

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**ALTERAÇÕES MOLECULARES NO FÍGADO INDUZIDAS PELA DIETA RICA EM
GORDURA E NITRATO DE SÓDIO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**

CÍNTIA RODARTE PARREIRA ALANE

CIÊNCIAS DA SAÚDE

2019

CÍNTIA RODARTE PARREIRA ALANE

**ALTERAÇÕES MOLECULARES NO FÍGADO INDUZIDAS PELA DIETA RICA EM
GORDURA E NITRATO DE SÓDIO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

**Orientador: Dr. Robinson Sabino da Silva
Co-orientadora: Dra. Françoise Vasconcelos Botelho**

UBERLÂNDIA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Defesa de Tese de Doutorado, Nº 013, PPCSA				
Data:	27 de junho de 2019	Hora de início:	13:45	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	11413CSD002				
Nome do Discente:	Cíntia Rodarte Parreira Alane				
Título do Trabalho:	Alterações moleculares no fígado induzidas pela dieta rica em gordura e nitrato de sódio utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	2: DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DAS DOENÇAS E AGRAVOS À SAÚDE				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS PELA SALIVA				

Reuniu-se na Sala 214 do Bloco 8C, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Tales Lyra de Oliveira (USCS), Maria Carliana Mota (SESI-SENAC), Simone Ramos Deconte (UFU), Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo (UFU) e o Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/06/2019, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo, Membro de Comissão**, em 27/06/2019, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Ramos Deconte, Membro de Comissão**, em 27/06/2019, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Carliana Mota, Usuário Externo**, em 27/06/2019, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tales Lyra de Oliveira, Usuário Externo**, em 27/06/2019, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1351503** e o código CRC **718E6BD7**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A319 Alane, Cíntia Rodarte Parreira, 1982-
2019 Alterações moleculares no fígado induzidas pela dieta rica em
gordura e nitrato de sódio utilizando espectroscopia de
infravermelho com transformada de Fourier [recurso eletrônico] /
Cíntia Rodarte Parreira Alane. - 2019.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Coorientadora: Françoise Vasconcelos Botelho.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2308>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Silva, Robinson Sabino da, 1981-,
(Orient.). II. Botelho, Françoise Vasconcelos, 1971-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

CÍNTHIA RODARTE PARREIRA ALANE

ALTERAÇÕES MOLECULARES NO FÍGADO INDUZIDAS PELA DIETA RICA EM GORDURA E NITRATO DE SÓDIO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Presidente da banca (orientador): Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Tales Lyra de Oliveira

Instituição: Universidade Municipal de São Caetano do Sul (USCS)

Titular: Prof^a. Dra. Simone Ramos Deconte

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Prof^a. Dra. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Prof^a. Dra. Maria Carliana Mota

Instituição: SESI-SENAC

*Aos meus pais **Ney Flávio** e **Maria Aparecida** exemplos de dignidade e dedicação, meu esposo **Carlos Jr.** e meu filho **Enrico** pelo carinho e amor. Aos meus queridos avós, em especial **Mãe Naná** (em memória).*

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha gratidão pela saúde, força, coragem e esperança. Gratidão pela benção que é meu filho. Gratidão por colocar pessoas tão especiais e dignas em meu caminho.

À minha mãe e meu pai por todo o esforço na minha educação, por serem exemplos de honestidade e humanidade. Meu orgulho e referência de vida. Obrigada por tudo que fizeram e ainda fazem por nós. Amo vocês!

Aos meus avós (em memória) por terem ajudado na construção da pessoa que me tornei hoje, pelos ensinamentos e pelo amor e carinho dedicados.

Ao meu esposo, pelo companheirismo, por fazer do meu sonho o seu sonho. Obrigada também por ser trabalhador e honesto. Agradeço a Deus por caminharmos juntos na educação do nosso filho.

Aos meus irmãos, sempre tão incentivadores e presentes em minha vida. Amanda, obrigada por ser tão prestativa e carinhosa. Marco Flávio e Alexandre obrigada pelo apoio incondicional. À minha pequenina sobrinha Isadora por alegrar nossos corações.

À minha sogra Nelma por estar sempre presente e disposta a ajudar, pela bondade e dedicação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva, minha gratidão por ter estendido a mão e ter me ajudado a realizar esse sonho. Agradeço pelos ensinamentos, pela confiança e generosidade. Agradeço a Deus por ter colocado no meu caminho um exemplo de Professor, Orientador, Pesquisador, Coordenador e principalmente exemplo de pessoa humana.

À colega Léia, obrigada pelos ensinamentos e pela grande colaboração.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Françoise Vasconcelos Botelho, obrigada por toda ajuda, pelos camundongos, pelas importantes contribuições para a realização da tese.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, aos professores do Colegiado do programa, as secretárias Viviane, em especial Gisele, que me ajudaram com todos os prazos.

Ao Professor Dr. Marcos Luiz Ferreira Neto pelas valiosas contribuições.

Aos meus familiares pelas palavras de apoio e carinho.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma forma, com o desenvolvimento deste trabalho, obrigada.

"A verdadeira educação consiste em pôr a descoberto ou fazer atualizar o melhor de uma pessoa. Que livro melhor que o livro da humanidade?"

Mahatma Gandhi.

RESUMO

O monitoramento de alterações no fígado é uma prática demorada e de alto custo. Consequentemente, a busca por um método mais rápido e específico, de baixo custo e sem protocolos laboriosos para detectar alterações no fígado induzidas pela obesidade é de grande interesse. A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) tem sido utilizada no monitoramento de doenças, porém, aplicações em tecidos são incipientes. Utilizou-se espectroscopia ATR-FTIR para avaliar o fígado de camundongos C57BL/6 com dieta controle (CD + Placebo), dieta hiperlipídica (HFD + placebo), dieta controle + nitrato de sódio (CD + NaNO₃) e dieta hiperlipídica + nitrato de sódio (HFD + NaNO₃) para identificar possíveis biomarcadores espectrais relacionados à obesidade. O espectro hepático dos camundongos dos grupos estudados apresentou catorze modos vibracionais dos quais oito foram pré-validados como biomarcadores de monitoramento de alterações hepáticas pela curva ROC. Além disso, o tratamento com NaNO₃ promoveu redução em seis modos vibracionais afetados pela HFD. No total, os biomarcadores espectral 3008, 2923, 2854, 1741, 1459 e 1161 cm⁻¹ podem fornecer uma nova alternativa robusta para monitorar alterações induzidas pela obesidade no fígado. Além disso, 1229 e 923 cm⁻¹ são candidatos espectrais para indicar dano hepático pelo NaNO₃.

Palavras-chave: diagnóstico, FTIR, fígado, obesidade, gordura, nitrato de sódio.

ABSTRACT

Monitoring liver changes is a time consuming and costly practice. Consequently, the search for a faster, specific, low-cost method without laborious protocols to detect obesity-induced liver changes is of great interest. Attenuated Full Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) has been used in disease monitoring, but tissue applications are incipient. ATR-FTIR spectroscopy was used to evaluate the liver of C57BL/6 mice with control diet (CD + Placebo), hyperlipid diet (HFD + placebo), control diet + sodium nitrate (CD + NaNO₃) and hyperlipid diet + sodium (HFD + NaNO₃) to identify possible obesity-related spectral biomarkers. The hepatic spectrum of mice in the studied groups presented fourteen vibrational modes, eight of which were pre-validated as biomarkers for monitoring liver changes by the ROC curve. In addition, NaNO₃ treatment promoted reduction in six vibrational modes affected by HFD. In total, the spectral biomarkers 3008, 2923, 2854, 1741, 1459 and 1161 cm⁻¹ may provide a robust new alternative for monitoring liver-induced changes in obesity. In addition, 1229 and 923 cm⁻¹ are spectral candidates to indicate liver damage by NaNO₃.

Keywords: diagnosis, FTIR, liver, obesity, fat, sodium nitrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Porcentagem de adultos acima de 18 anos que são definidos como obeso..	17
Figura 2. Patogênese da DHGNA	22
Figura 3. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR	29
Figura 4. Esquema de um sistema de imagem IR típico	30
ARTIGO 1	
Figure 1. Experimental design.....	50
Figure 2. Liver ATR-FTIR spectra (3700-400 cm^{-1}) of Chow Diet (CD + Placebo), High-Fat Diet (HFD + Placebo), Chow Diet treated with sodium nitrate (CD + NaNO_3), High-Fat Diet group treated with sodium nitrate (HFD + NaNO_3) mice.....	51
Figure 3. Liver band area of the ATR-FTIR (3700-400 cm^{-1}) of Chow Diet (CD + Placebo), High-Fat Diet (HFD + Placebo), Chow Diet treated with Sodium Nitrate (CD + NaNO_3), High-Fat Diet group treated with Sodium Nitrate (HFD + NaNO_3) mice. 3067 cm^{-1} (A), 3008 cm^{-1} (B), 2962 cm^{-1} (C), 2923 cm^{-1} (D), 2854 cm^{-1} (E), 1741 cm^{-1} (F), 1642 cm^{-1} (G), 1459 cm^{-1} (H), 1397 cm^{-1} (I), 1310 cm^{-1} (J), 1229 cm^{-1} (K), 1161 cm^{-1} (L), 1057 cm^{-1} (M), 923 cm^{-1} (N). Values are expressed as mean \pm s.e.m. e $p < 0,05$.	52
Figure 4. ROC analysis of liver vibrational modes of Chow Diet group vs. High-Fat Diet Group. 3067 cm^{-1} (A), 3008 cm^{-1} (B), 2962 cm^{-1} (C), 2923 cm^{-1} (D), 2854 cm^{-1} (E), 1741 cm^{-1} (F), 1642 cm^{-1} (G), 1459 cm^{-1} (H), 1397 cm^{-1} (I), 1310 cm^{-1} (J), 1229 cm^{-1} (K), 1161 cm^{-1} (L), 1057 cm^{-1} (M), 923 cm^{-1} (N)	53
ARTIGO 2	
Figura 1. Espectros de ATR-FTIR de fígado nos 4 grupos estudados.....	63
Figura 2. Área da banda do fígado de camundongos ATR-FTIR (3700-400 cm^{-1}) Dieta Controle (CD + Placebo), Dieta Hiperlipídica (HFD + Placebo), Dieta Controle tratada com Nitrato de Sódio (CD + NaNO_3), Dieta Hiperlipídica tratado com nitrato de sódio (HFD + NaNO_3). 3067 cm^{-1} (A), 3008 cm^{-1} (B), 2962 cm^{-1} (C), 2923 cm^{-1} (D), 2854 cm^{-1} (E), 1741 cm^{-1} (F), 1642 cm^{-1} (G), 1459 cm^{-1} (H), 1397 cm^{-1} (I), 1310 cm^{-1} (J), 1229 cm^{-1} (K), 1161 cm^{-1} (L), 1057 cm^{-1} (M), 923 cm^{-1} (N). Os valores são expressos como média \pm s.e.m. e $p < 0,05$	65

Figura 3. Análise ROC dos modos vibratórios do fígado do grupo Dieta Controle vs. Dieta Hiperlipídica 3067 cm⁻¹ (A), 3008 cm⁻¹ (B), 2962 cm⁻¹ (C), 2923 cm⁻¹ (D), 2854 cm⁻¹ (E), 1741 cm⁻¹ (F), 1642 cm⁻¹ (G), 1459 cm⁻¹ (H), 1397 cm⁻¹ (I), 1310 cm⁻¹ (J), 1229 cm⁻¹ (K), 1161 cm⁻¹ (L), 1057 cm⁻¹ (M), 923 cm⁻¹ (N).....67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1	35
Table 1. Obesity and NaNO ₃ effects on body weight, Δ body weight, water intake, adipose tissue and liver weights.....	48
Table 2. ATR-FTIR vibrational mode assignments and identification of the respective component of total liver.....	48
ARTIGO 2	54
Tabela 1. Parâmetros corporais e metabólicos dos animais	62
Tabela 2. Modo vibracional de ATR-FTIR e seu respectivo componente molecular no fígado.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IMC	Índice de Massa Corporal
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
EH	Esteatose Hepática
FGNA	Esteatose Hepática Não Alcoólica
EHNA	Esteato-Hepatite Não Alcoólica
AGL	Ácidos Graxos Livres
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
FAS-L	Proteína Ligante Fas
AST	Aspartatoaminotransferase
ALT	Alaninaaminotransferase
GGT	Gamaglutamiltransferase
TAC	Tomografia Axial Computorizada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOSs	Óxido Nítrico Sintases
NOS1	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
iNOS, NOS2	Óxido Nítrico Sintase Induzida
eNOS, NOS3	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FTIR	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
ATR	Reflexão Total Atenuada
IR	Índice de Refração
IV	Infravermelho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Sobrepeso e obesidade	16
2.2 Fígado.....	18
2.3 Implicações da obesidade no fígado: doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)	20
2.4 Nitrato de sódio	24
2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	26
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 ARTIGO 1 Molecular Changes in Liver Induced by High Fat Diet and Sodium Nitrate Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....	35
5 ARTIGO 2 PATENTE: Método para Detecção de Alterações na Composição Molecular do Fígado de Camundongos Obesos Utilizando ATR-FTIR.....	54
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência de obesidade em todo o mundo tem sido caracterizado como uma pandemia (BLUHER, 2019). E está associado a fatores alimentares, ambientais, comportamentais e genéticos (SWINBURN et al., 2011). O consumo de dieta hiperlipídica contribui para o desenvolvimento da obesidade, que está relacionada com alterações patológicas em vários órgãos do corpo humano (HILL; PETERS, 1998). A obesidade contribui com o declínio da expectativa de vida, associado ao maior risco de diversas condições patológicas, como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, apnéia obstrutiva do sono, câncer e, em especial, doença hepática gordurosa (BLUHER, 2019).

A principal doença hepática associada à obesidade é a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A DHGNA é principalmente revelada pela agregação de lipídios no fígado, frequentemente em gotículas lipídicas (YOUNES; BUGIANESI, 2019). O diagnóstico precoce de alterações moleculares hepáticas induzidas por dieta hiperlipídica pode melhorar o prognóstico e retardar as alterações hepáticas associadas à obesidade. Um dos desafios é a falta de um ensaio simples para a detecção de alterações moleculares no fígado sem protocolos laboriosos, demorados e dispendiosos (YOUNES; BUGIANESI, 2019). Além disso, sabe-se que o óxido nítrico (NO) e seus metabólitos, a arginina, estão associados a alterações fisiopatológicas induzidas pela obesidade via redução da biodisponibilidade do NO (GRUBER et al., 2008).

