calorie (use isoenergetic/energy)
 quantitate (use quantify)
 unpublished data or observations (use unpublished results)

Proofs. PDF proofs are sent to authors in order that they make sure that the paper has been correctly set up in type. Only changes to errors induced by typesetting/copy editing or typographical errors will be accepted. Any further changes, including notes added, must be agreed by the Editor-in-Chief. All corrections should be made in ink in the margins: marks made in the text should be only those indicating the place to which the corrections refer.

Corrected proofs should be returned within 3 days either by Express mail or email to:

Emma Pearce Production Editor Journals Department Cambridge University Press The Edinburgh Building Shaftesbury Road
 Cambridge CB2 2RU UK Telephone: +44 1223 325032 Fax: +44 1223 325802 Email: bjnproduction@cambridge.org

If corrected proofs are not received from authors within 7 days the paper may be published as it stands.

Offprints. A PDF file of the paper will be supplied free of charge to the corresponding author of each paper, and offprints may be ordered on the order form sent with the proofs.

SUBMISSION PROCESS

The *British Journal of Nutrition* operates an on-line submission and reviewing system (eJournalPress). Authors should submit to the following address: <http://bjn.msubmit.net/> If any difficulties are encountered please contact the Publications Office immediately.

The manuscript submission process is broken into a series of four screens that gather detailed information about your manuscript and allow you to upload the appropriate text and figure/table files. The sequence of screens is as follows:

1. A form requesting author details, manuscript title, abstract, and associated information and the file quantities. Although there is the option of saving your information and returning to complete your submission at a later date we strongly advise you to submit your paper in one session if possible.
2. A screen asking for the actual file locations (via an open file dialogue). After completing this screen, your files will be uploaded to our server.
3. A completion screen that will provide you with a specific manuscript number for your manuscript. You may be asked to select the order in which your uploaded files should be presented.
4. An approval screen that will allow you to verify that your manuscript has been uploaded and converted to PDF correctly. Each converted file must be approved individually to complete your online submission. If the conversion is not correct, you can replace or delete your manuscript files as necessary. After you have reviewed the converted files, you will need to click on "Approve Manuscript". This link will have a red arrow next to it.

Throughout the system, red arrows reflect pending action items that you should address.

Before submitting a manuscript, please gather the following details for all authors:

- Title, First and Last Names
- Full Postal Address for Corresponding Author only
- Institutions
- Country
- Work Fax Number for Corresponding Author only (including international dialling code)
- Email addresses

In addition we require full manuscript details:

- Covering Letter: including a statement of acceptance of the conditions laid down in the Directions to Contributors. The statement must affirm that the submission represents original work that has not been published previously, that it is not currently being considered by another journal, and that if accepted for the *British Journal of Nutrition* it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Nutrition Society. It should also confirm that each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript.
- Title (you may copy and paste this from your manuscript)
- Abstract (you may copy and paste this from your manuscript)
- Manuscript files in Word, WordPerfect, or RTF format.
- Ideally manuscript files should have the tables/figures given at the end of the article.
- For illustrations, preferred software packages are Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, Aldus Freehand, Chemdraw or CorelDraw. Preferred formats are TIFF or JPEG, if a TIFF file is not possible save as an EPS or a windows metafile. Figures should be submitted as separate files, not as part of the main body of the manuscript.

Please provide contact details for up to four potential Referees (email addresses and institutions).

For further information, please contact the Publications Office: Email: bjn.edoffice@cambridge.org