O nitrato inorgânico (NO_3^-) é um precursor do NO no organismo. Os nitratos são compostos por nitrogênio e fazem parte do ciclo do nitrogênio nas células. O nitrato é fisiologicamente produzido no corpo e presente em vegetais e água (OGUR et al., 2005). Vários estudos usando suplementação dietética de nitrato de sódio em roedores e humanos mostraram efeitos benéficos na defesa do hospedeiro e no sistema cardiovascular. Por outro lado, existe uma grande preocupação com os supostos efeitos adversos, como câncer ocasionado pela exposição crônica ao nitrato de sódio (HEZEL et al., 2015). O nitrato de sódio melhorou o perfil lipídico plasmático e os marcadores plasmáticos da função hepática em um modelo murino de hipertensão arterial sistêmica associada à obesidade e reduziu a infiltração de células inflamatórias no fígado e no coração (BHASWANT et al., 2017). Por outro

lado, o uso intensivo de nitratos como fertilizantes agrícolas e como agente alimentar (conservante e antimicrobiano) tem recebido considerável atenção (MANDE et al., 2012). O foco no nitrato ingerido ocorre devido à conversão da microbiota no trato gastrointestinal em nitrito tóxico (PANNALA et al., 2003).

A espectroscopia de infravermelho (IV) está emergindo como uma poderosa técnica quantitativa e qualitativa para a caracterização diagnóstica de moléculas biológicas em fluidos e tecidos (BELLISOLA; SORIO, 2012). A espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica analítica físico-química global, sensível e altamente reprodutível que identifica as moléculas estruturais com base na sua absorção (índice de refração-IR) (OJEDA; DITTRICH, 2012). Considerando que uma biomolécula é determinada por sua estrutura única, cada biomolécula exibirá um espectro ATR-FTIR único, representando o modo vibracional dessa ligação estrutural (OJEDA; DITTRICH, 2012, SEVERCAN et al., 2010). Os modos vibracionais (IR) de amostras biológicas podem ser considerados como impressões bioquímicas que se correlacionam diretamente com a presença ou ausência de doenças e, além disso, fornecem a base para a determinação quantitativa de vários analitos de interesse diagnóstico (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO e RANIERO, 2015; KHAUSTOVA et al., 2010).

No presente estudo, testou-se a hipótese de que biomarcadores espectrais específicos podem ser identificados no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD), e os modos vibracionais espectrais ATR-FTIR diferencialmente expressos podem ser usados como biomarcadores hepáticos para a detecção de alterações da composição molecular do fígado. Além disso, sugerimos que o nitrato de sódio pode reduzir as alterações moleculares induzidas pela HFD.

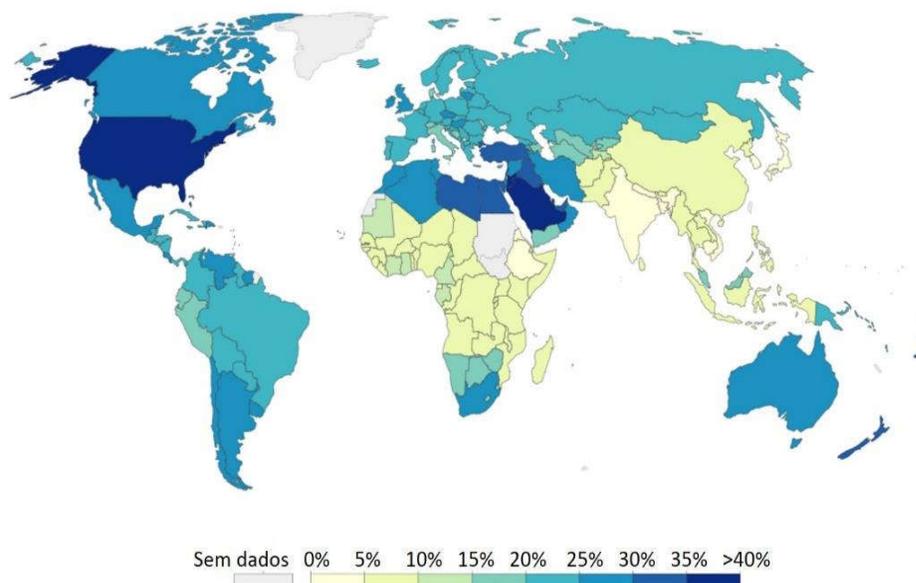
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Sobrepeso e obesidade

A Organização Mundial de Saúde definiu obesidade como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura causado pelo desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas (WHO, 2018) representando risco à saúde. Essa enfermidade pode ser definida como de origem multifatorial, resultante de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e psicológicos, proporcionando o acúmulo excessivo de energia sob a forma de gordura no organismo (MORAES; ALMEIDA e SOUZA, 2013; SPERETTA; LEITE e DUARTE, 2014).

O aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo tem sido caracterizado como uma pandemia (BLUHER, 2019). Este dado está associado com mudanças no sistema alimentar global (SWINBURN et al., 2011). Em 2016, 1 bilhão e 900 milhões de pessoas apresentavam sobrepeso e 650 milhões apresentavam obesidade. A estimativa é de que 13% da população adulta do mundo apresenta obesidade. A prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016, e um mapa atual indica que esses valores podem ultrapassar 40% da população de alguns países (WHO, 2018) (Figura 1). Dados recentes indicam que 53,8% da população brasileira apresentam excesso de peso (MS, 2016). A prevalência da obesidade na população brasileira é de 18,9% (26,9 milhões de pessoas) superando a de diabetes com 8,9% (12,7 milhões de pessoas). Por ano, cerca de 1 milhão de novos casos de obesidade são diagnosticados (OMS, 2017). No Brasil, no ano de 2011 os custos diretos de assistência à saúde atribuíveis à obesidade em adultos totalizaram US\$ 269,6 milhões; já com a obesidade mórbida, os gastos representavam aproximadamente 24% desse total (US\$ 64,2 milhões) (de OLIVEIRA; SANTOS e SILVA, 2015). O excesso de peso e a obesidade estão ligados a mais mortes em todo o mundo do que os efeitos do peso reduzido. Globalmente, há mais pessoas obesas do que abaixo do peso - isso ocorre em todo o mundo, com exceção de partes da África subsaariana e da Ásia (WHO, 2018).

Figura 1. Porcentagem de adultos acima de 18 anos que são definidos como obesos.



Fonte: World Health Organization (WHO) (2018).

A avaliação da obesidade pode ser realizada de várias formas. O método mais utilizado é o índice de massa corporal (IMC) que representa o resultado da divisão do peso pela altura ao quadrado. IMC igual ou maior que 25 kg/m² a 29,9 kg/m² configura sobrepeso e igual ou superior a 30 kg/m² a 34,9 kg/m² define obesidade grau I, 35 kg/m² a 39,9 kg/m² obesidade grau II e maior ou igual a 40 kg/m² obesidade grau III. O IMC é um índice amplamente utilizado pelos serviços públicos para atendimento da população e considerado uma das melhores alternativas clínicas de baixo custo para mensurar a obesidade (WHO, 2018). Entretanto, o IMC não permite aferir diferenciadamente o peso da massa magra e gordura. Para um diagnóstico mais preciso da obesidade, são utilizadas outras medidas como a circunferência abdominal, a relação cintura-quadril e a presença de dobras cutâneas que costumam ser associadas ao IMC elevado (MORAES; ALMEIDA e SOUZA, 2013; WANNMACHER, 2016).

O sobrepeso e a obesidade estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade (WARD et al., 2016), sendo um problema grave de saúde pública. A taxa de mortalidade por todas as causas na população obesa é cerca de 20% maior em comparação a população com peso normal (BORRELL; SAMUEL, 2014). A obesidade está frequentemente associada a diversas doenças do âmbito físico e

psicológico. Esta condição está fortemente associada com uma ampla gama de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares (exceto insuficiência cardíaca congestiva) (MA et al., 2011), diabetes tipo 2, todos os tipos de câncer (exceto câncer esofágico em mulheres), asma, doença da vesícula biliar, osteoartrite e dor lombar crônica (GUH et al., 2009), hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, esteatose hepática, depressão, assim como a infertilidade, condições de saúde que representam as principais causas de morte, influenciadas por fatores comportamentais evitáveis (PEREIRA; MATEUS, 2003; RITO; BREDA, 2006; PÉREZ; SÁNCHEZ e ORTIZ, 2013; SASSON et al., 2014).

Durante o desenvolvimento da obesidade, as alterações no tecido adiposo podem levar a alterações da sua função endócrina. Além da capacidade de armazenamento excessivo de lipídios, o tecido adiposo sintetiza e secreta muitos fatores que estão envolvidos na fisiopatologia da obesidade associada a doenças secundárias, as quais destaca-se a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) (DYSON; ANSTEE e MCPHERSON, 2014; Liu et al., 2014). Os estados patológicos específicos de órgãos associados à obesidade podem ser decorrentes da desregulação dos níveis circulantes de adipocinas (leptina, adiponectina e interleucina (IL) 6) e metabólitos e do armazenamento de gordura ectópica dentro de órgãos que normalmente não acumulam gordura, por exemplo, fígado e músculo (DOGAN et al., 2013).

2.2 Fígado

O fígado é o segundo maior órgão e a maior glândula do corpo humano, pesa aproximadamente 1.500g em um adulto sem sobrepeso. Os hepatócitos são as células funcionais do fígado e constituem cerca de 67% da sua massa total. Essas células epiteliais encontram-se agrupadas em placas interligadas, formando unidades funcionais, às quais dá-se o nome de lóbulos hepáticos (direito, esquerdo, caudado e quadrado) (GEERTS et al., 1989; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; TREFTS; GANNON e WASSERMAN, 2017).

O fígado se localiza na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, ao lado direito do corpo humano, estrategicamente entre o trato digestivo e a circulação geral (FOX, 2007), e desempenha uma série de funções vitais para o organismo, tais

como: metabolismo de nutrientes que são absorvidos pelo trato digestivo, processamento e armazenamento, formação e secreção da bile, síntese de proteínas, metabolismo e excreção de diversas substâncias tóxicas, além das funções endócrinas e imunológicas (MARTELLI, 2010).

O fígado é um órgão metabolicamente ativo que armazena glicose como glicogênio e ácidos graxos livres como triglicerídeos (TG). Sintetiza ácidos graxos e colesterol proveniente da enzima acetil-CoA derivada da glicose através da absorção de gordura tais como TG e colesterol da dieta; cataboliza o colesterol para os ácidos biliares, facilitando a secreção biliar do colesterol e a absorção intestinal de gorduras e colesterol dietéticos; obtém ácidos graxos livres dos tecidos adiposos quando o glucagon aumenta para ativar a lipase ativada por hormônio para mobilizar TG; reúne TG para lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) para excreção na circulação sanguínea. VLDL transporta TG para tecidos adiposos para armazenamento e para músculos e outros tecidos para o metabolismo energético. Sintetiza glicose a partir de aminoácidos (gliconeogênese) e libera glicose a partir do glicogênio (glicogenólise), controlando os níveis de glicose no sangue no período de jejum. Por fim, consiste no principal órgão capaz de converter o excesso de ácidos graxos em corpos cetônicos, que fornecem energia ao cérebro e ao músculo durante o jejum fome (MITRA; METCALF, 2009; SENDENSKY; DUFOUR, 2011).

Quando sofre lesões agudas, o fígado é capaz de regenerar-se. Os hepatócitos maduros podem retornar ao ciclo celular e passar por várias divisões celulares para formar novamente a massa hepática. Porém, quando o fígado passa por um processo de agressão contínua, subsidiando um dano hepático crônico, os hepatócitos perdem a capacidade regenerativa e a consequência mais grave é a insuficiência hepatocelular (FORBES, 2008). Na insuficiência hepatocelular exemplifica-se a degeneração celular hepática por acúmulo de lipídios, ou esteatose, encontrada no fígado, por tratar-se de um órgão envolvido no metabolismo da gordura. Pode ocorrer secreção prejudicada de lipoproteínas, aumento da síntese de lipídios, ou até mesmo catabolismo periférico aumentado de gorduras, processos que sentenciam o fígado ao acúmulo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos (PAULO; ROCHA, 2019).

2.3 Implicações da obesidade no fígado: doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

O fígado é um órgão com variadas funções sendo essencial para o metabolismo do corpo e também ao mesmo tempo podendo ser exposto a danos causados por distúrbios crônicos. Dentre diversas etiologias, o consumo de álcool juntamente com uma dieta rica em lipídeos pode elevar os triglicerídeos e ocasionar o acúmulo de lipídios no parênquima hepático (DULY et al., 2015). Além disso, diversas toxinas, a desnutrição proteica, o processo de hipóxia, assim como a obesidade e distúrbios metabólicos genéticos também podem propiciar a esteatose hepática (PINTO et al., 2012).

A esteatose hepática (EH) é o acúmulo de lipídios histologicamente visível no citoplasma dos hepatócitos, podendo atingir 5% a 40% do peso do órgão. As alterações morfológicas hepáticas relacionadas à EH podem ter diversas causas. A partir da década de 1980, as alterações de origem não alcoólicas passaram a ser nomeadas Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) (MARCIANO; URIAS e CARVALHO, 2017).

A DHGNA é definida como o acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos, principalmente os triglicerídios, sendo caracterizada histologicamente, excedendo 5% do peso do fígado na ausência de consumo excessivo de etanol (convencionalmente definido como uma ingestão de etanol de 20 g/dia) e sem outras causas de doenças hepáticas, como drogas ou doenças genéticas (NASCIMBENI et al., 2013; FERNANDES et al., 2017).

A DHGNA pode ser dividida em Esteatose Hepática Não Alcoólica (FGNA) e Esteato-Hepatite Não Alcoólica (EHNA), segundo suas propriedades histológicas. A FGNA é reconhecida como a presença de esteatose hepática sem manifestação de lesão hepatocelular sob a forma de "balão" dos hepatócitos. Em contrapartida, a EHNA é descrita pela presença de esteatose hepática e inflamação com o aparecimento de lesão dos hepatócitos (balão) com ou sem fibrose (CABRAL, 2016).

A DHGNA é a causa mais comum de disfunção hepática no mundo ocidental devido à sua íntima associação com obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (MASARONE et al., 2014; YOUNOSSI et al., 2018). Obesidade e diabetes são os

principais fatores associados e a DHGNA acomete, respectivamente, 90% e 70% das pessoas com estas patologias (TUNISSIOLLI et al., 2017). Em indivíduos obesos, o metabolismo lipídico é prejudicado, o que leva ao acúmulo excessivo de gordura no corpo. Um dos principais locais de depósito potencial de gordura é o fígado, constituindo assim, uma das principais causas do desenvolvimento da DHGNA.

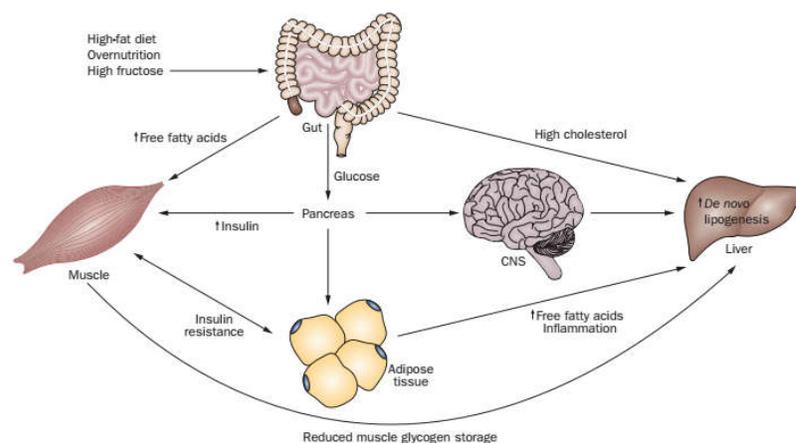
Atualmente sabe-se que 15% a 40% dos casos de EH pode avançar para EHNA manifestando inflamação, balonização e fibrose perissinusoidal e/ou portal, e tipos mais sérios e terminais de doenças hepáticas, por exemplo a cirrose (20% dos casos), carcinoma hepatocelular e fibrose (ELARINY; BARANOVA, 2012; CAZZO; PAREJA e CHAIM, 2017; MARCIANO; URIAS e CARVALHO, 2017; FERNANDES et al., 2017). A EHNA é uma doença de evolução lenta e que pode levar a insuficiência hepática.

A DHGNA ocorre em indivíduos de todas as idades, entretanto é mais comum nos adultos e tende a aumentar com a idade (CORTE et al., 2015). Atualmente, a prevalência de DHGNA é estimada em 20% a 30% nos países ocidentais e 5% a 18% em países asiáticos (BENEDICT; ZHANG, 2017). A prevalência da doença na população mundial é de 24-25% (ARAÚJO et al., 2018). Já a prevalência da EHNA a nível mundial foi estimada entre 2 e 3% (SATAPATHY; SANYAL, 2015). No Brasil foi encontrado uma prevalência em torno de 20% de DHGNA na população geral (COTRIM et al., 2011) e com pacientes diabéticos, encontrou-se uma prevalência de 78% de EHNA (LEITE et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do fígado gorduroso e na progressão da doença não são claros, mas podem estar relacionados a um perfil metabólico no contexto de uma predisposição genética (ABENAVOLI et al., 2014). Os principais fatores de risco são o desenvolvimento de um fígado gorduroso no contexto de obesidade e consequente resistência à insulina periférica e hepática (HEBBARD; GEORGE, 2011). Esses fatores podem promover o acúmulo de gordura intra-hepática e lipotoxicidade, desenvolvimento de um estado inflamatório, estresse oxidativo, apoptose e fibrogênese que determinam a progressão da doença (ABENAVOLI et al., 2015). O surgimento secundário da DHGNA inclui outros fatores de risco, tais como a exposição à xenobióticos, nutrição parenteral prolongada, uso de substâncias hepatotóxicas, *bypass* jejunoileal, entre outros (ARAB; ARRESE e TRAUNER, 2018).

Níveis aumentados de ácidos graxos livres circulantes estão associados à resistência à insulina muscular, enquanto o aumento de carboidratos na dieta pode aumentar a liberação de insulina pancreática. A resposta retardada do músculo à insulina provoca o desvio de carboidratos da síntese de glicogênio muscular para a lipogênese hepática. Por conseguinte, o fluxo de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado aumenta (Figura 2). Mais precisamente, verifica-se um acúmulo de gordura no fígado sob a forma de TGs, que ocorre simultaneamente com um aumento da lipotoxicidade (devido a níveis elevados de AGL, colesterol livre e outros metabolitos lipídicos). Conseqüentemente, o fígado fica suscetível ao *stress* oxidativo. No processo de oxidação de AGL, há um extravasamento de espécies reativas ao oxigênio (EROs). As EROs, por sua vez, vão ter 3 efeitos. O primeiro, a peroxidação lipídica culmina com necrose celular e fibrose hepática. A segunda, a indução de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator de crescimento semelhante à insulina beta e a interleucina 8, resultam, respectivamente, em morte dos hepatócitos, formação de corpos de *Mallory* e ativação da síntese de colágeno, e infiltração de neutrófilos. Por último, a indução da Proteína Ligante Fas (FAS-L) nos hepatócitos leva à morte dos hepatócitos (MEHTA et al., 2002; BUZZETTI; PINZANI e TSOCHATZIS, 2016). Portanto, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio agravam o progresso da doença (PARADIES et al., 2014).

Figura 2. Patogênese da DHGNA.



Fonte: Hebbard e George (2011).

Como agravo da esteatose hepática, a continuidade de um estímulo nocivo não cessante propicia a morte celular consecutiva de hepatócitos, com extravasamento de compostos celulares que causam uma reação inflamatória aguda no órgão, culminando com a resposta imune às células mortas. O processo inflamatório se torna crônico, há substituição das células hepáticas normais por nódulos parenquimatosos provenientes de novas células hepáticas geradas a partir de células-tronco e de hepatócitos sobreviventes. Os hepatócitos regenerativos formam nódulos esféricos delimitados por septos fibrosos. Assim, há deposição excessiva de matriz extracelular em praticamente todo o órgão e, conseqüente, fibrose difusa como processo cicatricial. A esse evento dá-se o nome de cirrose (KUMAR; ABBAS e ASTER, 2013).

As pesquisas com a terapia antioxidante têm causado esperança diante da possibilidade de tratamento da DHGNA. As doenças hepáticas, especialmente as que implicam processo inflamatório, acarretam o estresse oxidativo. Os receptores não enzimáticos de elétrons, substâncias capazes de vencer a oxidação (antioxidantes), como vitaminas E e C, podem exercer uma função importante na proteção da membrana celular, impedindo a propagação da peroxidação lipídica provocada pelos radicais livres e o avanço da esteatose (SANGALI, 2015; SANYAL et al., 2010; SATAPATHY; SANYAL, 2010; SINGAL; JAMPANA e WEINMAN, 2011; UED; WEFFORT, 2013).

Na fase inicial da DHGNA, é difícil diagnosticar esta doença devido à falta de sintomas claros e específicos, bem como métodos diagnósticos. A falta de um bom método diagnóstico cria uma necessidade neste campo, o que não é fácil de realizar, já que uma abordagem para diagnosticar a DHGNA inicial precisaria ser sensível a pequenas mudanças no conteúdo bioquímico do fígado (KOCHAN et al., 2012). Existem métodos não invasivos, embora nenhum deles seja capaz de fornecer a mesma quantidade de informação que é trazida através da biópsia hepática. A ultrassonografia é uma ferramenta de imagem valiosa, pois é econômica e altamente disponível e pode fornecer precisão geral de quase 80% para detectar a DHGNA. A elastografia hepática transitória baseada em ultrassonografia (FibroScan) é um método promissor que pode trazer resultados confiáveis por meio de exame seguro. Todavia, ambos os métodos não apresentam resultados confiáveis para pacientes com ascite e apresentam limitações que podem comprometer a

interpretação dos resultados em pacientes obesos (CAZZO; PAREJA e CHAIM, 2017).

A DHGNA normalmente é diagnosticada por meio de exames bioquímicos hepáticos alterados ou de achados inesperados ecográficos, e deve ser avaliada em indivíduos com níveis de transaminases elevados. Nos testes de função hepática, um aumento moderado das enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase (TGO/AST) e alanina aminotransferase (TGP/ALT)) é possível ser detectado em pacientes com EHNA. Além disso, um aumento superior da ALT em comparação a AST ($AST/ALT < 1$) pode indicar a presença de doença hepática. Os níveis de fosfatase alcalina e/ou gamaglutamiltransferase (GGT) podem estar moderadamente elevados a elevados em fase tardias da doença (YOUNOSSI et al., 2016; SPENGLER; LOOMBA, 2015).

Na fase inicial, a ecografia transabdominal é o exame de imagem mais empregado na prática clínica por causa da disponibilidade, baixo custo e não utilização de radiação. Contudo, não possibilita identificar esteatose hepática quando os níveis estão abaixo de 30% e também não é capaz de diferenciar esteatose isolada, EHNA e fibrose hepática. A tomografia axial computadorizada (TAC) além de emitir radiação também não possibilita a diferenciação dos estágios da DHGNA, é menos sensível que a ecografia transabdominal e que a ressonância magnética nuclear (RMN) na identificação de esteatose hepática (CABRAL, 2016; OLIVEIRA, 2006).

Devido as aminotransferases séricas e os exames imagiológicos não investigarem de modo seguro a existência de esteato-hepatite e de fibrose, a biopsia hepática é o exame padrão ouro para a determinação da histologia hepática em pacientes com DHGNA. Todavia, tem um alto custo, é invasiva e tem riscos relacionados. Sendo assim, é recomendado que seja empregada de acordo com a necessidade de estabelecimento do diagnóstico, orientação terapêutica e perspectivas prognósticas (CABRAL, 2016; OLIVEIRA, 2006).

2.4 Nitrato de sódio

O nitrato de sódio, $NaNO_3$, é encontrado em depósitos que ocorrem naturalmente associados com cloreto de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio,

nitrato de potássio, cloreto de magnésio e outros sais. As concentrações de nitrato de sódio foram relatadas em vários países, mas os únicos a serem explorados comercialmente são os depósitos únicos ricos em nitrato no Chile, na América do Sul. À temperatura ambiente, o nitrato de sódio é um sólido inodoro e incolor, moderadamente higroscópico, com sabor salino e muito solúvel em água, amônia e glicerol (POKORNY; MATURANA, 2000).

Na nossa dieta, os vegetais são fontes importantes de nitrato, sendo rúcula, alface, beterraba e espinafre os que possuem maiores concentrações de nitrato (HOBBS; GEORGE e LOVEGROVE, 2013). Outras fontes de nitrato incluem carnes processadas, onde nesse caso, estes são adicionados para serem utilizados como conservantes prevenindo a oxidação lipídica e crescimento bacteriano.

Alguns estudos sugerem que os nitratos podem ter papel carcinogênico devido a formação de compostos N-nitrosos, representando risco para a saúde humana (GROSSE et al., 2006; FESKENS; SLUIK e VAN WOUDEBERGH, 2013; MICHA; WALLACE e MOZAFFARIAN, 2010). Outros estudos apoiam um papel terapêutico para o nitrato e nitrito, principalmente no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, obesidade e síndrome metabólica (LUNDBERG et al., 2009; LUNDBERG et al., 2011, LUNDBERG; WEITZBERG e GLADWIN, 2008). O nitrato inorgânico e nitrito de fontes endógenas ou dietéticas são metabolizados não enzimaticamente em óxido nítrico (NO) e outros óxidos de nitrogênio bioativos, favorecido em condições de hipóxia, através do sistema de redução nitrato-nitrito-NO. Nesta via, bactérias anaeróbicas facultativas presentes na cavidade bucal utilizam o nitrato (NO_3^-) como acceptor final de elétrons (alternativo ao processo de respiração celular) reduzindo-o à nitrito (NO_2^-). O nitrito segue ao estômago, onde, devido ao ambiente ácido, poderá ser reduzido ao NO e outras espécies intermediárias reativas de nitrogênio. Uma parte do nitrito é absorvida no intestino que posteriormente entrará na circulação aumentando sua concentração no sangue. O nitrato e o nitrito sanguíneos atingem líquido extracelular por transporte passivo e também podem entrar no citoplasma de células acinosas de glândulas salivares por transporte ativo. No geral, aproximadamente 25% do nitrato provindo da dieta são captados pelas glândulas salivares (LUNDBERG; GOVONI, 2004).

O NO é uma molécula sinalizadora biológica oxidativa em diversos processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento da musculatura lisa e regulação imune (ANTOSOVA, 2012;

LOSCALZO; WELCH, 1995; CALABRESE et al., 2007; BOGDAN, 2001). Convencionalmente, o NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOSs), que consistem em três isoformas: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, NOS1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS, NOS2) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, NOS3). Estas enzimas produzem NO através do metabolismo da L-arginina em L-citrulina (ANDREW, 1999). No entanto, a via nitrato-nitrito-NO está emergindo como um importante mediador da regulação do fluxo sanguíneo, sinalização celular, energética e respostas teciduais à hipóxia (LUNDBERG et al., 2009).

Foi demonstrado que camundongos deficientes em eNOS apresentaram redução do ganho de peso, da gordura visceral e das concentrações de triglicérides no plasma em comparação com os controles. Além disso, estes animais apresentaram diminuição das concentrações de glicose no sangue em jejum e hemoglobina glicosilada, e melhorando a tolerância à glicose. Os efeitos do nitrato foram alcançados com uma concentração de nitrato correspondente a uma ingestão diária de 100-300g de um vegetal rico em nitrato, como o espinafre (CARLSTROM et al., 2010). No entanto, os mecanismos que impulsionam esses efeitos ainda não foram elucidados, especialmente no fígado (MCNALLY; GRIFFIN e ROBERTS, 2016).

2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode ser dividida em diferentes regiões de energia que correspondem a diferentes técnicas espectroscópicas. A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e a das micro-ondas. A porção de maior utilidade para a química orgânica apresenta números de onda situados entre 400 e 4.000 cm^{-1} , sendo conhecida como infravermelho médio (SUN, 2009).

A radiação infravermelha na faixa aproximada de 100 a 10.000 cm^{-1} converte-se, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. O comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas

dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRILL, 1994).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais e deformações angulares. Os modos vibracionais podem ser simétricos ou assimétricos. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As bandas características de grupamentos químicos úteis para a identificação da estrutura molecular envolvem frequentemente vibrações acopladas (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRILL, 1994; STUART, 2005).

As bandas de absorção, entretanto, correspondem predominantemente a um único modo vibracional. Certas bandas de absorção, como, por exemplo, as provenientes dos modos de deformação axial de C–H, O–H e C=O, permanecem razoavelmente fixas no espectro, independentemente de possíveis interações. A posição exata da banda de absorção e as mudanças nos contornos das bandas revelam detalhes importantes da estrutura (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRILL, 1994).

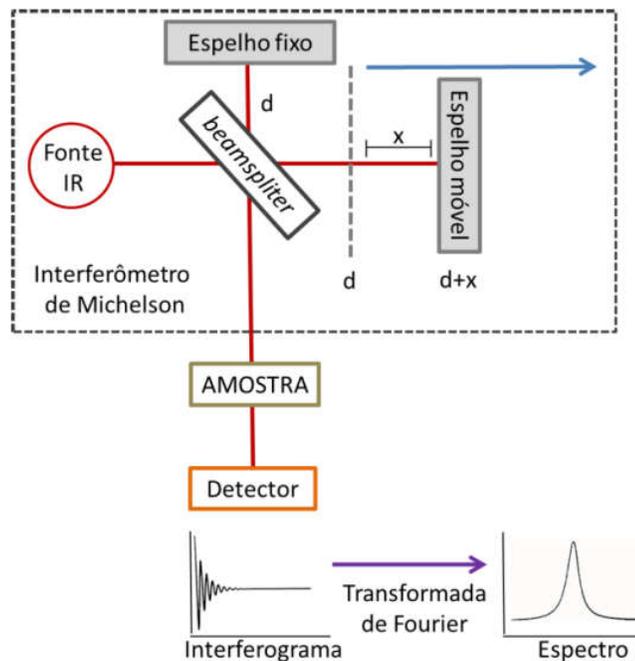
Os instrumentos originais para a obtenção de espectros de infravermelho foram do tipo dispersivo. Esses instrumentos separavam as frequências individuais da energia emitida pela fonte de infravermelho. A radiação transmitida era varrida por dispersão na rede de difração. A espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi desenvolvida a fim de suplantiar as limitações encontradas com instrumentos dispersivos. A principal dificuldade era o lento processo de varredura. Este método utilizando um interferômetro pode medir todas as frequências de infravermelho simultaneamente, ao invés da varredura individual que era necessária anteriormente (SUN, 2009).

São três componentes básicos de um espectrômetro: a fonte de radiação no infravermelho médio; um interferômetro de Michelson, formado por dois espelhos, sendo um fixo e outro móvel; e um divisor de feixe, composto de um cristal de Brometo de Potássio (KBr) (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). Um *layout* típico de espectrofotômetro é exibido na Figura 3. Um feixe de radiação é incidido no interferômetro de Michelson e ao passar pelo espelho semi-prateado (divisor de feixe) divide-se, percorrendo dois caminhos distintos e perpendiculares entre si, ou seja, 50% da radiação é transmitida e 50% é refletida. Ambos retornam ao divisor de feixes recombinando-se com um perfil do batimento, formando interferências

construtivas e destrutivas, sendo estas direcionadas à célula de ATR. Após o feixe incidir na amostra este é direcionado a um detector fotossensível que irá captar o sinal luminoso, transformando-o em um interferograma, que por sua vez, passará pela Transformada de Fourier, convertendo o interferograma em um espectro de absorção óptica infravermelha, sendo do tipo intensidade de absorção (ou absorvância) em função do número de onda (relacionado à energia vibracional da molécula) (FIGUEIREDO, 2009).

Os equipamentos funcionam com o princípio do interferômetro de Michelson, operando em sistema de feixe simples ou de feixe duplo. Os sistemas trabalham no padrão de varredura rápida e de autoalinhamento. A radiação policromática, proveniente da fonte, é colimada e dirigida para o interferômetro, encontrando toda uma óptica de condensação e focalização. O tamanho do foco na amostra geralmente varia de 0,5 a 10 mm. Equipamentos sofisticados apresentam detectores altamente sensíveis, refrigerados com nitrogênio ou hélio líquidos. A calibração e o alinhamento dos equipamentos interferométricos são feitos através de um *laser*, comumente de hélio e neônio. As velocidades de varredura do espelho móvel geralmente se encontram na faixa de 0,01 a 3,1 cm/s, que permite a obtenção de um espectro completo em cerca de 0,2 s. A resolução em número de onda para as configurações padrão está na faixa de 0,2 a 5 cm^{-1} . Adicionalmente, destaca-se que a presença de um sistema de reflexão atenuada tipo ATR permite que as amostras sejam avaliadas de forma direta no sistema ATR-FTIR sem a utilização de pastilhas de KBr. O sistema computacional empregado é concebido de modo que haja um *software* operacional para controle de todo o instrumento e um conjunto importante de aplicativos (ALVES, 2018).

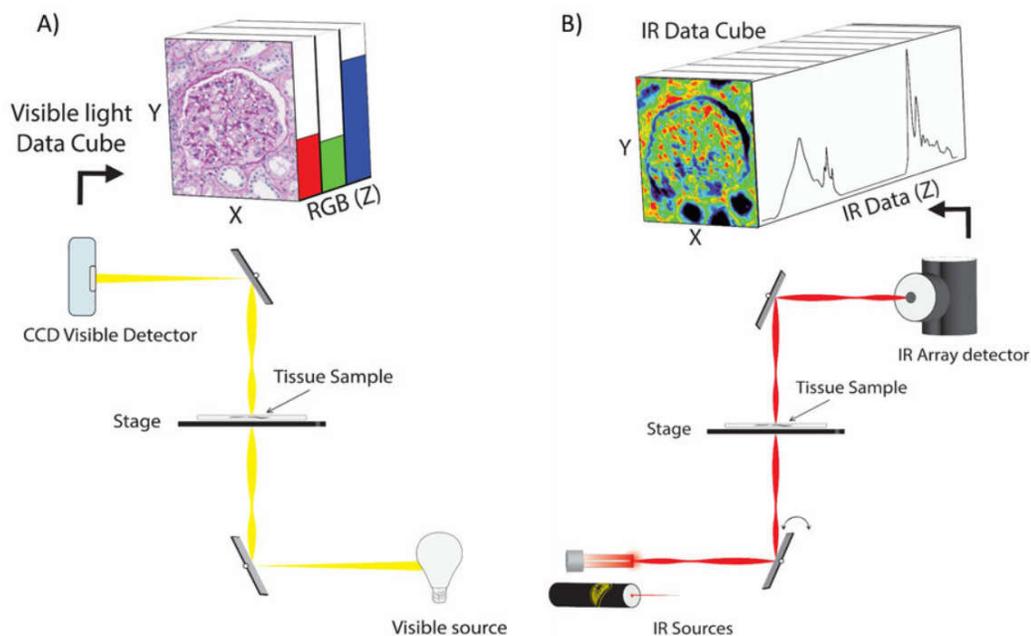
Figura 3. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR.



Fonte: Benetti (2014).

Um sistema IR possui sistemas de fonte de luz e detecção de luz visível e infravermelho. (A) A luz visível é usada para visualizar a amostra e encontrar a área de interesse na seção de tecido. O detector CCD visível no sistema coleta a luz visível e cria um cubo de dados com uma imagem RGB (3 bandas, Z) acoplada à dimensão espacial (X, Y). Após a região ser encontrada, os espelhos no sistema voltam-se para a fonte / detector de infravermelho e uma fonte de infravermelho é usada para obter uma imagem. (B) À medida que o IV médio passa pela amostra, diferentes regiões são absorvidas por diferentes biomoléculas (glicogênio, DNA, proteínas, etc.) para dar uma impressão digital da composição química do tecido por meio de um detector/sensor sensível a IR. Isto permite a criação de uma imagem com possivelmente mais de 200 bandas de dados / imagens (Z) que podem ser acoplados com dados espaciais (X, Y) para cada banda espectral registrada no eixo Z (Figura 4).

Figura 4. Esquema de um sistema de imagem IR típico.



Fonte: VARMA et al. (2016).

É possível obter espectros de gases, líquidos e sólidos no infravermelho. A qualidade do espectro final depende de etapas intermediárias realizadas pelo computador, nas quais se tem uma compensação de artefatos instrumentais, funções de truncamento, etc. Existem correções de fase, funções de apodização, correções de linha de base e outras peculiaridades no método de espectroscopia FTIR (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRILL, 1994). A intensidade ou área de absorção (IR) proveniente de uma determinada espécie é diretamente proporcional à concentração dessa espécie (SELVARAJU; SUBBASHINIDEVI, 2011).

No tratamento de dados de espectroscopia é usual a utilização de métodos estatísticos multivariados, uma vez que a espectroscopia origina uma grande quantidade de dados. Assim, as técnicas quimiométricas permitem extrair essa informação dos espectros, possibilitando identificar padrões de evolução dos materiais em processo, agrupamento de amostras e detecção de amostras anômalas, permitindo também estimar valores de parâmetros analíticos após metodologias de calibração prévia (SANTOS, 2007).

A espectrofotometria na faixa do infravermelho apresenta-se como uma poderosa ferramenta na identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, pois é capaz de identificar diferentes ligações químicas entre átomos pelas deformações rotacionais e vibracionais, as quais absorvem energia em determinada frequência de ressonância, de acordo com as características químicas dos átomos envolvidos (SKOOG et al., 2010). Esta técnica apresenta confiabilidade nos dados gerados em relação à caracterização, identificação e quantificação da estrutura da amostra analisada (SHAI, 2013).

Técnicas espectroscópicas têm sido amplamente estudadas como instrumento potencial de diagnóstico que pode fornecer informações sobre a estrutura química e morfológica do tecido em tempo quase real (CRUPI et al., 2004; KOCHAN et al., 2012). Nas últimas décadas, devido a evolução contínua da espectroscopia ATR-FTIR, esta tem sido amplamente aplicada em áreas biomédicas para estudar os processos de doenças. De fato, esta técnica é capaz de fornecer informações relevantes sobre a dinâmica de proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos, colágeno e glicogênio (SREEDHAR et al., 2016) isoladamente e em solução. Além disso, uma das vantagens no uso da espectroscopia ATR-FTIR é a oportunidade de analisar amostras facilmente preparadas com dimensões reduzidas (menos de 1 mm de espessura e com um diâmetro inferior a 1 cm). Muitos esforços têm sido feitos para melhorar esta técnica espectroscópica como um método de diagnóstico para identificar alterações de composição química em tecidos corporais com alterações patofisiológicas, uma vez que esta é capaz de detectar a doença em um estágio muito precoce. De fato, toda mudança na composição química do tecido deve preceder qualquer manifestação morfológica da doença (CRUPI et al., 2004).

Trabalhos anteriores no fígado de animais demonstraram que danos e doenças neste órgão levam a alterações nos espectros de absorção (IR) do tecido (CRUPI et al., 2004; SELVARAJU; SUBBASHINIDEVI, 2011; KOCHAN et al., 2012; SHENG et al., 2015; LE NAOUR et al., 2015; SREEDHAR et al., 2016).

Em trabalho desenvolvido para caracterizar, por técnica espectroscópica (FTIR), os danos e a regeneração causados pela administração de tetracloreto de carbono no fígado de ratos em uma faixa de comprimento de onda $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ foram identificados alterações de composição. A faixa de $1800\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$, típica de C–C alongamento de lipídios em C–O e a região de alongamento vibracional de C–H em $3200\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ demonstram a presença de lesões precoces do parênquima

hepático devido ao tratamento com tetracloreto de carbono. Esse dano refletiu a variação nas intensidades das bandas lipídicas, tanto em baixa quanto em alta frequência, de acordo com as alterações morfológicas e bioquímicas típicas do fígado na presença de esteatose (CRUPI et al., 2004).

O potencial da microespectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) pode determinar a severidade da esteatose em cortes de tecido congelados. Sabe-se que a progressão da esteatose corresponde não apenas ao acúmulo de lipídios, mas também a mudanças na composição qualitativa do tecido. Concluíram que um grau mais baixo de esteatose mostrou uma diminuição no conteúdo de glicogênio e um aumento concomitante de lipídios em comparação com o fígado normal. A esteatose intermediária exibiu um aumento no glicogênio e aumento de ácidos graxos esterificados com cadeias de carbono alongadas e lipídios insaturados, e essas características foram mais pronunciadas em um alto grau de esteatose (PENG et al., 2015).

Em pesquisa utilizando a espectroscopia de infravermelho em amostras de fígado humano congeladas com vários níveis de esteatose (0-90%) apresentaram importantes variações na intensidade das bandas atribuídas a lipídios (3000-2800 cm^{-1}). Destaca-se que estas alterações foram observadas mesmo na parte não esteatótica dos fígados gordurosos, apesar do aspecto histológico normal, reforçando assim que a microespectroscopia IR permite detectar pequenas mudanças químicas com alto grau de sensibilidade e especificidade que ocorrem no tecido hepático. Em contraste, foi descrito que a intensidade das bandas atribuídas às proteínas (Amida I e Amida II: 1485-1710 cm^{-1}) não foi significativamente afetada pela esteatose (LE NAOUR et al., 2015).

A espectroscopia ATR-FTIR do fígado pode representar um método poderoso e confiável para a avaliação quantitativa da esteatose hepática, o que pode revelar-se útil para avaliar a progressão da doença hepática em modelos animais de DHGNA, bem como em pacientes com obesidade ou outras doenças que afetem a fisiologia dos hepatócitos (KOCHAN et al., 2012; LE NAOUR et al., 2015).

Outro estudo avaliou o efeito de etanol no fígado de ratos utilizando a técnica FTIR e observaram que existe um aumento do processo peroxidativo no fígado dos animais tratados. Sabe-se que as bandas lipídicas dominantes na região 3030-2800 cm^{-1} se originam das vibrações de estiramento C-H das cadeias aciladas gordurosas dos lipídios de membrana. A intensidade da banda olefínica = CH pode ser usada

como um índice de concentração relativa de ligações duplas na estrutura lipídica de lipídios insaturados. Estas ligações duplas originam-se principalmente de produtos finais peroxidativos lipídicos, como o malondialdeído (SELVARAJU; SUBBASHINIDEVI, 2011).

Há também trabalhos sobre o estudo espectroscópico de FTIR de doenças como câncer de fígado (SHENG et al., 2015; PENG et al., 2016) e outro que utilizou o FTIR para discriminar nódulos cirróticos benignos, nódulos pré-malignos (displásicos) e malignos (cancerígenos) no fígado cirrótico (PENG et al., 2016).

Contudo, trabalhos recentes evidenciam que a técnica espectroscópica FTIR fornece espectros confiáveis que podem ser usados para distinguir espécimes normais de lesionados (SELVARAJU; SUBBASHINIDEVI, 2011). Vale ressaltar que a espectroscopia FTIR fornece uma análise quantitativa com as vantagens de rápida caracterização e boa reprodutibilidade (KOCHAN et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer modos vibracionais para detectar alterações na composição molecular do fígado de camundongos obesos pela plataforma ATR-FTIR e avaliar o efeito do tratamento com nitrato de sódio no tecido hepático.

3.2 Objetivos específicos

a) Determinar o perfil dos componentes químicos do fígado de camundongos obesos por espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR);

b) Avaliar o efeito do nitrato de sódio nos componentes químicos do fígado de camundongos obesos por espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).

4 ARTIGO 1. Molecular Changes in Liver Induced by High Fat Diet and Sodium Nitrate Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Molecular Changes in Liver Induced by High Fat Diet and Sodium Nitrate Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy

PARREIRA ALANE, C. R.¹, BORGES, M.F.², CARDOSO-SOUSA, L.¹, AGUIAR, E. M. G.^{1,3}, ALVES, G.M.², OLIVEIRA, S.W.^{1,3}, FERNANDES, N.B.O.², ESPINDOLA, F.S.², BOTELHO, F.², SABINO-SILVA, R.^{1,*}

¹Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

²Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding Author:**

Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil

Phone: +55 34 82 3218 2100

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract:

Monitoring of changes in liver is a time consuming and costly practice in obesity. Consequently, the search for a more cost-effective (reagent-free), specific and fastly analysis method to detect changes in liver induced by obesity is of great interest. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy has been used in diseases monitoring, however, applications in tissues are incipient. Here, we used ATR-FTIR spectroscopy to evaluate liver of control diet (CD + Placebo), high fat diet (HFD + placebo), CD + NaNO₃, HFD + NaNO₃ C57BL/6 mice to identify potential spectral biomarkers related to obesity. The liver spectrum of CD + Placebo, HFD + placebo, CD + NaNO₃, HFD + NaNO₃ mice showed fourteen vibrational modes and from these, eight vibrational modes were pre-validated as potential monitoring biomarkers of liver changes by ROC curve. Besides, the NaNO₃ treatment promotes reduction in six vibrational modes affected by HFD. Altogether, 3008, 2923, 2854, 1741, 1459 e 1161 cm⁻¹ spectral liver biomarkers may provide a novel robust alternative for monitoring obesity-induced changes in liver. Besides, 1229 and 923 cm⁻¹ are spectral candidates to indicate liver damage by NaNO₃.

Keywords: obesity, FTIR, infrared spectroscopy, lipids, sodium nitrate.

Introduction

The increased prevalence of obesity worldwide has been characterized as a pandemic¹. It seems to be associated by changes in the global food system². The high-fat diet consumption contributes to development of obesity, which is related with pathological changes in various organ in the human body³. Obesity contributes with a decline in life expectancy, which is associated with higher risk of several pathological conditions such as type 2 diabetes mellitus, hypertension, myocardial infarction, stroke, obstructive sleep apnoea, cancers and, specially, fatty liver disease¹.

The main liver disease associated with obesity is a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is primarily revealed by aggregation of lipids in liver, frequently in lipid droplets (LDs)⁴. Early diagnosis of molecular changes in liver associated with high-fat diet-induced obesity can improve prognosis and to delay hepatic changes associated with obesity. One of the challenges in the field is the lack of a simple assay for the detection of molecular changes in liver without laborious, time-consuming, and expensive protocols⁴. Besides, it is known that nitric oxide (NO) and its metabolites arginine are associated in pathophysiological changes induced by obesity via reduced bioavailability of NO⁵.

Inorganic nitrate (NO_3^-) is a precursor of NO in the body. Nitrates is composed by nitrogen and is a part of the nitrogen cycle in the cells. Nitrate is physiologically produced in body and present in vegetables and water⁶. Several studies using dietary nitrate supplementation in rodents and humans show profitable effects on host defense and cardiovascular system. On the other hand, there is a long withstanding concern regarding the putative adverse effects of chronic nitrate exposure related to possible adverse effects⁷. Sodium nitrate improved the plasma lipid profile and plasma markers of liver function in a murine model of hypertension associated with obesity. Besides, sodium nitrate also reduced inflammatory cell infiltration in liver and high-carbohydrate and high-fat diet, reduced inflammatory cell infiltration in heart and liver⁸. On the other hand, the intensive use of nitrates as agricultural fertilizers and as a food agent (preservative and antimicrobial function) has received considerable attention⁹. The focus on ingested nitrate occur due to its microflora conversion in gastrointestinal tract to a toxic nitrite¹⁰.

Infrared (IR) spectroscopy is emerging as a powerful quantitative and qualitative technique for diagnostic characterization of biological molecules in fluids and tissues¹¹. The attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectrometry is a global, sensitive and highly reproducible physicochemical analytical technique that identifies

structural molecules on the basis of their IR absorption¹². Considering that a biomolecule is determined by its unique structure, each biomolecule will exhibit a unique ATR-FTIR spectrum, representing the vibrational mode of this structural bond^{12,13}. The IR vibrational modes of biological samples may be considered as biochemical fingerprints that correlate directly with the presence or absence of diseases, and, further, provide the basis for the quantitative determination of several analytes of diagnostic interest^{14,15}.

In the present study, we tested the hypothesis that specific spectral biomarkers can be identified in liver of mice fed a high-fat diet (HFD), and the differentially expressed spectral ATR-FTIR vibrational modes can be used as liver biomarkers for detection of changes in liver molecular composition. Besides, we suggest that the sodium nitrate can be reduce the molecular changes induced by HFD. Thus, the aims of present study were to establish vibrational modes to detect changes in liver molecular composition by ATR-FTIR platform and evaluate the molecular effect of sodium nitrate in this tissue.

Results

Characterization of obesity and cholesterol

To confirm the effectiveness of obesity induction and sodium nitrate treatment, several parameters were assessed in anesthetized animals. As expected, table 1 shows that HFD + Placebo increase body weight ($p < 0.05$), weight gain ($p < 0.05$), increase adipose tissue ($p < 0.05$) and caloric intake ($p < 0.05$) compared with CD + Placebo animals. Besides, in comparison with CD + Placebo, lower water intake ($p < 0.05$) and lower relative liver weight ($p < 0.05$) were observed in HFD + Placebo animals. NaNO_3 treatment do not change body weight, Δ body weight, water intake, adipose tissue and liver weights in CD and HFD animals. The blood cholesterol and liver cholesterol are increased in HFD + Placebo and HFD + NaNO_3 than CD + Placebo animals. However, it is important point out that only liver cholesterol was increased in CD + NaNO_3 than CD + Placebo animals.

ATR-FTIR spectra of liver

The liver absorbance based on infrared spectra of liver CD, HFD, CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 is represented in Figure 2. It demonstrates a superposition of several spectral liver components. These liver spectra showed several significant differences among CD, HFD, CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 conditions. The liver vibrational modes at 3067 cm^{-1} and 2962 cm^{-1} decreased ($p < 0.05$) in HFD than CD animals. Curiously, the effect of sodium

nitrate in CD and HFD animals were opposite in liver vibrational modes at 3067 cm^{-1} and 2962 cm^{-1} , in CD animals sodium nitrate treatment reduced ($p < 0.05$) these vibrational modes; on the other hand, this treatment increased ($p < 0.05$) these vibrational modes in HFD animals. However, the vibrational mode at 3067 cm^{-1} was decreased ($p < 0.05$) in HFD + NaNO_3 compared to CD animals (Figures 3.A and 3.C). The liver vibrational modes at 3008 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1459 cm^{-1} and 1161 cm^{-1} were higher ($p < 0.05$) in HFD, CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 compared with CD animals. Besides, the levels of this vibrational modes were decreased ($p < 0.05$) in HFD + NaNO_3 compared to HFD animals (Figures 3.B, 3.D, 3.E, 3.H e 3.L). The 1741 cm^{-1} liver vibrational mode was increased ($p < 0.05$) in HFD, CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 compared with CD animals. However, the 1741 cm^{-1} liver vibrational mode did not change among HFD and HFD + NaNO_3 animals (Figure 3.F). In addition, 1642 cm^{-1} liver vibrational mode was similar in CD and HFD animals. Moreover, this vibrational mode was higher ($p < 0.05$) in CD + NaNO_3 than CD animals (Figure 3.G). The 1397 cm^{-1} liver vibrational mode decreased ($p < 0.05$) in HFD and HFD + NaNO_3 than CD animals. Besides, this liver vibrational mode did not change among CD and CD + NaNO_3 and HFD and HFD + NaNO_3 animals (Figure 3.I). The liver vibrational mode at 1310 cm^{-1} was only increased ($p < 0.05$) in HFD, CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 compared with CD animals (Figure 3.J). The liver vibrational mode at 1229 cm^{-1} was increased ($p < 0.05$) in CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 compared with CD and HFD animals (Figure 3.K). The liver vibrational mode at 1057 cm^{-1} was only increased ($p < 0.05$) in HFD + NaNO_3 compared with CD animals (Figure 3.M). Furthermore, the liver vibrational mode at 923 cm^{-1} was increased ($p < 0.05$) in CD + NaNO_3 and HFD + NaNO_3 compared with CD animals (Figure 3.N). The liver ATR-FTIR vibrational modes assignments are represented in Table 2.

Pre-validation as diagnostic potential by ROC curve

Considering that, sensitivity and specificity are basic characteristics to determine the accuracy of diagnostic test, ROC analysis were used to ascertain the potential diagnostic of these vibrational modes to molecular changes in liver related with High-fat diet-induced obesity (Figure 4). The area under curve (AUC) of 3067 cm^{-1} , 3008 cm^{-1} , 2962 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1741 cm^{-1} , 1459 cm^{-1} and 1161 cm^{-1} liver vibrational mode was 1 ($p < 0.0027$) with a sensitivity of 100% and specificity of 100% to a specific cutoff values as described in figure 4 (Figure 4.A, 4.B, 4.C, 4.D, 4.E, 4.F, 4.H and 4.L). The AUC of 1397 cm^{-1} e 1310 cm^{-1} and liver vibrational modes were significative ($p < 0.05$) with a sensitivity and specificity

higher than 70% (Figure 4.I and 4.J). On the other hand, AUC of 1642 cm^{-1} , 1229 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} and 923 cm^{-1} liver vibrational modes were similar ($p > 0.05$).

Discussion

Herein, we have investigated potential monitoring biomarkers of changes in liver of obese rats using ATR-FTIR technology. Ten infrared vibrational modes (3067, 3008, 2962, 2923, 2854, 1741, 1459, 1397, 1310 and 1161 cm^{-1}) were pre-validated as potential monitoring biomarkers of liver changes by ROC curve; which indicate a robust alternative for monitoring obesity-induced changes in liver. Besides, the NaNO_3 treatment promotes reduction in six (3008, 2923, 2854, 1741, 1459 e 1161 cm^{-1}) infrared vibrational modes affected by HFD. It is important point out that NaNO_3 also increased the vibrational modes at 3067, 2962 and 1229 cm^{-1} indicating a liver damage or a liver collateral effect induced by NaNO_3 . Besides, the changes in vibrational components related with lipids, fatty acids and cholesterol are related with changes in total cholesterol in liver.

To confirm the effectiveness of obesity induction and NaNO_3 treatment, several parameters were assessed in anesthetized animals. As expected, table 1 shows that HFD + Placebo increase body weight ($p < 0.05$), weight gain ($p < 0.05$) and increase adipose tissue ($p < 0.05$) compared with CD + Placebo animals. Besides, in comparison with CD + Placebo, lower water intake ($p < 0.05$) and lower relative liver weight ($p < 0.05$) were observed in HFD + Placebo animals. NaNO_3 treatment do not change body weight, Δ body weight, water intake, adipose tissue and liver weights in CD and HFD animals.

As expected in obesity animals, body weight, weight gain and adipose tissue are increased in rats treated with HFD. These data are consistent with other animal studies with HFD treatment^{16,17,18} and reflected an animal model of obesity. In addition, sodium nitrate treatment does not change body weight, body weight gain, water intake, adipose tissue weight and liver weight in CD and HFD animals.

The method of analyzing infrared vibrational modes of dried liver samples described here may be used in human and murine models. The quantification of specific vibrational models can be used to obtain profitable data about sample composition, which may have diagnostic and monitoring potential lipid and protein changes in liver¹⁹. The liver spectral infrared pattern of ten vibrational modes representing chemical secondary structure of lipids and proteins appear to be different between obesity and non-obesity conditions. The liver steatosis may be measured in tissue sections placed on CaF_2 by FTIR equipped with a

microscope and MCT focal plane array detector²⁰. This study describes preparation of suitable material for FTIR including frozen liver specimens with optimum cutting temperature (OCT) and paraffin-embedded tissue sections. This protocol can be applied with the same tissue sections used for pathologists as an important auxiliary method. However, the protocol applied in present study can be used as an alternative diagnostic/monitoring during intraoperative access of liver, since it is a rapid, label-free and cost effective analytical protocol^{21,22}.

The liver infrared vibrational modes at 3008, 2923, 2854 and 1741 cm^{-1} are assigned to lipids. The quantification of these different vibrational modes can be used to detect changes in several molecular components of lipid droplets in liver, which can be applied as an alternative diagnostic/monitoring method. Eight of these ten liver infrared vibrational modes showed a 100% of sensitivity and 100% of specificity in ROC analysis. The ROC curve analysis plotting the true positive rate and the false positive rate at several threshold levels settings and, in this way, it can be considered the best statistically valid method for diagnostic/monitoring biomarker performance analysis²³. The HFD treatment also promote effect in non-lipid molecular components, as collagen, C=O, Amide III and stretching of C-O single bond. The decrease expression of C=O component is in agreement with lower expression of SR-B1 and ABCA1 proteins under HFD treatment²⁴.

Furthermore, it is important point out that liver infrared vibrational modes assigned to lipids (3008, 2923, 2854 and 1741 cm^{-1}) are reduced in NaNO_3 treated HFD animals. However, these molecular components are increased in NaNO_3 treated control animals, indicating a potential collateral effect of NaNO_3 in non-obese animals. Furthermore, a significant effect of NaNO_3 occur in vibrational modes at 1229 and 923 cm^{-1} which reinforces the attention to liver effects of NaNO_3 . The changes in several infrared vibrational modes by NaNO_3 treatment can be considered an alarm to the potential risk of liver damage, especially in non-obese patients. The intensive use of nitrates as a food agent should now urgently analyzed with attention to the liver effects. The present study also showed changes in total cholesterol of liver under NaNO_3 treatment, which indicate that NO_3 can change metabolic pathways in liver.

Although we demonstrated that infrared vibrational modes are useful to identify potential diagnostic/monitoring biomarkers for changes in liver induced by obesity in animal models, this is a first exploratory study using fresh samples in ATR-FTIR technology for this purpose. Therefore, further studies are needed to validate the suggested liver spectral diagnostic/monitoring biomarkers in obese and consumers high fat diet.

In conclusion, we showed that ATR-FTIR spectroscopy in liver samples differentiate obese from non-obese conditions in rats which could be continue to be explored as an additional method for detection of molecular components changes in liver. Our study highlighted eight liver infrared vibrational modes with high accuracy (AUC:1; sensitivity: 100% and specificity: 100%) to differentiate obesity from matched non-obesity conditions. In addition, others infrared spectral biomarkers demonstrated a potential risk of NaNO_3 consuming to change molecular parameters in liver.

Methods

Animals

This study was carried out in accordance with recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Laboratory Animals Science (SBCAL). All experimental procedures for the handling, use and euthanasia were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (UFU) (License #CEUA-UFU No. 128/2015) according to Ethical Principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). All effort was taken to minimize the number of animals used and their discomfort.

C57BL/6 mice were obtained from Center for Bioterism and Experimentation at the Federal University of Uberlandia (CEBEA-UFU). The animals were maintained under standard conditions (22 ± 1 °C, $60\% \pm 5\%$ humidity and 12-hour light/dark cycles, light on at 7 AM) and were allowed with free access to standard diet and water at the (CEBEA-UFU) rodent housing facility.

Five-week old C57BL/6 male mice were fed a high-fat diet (587.5 kcal/100g; Research Diets High-Fat Diet 37,5% fat, protein 20,3%, carbohydrate 42,2%; HFD: n=7); or standard laboratory chow (309.1 kcal/100g; Nuvilab CR-1 Diet 3.4% fat, protein 25%, carbohydrate 45%; CD: n=9) for a diet duration of 20 weeks. At 11 weeks, the mice received placebo or NaNO_3 (1mM) during 10 weeks performing Chow Diet + placebo (CD + placebo), High-Fat Diet + placebo (HFD + placebo), CD + NaNO_3 , HFD + NaNO_3 . All mice were maintained under controlled temperature and photoperiod (12 hr light, 12 hr dark). The animals were individually placed in a container to be weighed once weekly during the protocol. After euthanasia (Ketamine 80 mg/kg and Xilasine 10 mg/kg), blood, liver and adipose tissue were removed and were frozen in -70°C to further analysis (Figure 1).

Chemical profile in liver by ATR-FTIR Spectroscopy

Liver spectra were recorded in 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} region using ATR-FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) using a micro-attenuated total reflectance (ATR) component. The crystal material in ATR unit was a diamond disc as internal-reflection element. The lyophilized liver penetration depth ranges between 0.1 and 2 μm and depends on the wavelength, incidence angle of the beam and the refractive index of ATR-crystal material. In the ATR-crystal the infrared beam is reflected at the interface toward the sample. 10 μg of liver was directly inserted on ATR-crystal for spectra recorded. The air spectra was used as a background in ATR-FTIR analysis. Sample spectra and background was taken with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans were performed for liver analysis.

Spectra data evaluation procedures

The spectra data obtained were processed using Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). For the generation of mean spectra and band areas, the spectra were normalized by vector and baseline corrected to avoid errors during the sample preparations and spectra analysis.

Statistical analysis

The data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey Multiple Comparison as a *post-hoc* test. For all biomarkers candidates, we constructed the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and computed the area under the curve (AUC) value, sensitivity and specificity by numerical integration of the ROC curve. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test the normality of the variables. All analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean \pm S.D.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from CAPES/CNPq (#458143/2014; 458943/2014-2), FAPEMIG (#APQ-02872-16) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). We would like to thank our collaborators at the Dental Research Center in Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology (CPbio).

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- 1 Bluher, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology* **15**, 288–298, doi: 10.1038/s41574-019-0176-8 (2019).
- 2 Swinburn, B. A. *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet* **378**, 804–814. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1 (2011).
- 3 Hill, J. O. & Peters, J. C. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science* **280**, 1371–1374. doi.org/10.1126/science.280.5368.1371 (1998).
- 4 Younes, R. & Bugianesi, E. A spotlight on pathogenesis, interactions and novel therapeutic options in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **16**, 80–82. doi.org/10.1038/s41575-018-0094-6 (2019).
- 5 Gruber, H.J., Mayer, C., Mangge, H., Fauler, G., Grandits, N., Wilders-Truschnig, M. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes (Lond)*. **32**(5):826-31. doi: 10.1038/sj.ijo.0803795 (2008).
- 6 Ogur, R., Coskun, O., Korkmaz, A., Oter, S., Yaren, H. & Hasde, M. High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of a-toicopoherol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**, (1), p. 161. doi: 10.1016/j.etap.2004.12.051 (2005).
- 7 Hezel, M.P., Liu, M., Schiffer, T.A., Larsen, F.J., Checa, A., Wheelock, C.E., Carlström, M., Lundberg, J.O., Weitzberg, E. Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. *Redox Biol.* **5**, p. 234-242. doi: 10.1016/j.redox.2015.05.004. (2015).
- 8 Bhaswant. M., Brown, L., McAinch, A.J., Mathai, M.L. Beetroot and Sodium Nitrate Ameliorate Cardiometabolic Changes in Diet-Induced Obese Hypertensive Rats. *Mol Nutr Food Res* **61**, (12). doi: 10.1002/mnfr.201700478 (2017).
- 9 Mande, S-l. A-S., Liu, M., Djaneye-Boundjou, G., Liu, F., Bawa, M. L. and Chen, H. Nitrate in drinking water: a major polluting component of groundwater in gulf region aquifers, south of Togo. *International Journal of the Physical Sciences* **7**, (1), p. 144-152. doi: 10.5897/IJPS11.874 (2012).
- 10 Pannala, A.S., Mani, A.R., Spencer, J.P., Skinner, V., Bruckdorfer, K.R., Moore, K.P., Rice-Evans, C.A. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radical Biology & Medicinem* **34**, p. 576-84 (2003).
- 11 Bellisola, G. & Sorio, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *American journal of cancer research* **2**, 1-21 (2012).
- 12 Ojeda, J. J. & Dittrich, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **881**, 187-211, doi:10.1007/978-1-61779-827-6_8 (2012).
- 13 Severcan, F., Bozkurt, O., Gurbanov, R. & Gorgulu, G. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *Journal of biophotonics* **3**, 621-631, doi:10.1002/jbio.201000016 (2010).

- 14 Caetano Júnior, P. C., Strixino, J. F. & Raniero, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research on Biomedical Engineering* **31**, 116-124 (2015).
- 15 Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V. & Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *The Analyst* **135**, 3183-3192, doi:10.1039/c0an00529k (2010).
- 16 Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* **23**, (2):270-99. doi: 10.1017/S0954422410000168 (2010).
- 17 Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A. & Calhau, C. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* **5**, (1): 11–21. doi: 10.1080/21623945.2015.1061723 (2016).
- 18 Speakman, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International Journal of Obesity (Lond)*. doi: 10.1038/s41366-019-0363-7 (2019).
- 19 Oliver, K.V., Vilasi, A., Maréchal, A., Moochhala, S.H., Unwin, R.J. & Rich, P.R. Infrared vibrational spectroscopy: a rapid and novel diagnostic and monitoring tool for cystinuria. *Sci Rep* **6**. doi: 10.1038/srep34737 (2016).
- 20 Kochan, K., Maslak, E., Chlopicki, S. & Baranska, M. FT-IR imaging for quantitative determination of liver fat content in non-alcoholic fatty liver. *Analyst* **140**, (15):4997-5002. doi: 10.1039/c5an00737b (2015).
- 21 Yu, M. C. *et al.* Label Free Detection of Sensitive Mid-Infrared Biomarkers of Glomerulonephritis in Urine Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Scientific reports* **7**, 4601, doi:10.1038/s41598-017-04774-7 (2017).
- 22 Simsek Ozek, N. *et al.* Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. *Journal of dental research* **95**, 1472-1478, doi:10.1177/0022034516663696 (2016).
- 23 Hajian-Tilaki, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med* **4**, (2), 627–635 (2013).
- 24 Nam, M., Choi, M.S., Jung, S., Jung, Y., Choi, J.Y., Ryu, D.H. & Hwang, G.S. Lipidomic Profiling of Liver Tissue from Obesity-Prone and Obesity-Resistant Mice Fed a High Fat Diet. *Sci Rep* **5**. doi: 10.1038/srep16984 (2015).
- 25 Schulz, H. & Baranska, M. Identification and qualification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **43**, (1), 13–25 doi: 10.1016/j.vibspec.2006.06.001 (2007).
- 26 Caetano Júnior, P. C., Strixino, J. F. & Raniero, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Res Biomed Eng* **31**, (2) doi: 10.1590/2446-4740.0664 (2015).
- 27 Dovbeshko, G.I., Gridina, N.Y., Kruglova, E.B., & Pashchuk, O.P. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta* **53**, (1) 233–246 (2000).
- 28 Shetty, G., Kendall, C., Shepherd, N., Stone, N., & Barr, H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *British Journal of Cancer* **94**, (10) 1460–1464. doi: 10.1038/sj.bjc.6603102 (2006).
- 29 Alfano, R.R., Tang, G.C., Pradhan, A., Lam, W., Choy, D.S.J., & Opher, E. (1987) Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues. *Journal of the Optical Society of America B* **6**, (5): 1015 (1987).

- 30 Fung, M. F. K., Senterman, M. K., Mikhael, N. Z., Lacelle, S., & Wong, P. T. T. Pressure-tuning fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium. *Biospectroscopy* **2**, 155–165 (1996).
- 31 Andrus, P.G.L. & Strickland, R.D. Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy* **4**, (1), 37–46. doi: 10.1002/(SICI)1520-6343 (1998).
- 32 Wu, J. G., Xu, Y. Z., Sun, C. W., Soloway, R.D., Xu, D. F., Wu, Q. G., Sun, K. H., Weng, S. F., & Xu, G. X. Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques. *Biopolymers (Biospectroscopy Section)* **62**, (4), 185–192. doi:10.1002/bip.1013 (2001).
- 33 Fabian, H., Jackson, M., Murphy, L., Watson, P. H., Fichtner, I., & Mantsch, H.H. A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenografts. *Biospectroscopy* **1**, (1), 37–45. doi: 10.1002/bspy.350010106 (1995).
- 34 Richter, T., Steiner, G., Abu-Id, M. H., Salzer, R., Gergmann, R., Rodig, H. & Johannsen, B. Identification of tumor tissue by FTIR spectroscopy in combination with positron emission tomography. *Vibrational Spectroscopy* **28**: 103–110 (2002).
- 35 Chiriboga, L., Xie, P., Yee, H., Vigorita, V., Zarou, D., Zakim, D. & Diem, M. Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. *Biospectroscopy* **4**, 47–53. doi: 10.1002/(SICI)1520-6343 (1998).
- 36 Dovbeshko, G. I., Chegel, V. I., Gridina, N. Y., Repnytska, O. P., Shirshov, Y. M., Tryndiak, V. P., Todor, I. M., & Solyanik, G. I. Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study. *Biopolymers* **67**, 470–486. doi:10.1002/bip.10165 (2002).
- 37 Yu, G., Flach, C. R., Mendelsohn, R., Stojadinovic, O. & Tomic-Canic, M. Infrared microscopic imaging of cutaneous wound healing: lipid conformation in the migrating epithelial tongue. *J. of Biomedical Optics* **17**,(9). doi: 10.1117/1.JBO.17.9.096009 (2012).

Table 1. Obesity and NaNO₃ effects on body weight, Δbody weight, water intake, adipose tissue and liver weights.

Parâmetros	CD + Placebo	HFD + Placebo	CD + NaNO₃	HFD + NaNO₃
Body Weight (g)	29.2±1.47	46.0±1.6*	29.6±1.9	42.87±5.3*
Δ Body Weight (g)	2.1±0.4	12.1±2.9*	2.1±0.6	10.2±2.4*
Water intake (ml/day)	6.8±0.9	3.1±0.4*	7.3±0.3	2.9±0.4*
caloric intake (kcal)	10.02±1.9	13.21±1.5*	11.2±0.4	13.61±0.1*
Visceral adipose tissue weight (mg)	1.0±0.1	4.±1.3*	1.2±0.2	4.7±1.4*
Blood Cholesterol (a.u.)	98.7 ± 8.7	149.8 ± 18*	86.2 ± 3.1	154 ± 53*
Liver Cholesterol (a.u.)	2.9±0.3	10.12±1.8*	7.81±1.8*	10.83±4.4*

Values are expressed as mean ± S.D. *p < 0. 05 vs **CD + Placebo** rats.

Table 2. ATR-FTIR vibrational mode assignments and identification of the respective component of total liver.

Peak frequency	Assignments	Reference
3067 cm⁻¹	carbon aromatic stretching (proteins, hormones)	(25, 26)
3008 cm⁻¹	vas =C-H (lipids, fatty acids)	(27, 28)
2962 cm⁻¹	CH ₃ modes of plasma membrane and mono/diglycerides	(29)
2923 cm⁻¹	Stretching C-H (cholesterol, mono/diglycerides of fatty acids)	(27, 26)

2854 cm⁻¹	CH ₂ of lipids	(30)
1741 cm⁻¹	C=O stretching (lipids)	(31,32, 33)
1642 cm⁻¹	Amide I of β -pleated sheet of protein	(27)
1459 cm⁻¹	assymmetric CH ₃ of collagen	(30)
1397 cm⁻¹	C=O stretching (sym) of COO ⁻	(26)
1310 cm⁻¹	Amide III band components of proteins	(34)
1229 cm⁻¹	Stretching PO ₂ asymmetric of phosphodiester	(35, 36)
1161 cm⁻¹	C-O single bond stretch of the ester group	(37)
1057 cm⁻¹	Stretching C-O deoxyribose	(27)
923 cm⁻¹	Left-handed helix DNA (Z form).	(36)

Legends

Figure 1. Experimental design.

Figure 2. Liver ATR-FTIR spectra (3700-400 cm⁻¹) of Chow Diet (CD + Placebo), High-Fat Diet (HFD + Placebo), Chow Diet treated with sodium nitrate (CD + NaNO₃), High-Fat Diet group treated with sodium nitrate (HFD + NaNO₃) mice.

Figure 3. Liver Band area of the ATR-FTIR (3700-400 cm⁻¹) of Chow Diet (CD + Placebo), High-Fat Diet (HFD + Placebo), Chow Diet treated with sodium nitrate (CD + NaNO₃), High-Fat Diet group treated with sodium nitrate (HFD + NaNO₃) mice. 3067 cm⁻¹ (A), 3008 cm⁻¹ (B), 2962 cm⁻¹ (C), 2923 cm⁻¹ (D), 2854 cm⁻¹ (E), 1741 cm⁻¹ (F), 1642 cm⁻¹ (G), 1459 cm⁻¹ (H), 1397 cm⁻¹ (I), 1310 cm⁻¹ (J), 1229 cm⁻¹ (K), 1161 cm⁻¹ (L), 1057 cm⁻¹ (M), 923 cm⁻¹ (N). Values are expressed as mean \pm S.E.M. e p < 0,05.

Figure 4. ROC analysis of liver vibrational modes of Chow Diet group vs. High-Fat Diet group. 3067 cm⁻¹ (A), 3008 cm⁻¹ (B), 2962 cm⁻¹ (C), 2923 cm⁻¹ (D), 2854 cm⁻¹ (E), 1741 cm⁻¹ (F), 1642 cm⁻¹ (G), 1459 cm⁻¹ (H), 1397 cm⁻¹ (I), 1310 cm⁻¹ (J), 1229 cm⁻¹ (K), 1161 cm⁻¹ (L), 1057 cm⁻¹ (M), 923 cm⁻¹ (N).

Figure 1

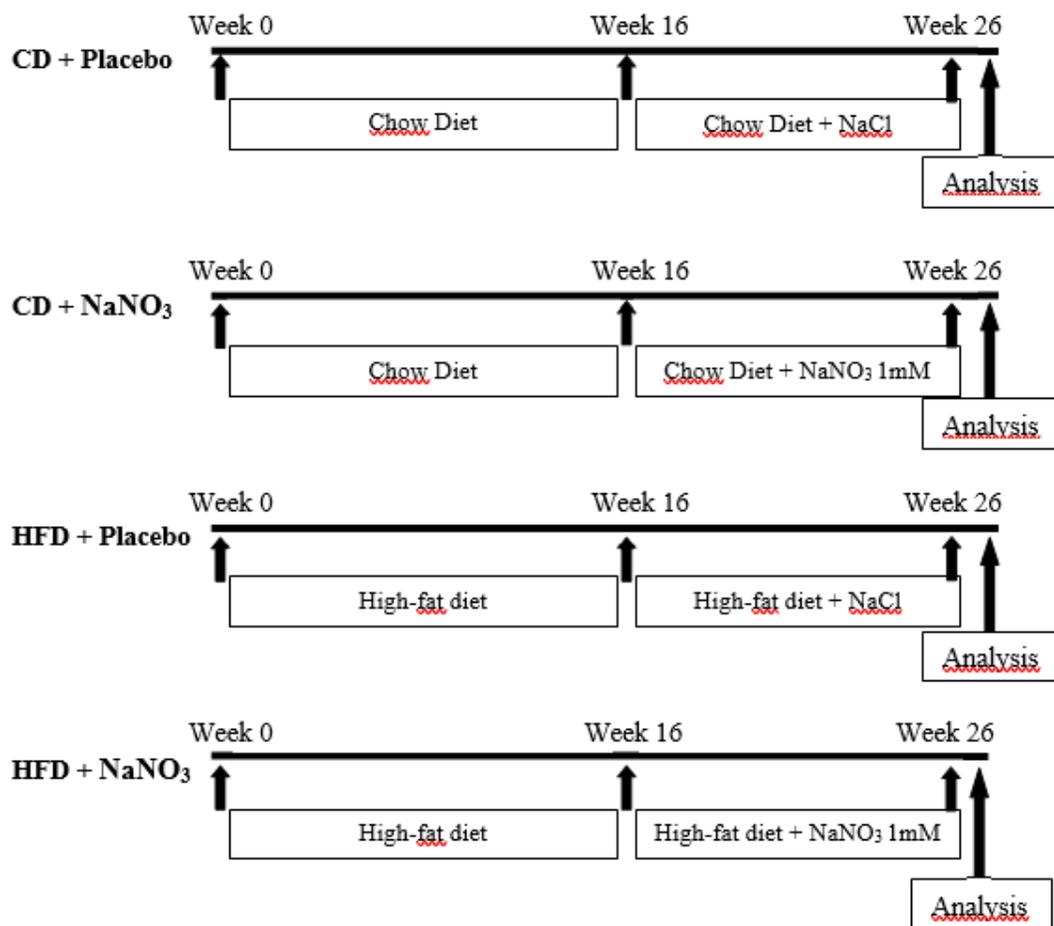


Figure 2

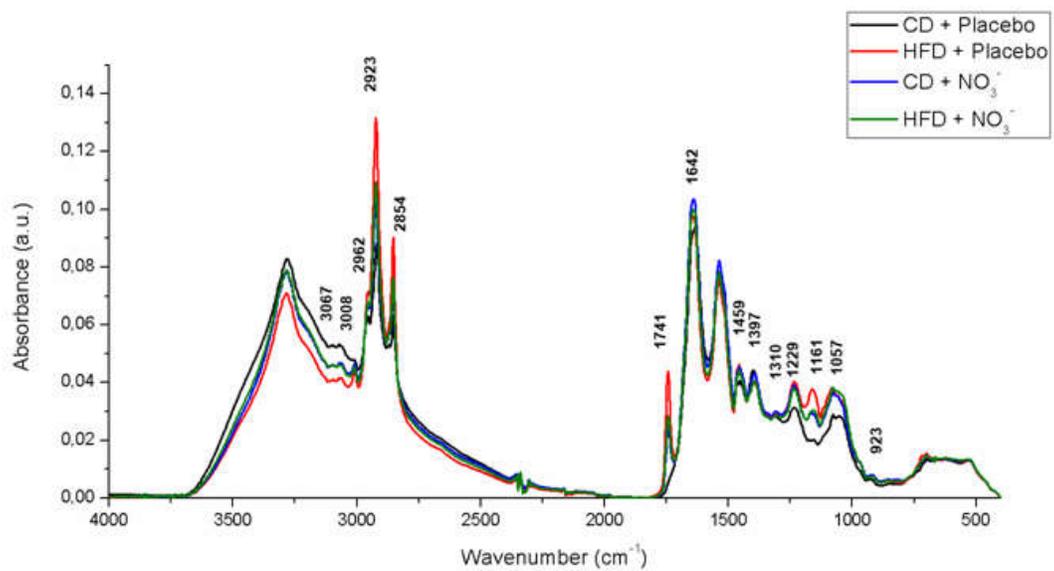


Figure 3

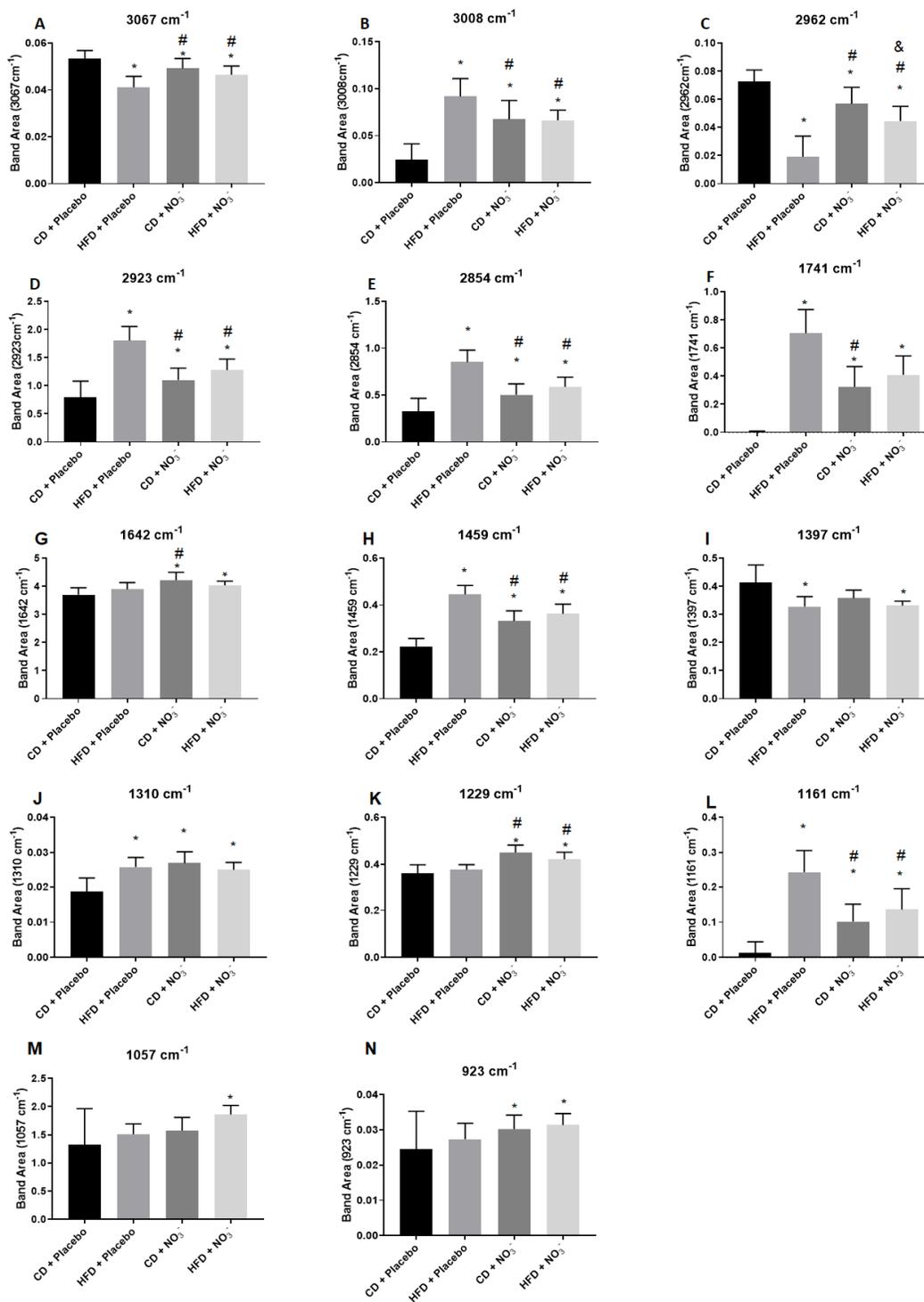
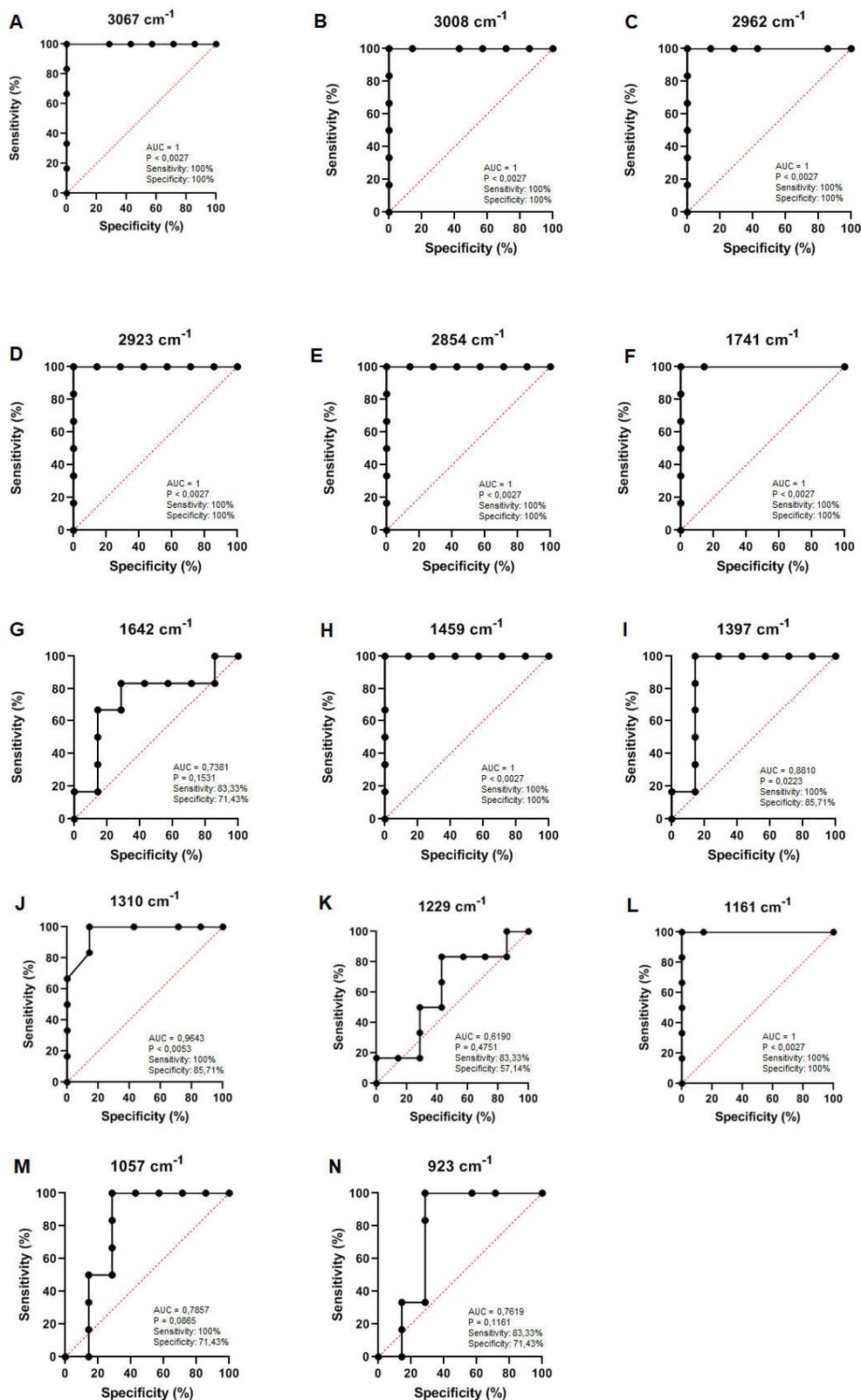


Figure 4



5 ARTIGO 2 - Patente

MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS UTILIZANDO ATR-FTIR.

[01]. Campo da Invenção

[02]. A presente invenção refere-se à elaboração de um método para detecção de alterações moleculares baseado em modos vibracionais detectados por espectroscopia ATR-FTIR do fígado de camundongos obesos, podendo ser promissora no diagnóstico precoce de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Mais especificamente, a invenção compreende um método para detecção baseado em análises de modos vibracionais sem a necessidade de cortes histológicos e também não necessita de reagentes para análise. A análise do espectro do FTIR foi realizada utilizando-se uma amostra bastante reduzida de fígado diretamente sobre o cristal de análise do sistema de FTIR. Sendo assim, o método para detecção, baseado nos resultados da análise do espectro de FTIR, pode ser potencialmente utilizado como ferramenta complementar ao diagnóstico clínico e podendo também ser utilizado para avaliar a efetividade do tratamento, sendo esta técnica realizada de forma mais rápida e mais simples, o que facilita o treinamento da equipe executora.

[03]. Estado da Técnica

[04]. O aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo tem sido caracterizado como uma pandemia (BLUHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, 288–298, doi: 10.1038/s41574-019-0176-8, 2019). E parece estar associado por mudanças no sistema alimentar global (SWINBURN, B. A. [et al.] The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, v. 378, p. 804–814, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)). Em 2016, 1,9 bilhão de pessoas tinha sobrepeso e 650 milhões de adultos apresentavam obesidade. A estimativa é de que 13% da população adulta em todo o mundo apresente obesidade. A prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016 (Organização Mundial de Saúde. Obesity and overweight: Fact sheet. 2018 disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>). No

mesmo ano, 53,8% da população brasileira apresentava excesso de peso (Ministério da Saúde, SVS. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, VIGITEL 2016. Brasília: DF; 2016 citado em Organização Pan-Americana da Saúde. Relatório da Reunião Técnica Internacional de Avaliação Econômica em Saúde com Foco na Obesidade (Brasília, 11 e 12 de junho 2018). Brasília: OPAS; 2018 disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50834>>). A prevalência da obesidade na população brasileira é de 18,9% (26,9 milhões de pessoas) superando a de diabetes com 8,9% (12,7 milhões de pessoas). Por ano, são 1 milhão de novos casos de obesidade diagnosticados (Organización Mundial de la Salud. (2017). Monitoreo de avances en materia de las enfermedades no transmisibles 2017. Organización Mundial de la Salud.

<<http://www.who.int/iris/handle/10665/259806>>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO). No Brasil, os custos diretos de assistência à saúde atribuíveis à obesidade em adultos totalizaram US\$ 269,6 milhões; já com a obesidade mórbida, os gastos representavam aproximadamente 24%, desse total (US\$ 64,2 milhões) (de OLIVEIRA, M. L.; SANTOS, L. M. P.; SILVA, E.N. Direct Healthcare Cost of Obesity in Brazil: An Application of the Cost-of-Illness Method from the Perspective of the Public Health System in 2011. PLoS One, v.10, n. 4, Abr 2015). O excesso de peso e a obesidade estão ligados a mais mortes em todo o mundo do que abaixo do peso. Globalmente, há mais pessoas obesas do que abaixo do peso - isso ocorre em todas as regiões do mundo, com exceção de partes da África subsaariana e da Ásia (Organização Mundial de Saúde. Obesity and overweight: Fact sheet. 2018 disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>).

[05]. Durante o desenvolvimento da obesidade, as alterações no tecido adiposo podem levar a perturbações da sua função normal. Além da capacidade de armazenamento excessivo de lipídios, o tecido adiposo sintetiza e secreta muitos hormônios e citocinas que estão envolvidos na fisiopatologia da obesidade associada a doenças secundárias, as quais podemos destacar a DHGNA (DYSON, J.K.; ANSTEE, M.Q.; MCPHERSON, S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. Frontline Gastroenterology, v. 5, n. 3., p. 211-218, 2014). Os estados patológicos específicos de órgãos associados à obesidade podem ser decorrentes da desregulação dos níveis circulantes de adipocinas e

metabólitos e do armazenamento de gordura ectópica dentro de órgãos que normalmente não acumulam gordura, por exemplo, fígado e músculo (DOGAN, A. [et al.] ATR-FTIR spectroscopy reveals genomic loci regulating the tissue response in high fat diet fed BXD recombinant inbred mouse strains. *BMC Genomics*, v. 14, n. 1, p. 386, 2013).

[06]. O fígado é o segundo maior órgão e a maior glândula do corpo humano, pesa aproximadamente 1.500g em sua fisiologia normal. Os hepatócitos são as células funcionais do fígado e constituem cerca de 67% da sua massa total. Essas células epiteliais encontram-se agrupadas em placas interligadas, formando unidades funcionais, às quais dá-se o nome de lóbulos hepáticos (GEERTS, A. et al. *In vitro* differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *Journal of Pathology*, v. 9, n. 1, p. 59-68, 1989.; JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 538 p; TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. *Current Biology Magazine*, v. 27, n. 21, p. R1141-R1155, 2017). Ele se localiza na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, ao lado direito do corpo humano, estrategicamente entre o trato digestivo e a circulação geral (FOX, S. I. *Fisiologia Humana / Stuart Ira Fox*. 7. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2007, 726 p.) e desempenha uma série de funções vitais como: metabolização de carboidratos para a síntese de colesterol e ácidos graxos, armazenamento de glicose como glicogênio e ácidos graxos livres como triglicerídeos (TG). Sintetiza ácidos graxos e colesterol a partir da acetil-CoA derivada da glicose através da absorção de gordura (TG) e colesterol da dieta; cataboliza o colesterol para os ácidos biliares, facilitando a secreção biliar do colesterol e a absorção intestinal de gorduras e colesterol dietéticos; obtém ácidos graxos livres dos tecidos adiposos quando o glucagon aumenta para ativar a lipase ativada por hormônio para mobilizar TG; reúne TG para lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) para excreção na circulação sanguínea. VLDL transporta TG para tecidos adiposos para armazenamento e para músculos e outros tecidos para o metabolismo energético. Sintetiza glicose a partir de aminoácidos (gliconeogênese) e libera glicose a partir do glicogênio (glicogenólise), controlando os níveis de glicose no sangue no período de jejum. Por fim, consiste no principal órgão capaz de converter o excesso de ácidos graxos em corpos cetônicos, que fornecem energia ao cérebro e ao músculo durante períodos de jejum (MITRA, V.; METCALF, J. *Metabolic functions of the liver*. *Anaesthesia and*

Intensive Care Medicine, v. 10, n. 7, p. 334-335, 2009; SENDENSKY, A.; DUFOUR, J. F. Liver physiology. In: GINÈS, P.; KAMATH, P. S.; ARROYO, V. (eds.). Chronic liver failure: Mechanisms and Management. Humana Press, 2011).

[07]. Quando o fígado apresenta lesões agudas pode ocorrer um processo de regeneração neste órgão. Os hepatócitos maduros podem retornar ao ciclo celular e passar por várias divisões celulares para formar novamente a massa hepática. Porém, quando o fígado passa por um processo de agressão contínua, subsidiando um dano hepático crônico, os hepatócitos perdem a capacidade regenerativa e a consequência mais grave é a insuficiência hepatocelular (FORBES, S. J. Stem cell therapy for chronic liver disease- choosing the right tools for the job. Gut, v. 57, n. 2, p. 153– 155, 2008). Em tal ocasião, exemplifica-se a degeneração celular hepática por acúmulo de lipídios, ou esteatose, mais encontrada no fígado, porque ele é um órgão envolvido no metabolismo da gordura. Pode ocorrer secreção prejudicada de lipoproteínas, aumento da síntese de lipídios, ou até mesmo catabolismo periférico aumentado de gorduras, processos que sentenciam o fígado ao acúmulo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos (GRADUAÇÃO, Patologia Geral - DB-301, Unidade I, FOP/UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <https://w2.fop.unicamp.br/ddo/patologia/db301_patologia_geral.htm#unidade3>. Acesso em: 29 mar. 2019).

[08]. A DHGNA é definida como o acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos, principalmente os triglicerídios, sendo caracterizada histologicamente, excedendo 5% do peso do fígado na ausência de consumo excessivo de etanol (convencionalmente definido como uma ingestão de etanol de 30g/dia em homens e 20 g/dia em mulheres) e sem outras causas de doenças hepáticas, como drogas ou doenças genéticas (BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol, v. 16, n. 42, p. 5286-96, Nov 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072891>>. NASCIMBENI, F. [et al.] From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. J Hepatol., v. 59, n. 4, p. 859-871, 2013.; FERNANDES, M. R. A. [et al.] Animal Models of Obesity Characterized by Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Chapter 5. In: BARTHOLOMEW, I. Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy, Intech Open, 2017). A DHGNA é a causa mais comum de disfunção hepática no mundo ocidental devido à sua íntima associação com obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (MASARONE, M. [et al.] Non

alcoholicfatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials.*, v. 9, n. 3, p. 126-133, 2014), sendo reconhecida como importante causa do aumento da morbimortalidade relacionada ao fígado (THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, v. 239, n. 1, p. 192-202, Mar 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617860>>). Em indivíduos obesos, o metabolismo lipídico é prejudicado, o que leva ao acúmulo excessivo de gordura no corpo. Um dos principais locais de depósito potencial de gordura é o fígado, que é uma das principais causas do desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

[09]. A DHGNA ocorre em indivíduos de todas as idades, entretanto é mais comum nos adultos e tende a aumentar com a idade (CORTE, C. D. [et al.] *Epidemiology and Natural History of NAFLD*. *J Med Biochem*, v. 34, n. 1, p. 13-17, Jan 2015. ISSN 1452-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356818>>. Atualmente, a prevalência de DHGNA é estimada em 20% a 30% nos países ocidentais e 5% a 18% em países asiáticos (BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*, v. 9, n. 16, p. 715-732, Jun 2017. ISSN 1948-5182. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652891>>). No Brasil foi encontrado uma prevalência em torno de 20% de DHGNA na população geral (COTRIM, H. P. [et al.] Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. *Clinical and histological profile*. *Ann Hepatol*, v. 10, n. 1, p. 33-7, Jan-Mar 2011. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21301007>>).

[010]. Na fase inicial da DHGNA, o diagnóstico é dificultado devido à falta de sintomas claros e específicos, bem como de métodos diagnósticos apropriados. A falta de um bom método diagnóstico cria uma necessidade neste campo, o que não é fácil de realizar, já que uma abordagem para diagnosticar a DHGNA com amostras de fígado necessita de uma laparotomia para acessar este órgão. No entanto, atualmente, cirurgias robóticas com reduzidos efeitos colaterais podem permitir no futuro que o sistema de ATR-FTIR seja inserido nestas probes para análise do conteúdo in vivo e sem necessidade de lesões (KOCHAN, K. [et al.] FT-IR imaging for quantitative determination of liver fat content in Non-Alcoholic Fatty Liver The Royal Society of Chemistry/ *Analyst J. Name.*, v. 00, p. 1-3, 2012).

[011]. A DHGNA normalmente é diagnosticada por meio de exames bioquímicos hepáticos alterados ou de achados inesperados ecográficos, e deve ser avaliada em

indivíduos com níveis de transaminases elevados. Nos testes de função hepática, um aumento moderado das enzimas hepáticas (aspartatoaminotransferase e alanina aminotransferase) é possível ser detectado em pacientes com DHNA. Além disso, um aumento superior da ALT em comparação a AST (AST/ALT <1) pode indicar a presença de doença hepática. Os níveis de fosfatase alcalina e/ou gamaglutamiltransferase (GGT) podem estar elevados em estádios iniciais e moderados mas normalmente esta alteração se caracteriza na fase tardias da doença (YOUNOSSI, Z. M. [et al.] Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73-84, jul 2016. ISSN 1527-3350. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707365>>; SPENGLER, E. K.; LOOMBA, R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clin Proc*, v. 90, n. 9, p. 1233-46, Sep 2015. ISSN 1942-5546. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219858>>). Em fase inicial, a ecografia transabdominal é o exame imagiológico mais empregado na prática clínica por causa da disponibilidade, preço acessível e sem radiação. Contudo, não possibilita identificar esteatose hepática quando esta é abaixo de 30%, bem como, não diferencia a esteatose isolada, EHNA e fibrose hepática. A tomografia axial computadorizada (TAC) não possibilita a diferenciação dos estádios da DHGNA e é menos sensível que a ecografia transabdominal. A ressonância magnética nuclear (RMN) apresenta boa capacidade de identificação de esteatose hepática, no entanto, necessita de emissão de radiação no paciente (CABRAL, M. B. C. B. Novas perspectivas em esteato-hepatite não alcoólica. 37 f. 2016. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2016; OLIVEIRA, C. P. Alterações hepáticas em grandes obesos: avaliações clínico-laboratoriais e histopatológicas antes do tratamento cirúrgico da obesidade. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 158p.).

[012]. Devido as aminotransferases séricas e os exames imagiológicos não investigarem de modo seguro a existência de esteato-hepatite e de fibrose, a biopsia hepática é o *gold-standard* para a determinação da histologia hepática em pacientes com DHGNA. Todavia, tem um alto custo, é invasiva e tem riscos relacionados. Sendo assim, sua indicação ainda não é indicada para grande parte dos pacientes (CABRAL, M. B. C. B. Novas perspectivas em esteato-hepatite não alcoólica. 37 f.

2016. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2016; OLIVEIRA, C. P. Alterações hepáticas em grandes obesos: avaliações clínico-laboratoriais e histopatológicas antes do tratamento cirúrgico da obesidade. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 158p.). Além disso a avaliação da esteatose hepática em cortes histológicos é um método imperfeito e não reprodutível, ou seja, a estimativa histológica da esteatose está pouco correlacionada com o verdadeiro conteúdo lipídico do tecido hepático após a extração de lipídios da mesma peça cirúrgica, seguida de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (LE NAOUR, F. [et al.] Quantitative Assessment of Liver Steatosis on Tissue Section Using Infrared Spectroscopy. *Gastroenterology*, v. 148, p. 295–297, 2015.< <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.038>>).

[013]. A crescente incidência mundial de DHGNA e a ausência de métodos confiáveis e suficientes para detecção precoce exigem a busca de técnicas mais efetivas. O diagnóstico precoce de alterações moleculares hepáticas associadas à obesidade induzida por dieta rica em gordura pode melhorar o prognóstico e retardar as alterações hepáticas associadas à obesidade. O método de diagnóstico não invasivo e a necessidade de envolver técnicas laboriosas, demoradas e dispendiosas criam uma necessidade de plataforma mais rápida, econômica e que não necessita de uma equipe tão especializada para realização de cortes histológicos para detectar alterações específicas do conteúdo molecular do fígado.

[014]. Uma potencial técnica candidata é a reflexão total atenuada - infravermelho de transformação de Fourier (ATR-FTIR), que consiste em uma espectroscopia vibratória que pode efetivamente fornecer informações sobre a estrutura e composição química de materiais biológicos a nível molecular. A maioria dos trabalhos para detecção de DHGNA utiliza cortes histológicos da biópsia do fígado. No entanto, são necessários mais métodos que correlacionem o verdadeiro conteúdo lipídico do tecido hepático.

[015]. Considerando que biomarcadores espectrais específicos podem ser identificados no fígado de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD), e os modos vibracionais espectrais ATR-FTIR diferencialmente expressos podem ser usados como biomarcadores hepáticos para detecção de mudanças na composição molecular do fígado, fica evidente que as alterações dos componentes

moleculares são promissores no diagnóstico precoce da DHGNA ou no monitoramento da doença. Neste sentido, pelo fato de ainda não existir um método efetivo para verificar as alterações moleculares do fígado de camundongos obesos, a presente invenção trata da aplicação de um método de baixo custo e maior rapidez do que as análises padrão ouro vigentes.

[016]. Em pesquisa utilizando a espectroscopia de infravermelho em amostras de fígado humano congeladas com vários níveis de esteatose (0-90%) baseado no exame histológico, importantes variações na intensidade das bandas atribuídas a lipídios ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$). Por outro lado a intensidade das bandas atribuídas às proteínas (Amide I e Amide II: $1485-1710\text{ cm}^{-1}$) não foi significativamente afetada pela esteatose (LE NAOUR, F. [et al.] Quantitative Assessment of Liver Steatosis on Tissue Section Using Infrared Spectroscopy. *Gastroenterology*, v. 148, p. 295–297, 2015.< <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.038>>).

[017]. A patente WO2013045670A1 demonstrou que é possível mensurar componentes biológicos por radiação infravermelha. Destaca-se a importância de um método que caracterize a esteatose hepática não alcoólica devido a alta prevalência na população. Para este estudo o fígado foi cortado em cortes seriados entre 4 e 6 μm em criostato CM3050-S (Leica Microsystems, France) e inserido em lâminas de vidro.

[018]. A invenção pela patente JP2009535642A demonstra um painel de genes que pode ser usado no diagnóstico da esteatose hepática não alcoólica. Destaca-se a expressão de CCL19 / GAPDH and CXCL6 / GAPDH, que pode ser associada com parâmetros de severidade da obesidade.

[019]. Outra invenção descrita na patente WO2011036267A3 descreve um método para detecção de fibrose hepática em pacientes com doença hepática usando espectroscopia infravermelha.

[020]. Frente a estes fatos, a presente invenção utiliza uma abordagem de análise de dados espectrais baseada em mensurações de fígado utilizando espectroscopia ATR-FTIR. A identificação de alterações de componentes químicos específicos no fígado de camundongos obesos é promissora no diagnóstico precoce da DHGNA, bem como de outras doenças relacionados devido a sua alta capacidade de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade. A utilização de um método de detecção baseado nos dados espectrais das amostras de fígado de camundongos obesos pode ser um caminho promissor na detecção precoce da

DHGNA, podendo ser utilizado em amostras in vivo e também sem a necessidade de cortes histológicos.

[021]. A presente invenção terá compreensão mais específica por meio da descrição dos resultados obtidos. Os procedimentos experimentais envolvidos estão detalhados no final desse relatório descritivo.

[022]. Exemplo 1

[023]. Esse exemplo refere-se as características dos animais experimentais do estudo: dieta controle (CD + Placebo), dieta hiperlipídica (HFD + placebo), CD + Nitrato de sódio (CD + NaNO₃), HFD + Nitrato de sódio (HFD + NaNO₃) em camundongos C57BL/6.

[024]. Na Tabela 1 as características corporais e metabólicas dos animais.

Tabela 1. Parâmetros corporais e metabólicos dos animais.

Parâmetros	CD + Placebo	HFD + Placebo	CD + NaNO ₃	HFD + NaNO ₃
Peso corporal (g)	29,2±1,47	46,0±1,6*	29,6±1,9	42,87±5,3*
Δ peso corporal (g)	2,1±0,4	12,1±2,9*	2,1±0,6	10,2±2,4*
Peso de tecido adiposo (mg)	1,0±0,1	4,9±1,3*	1,2±0,2	4,7±1,4*

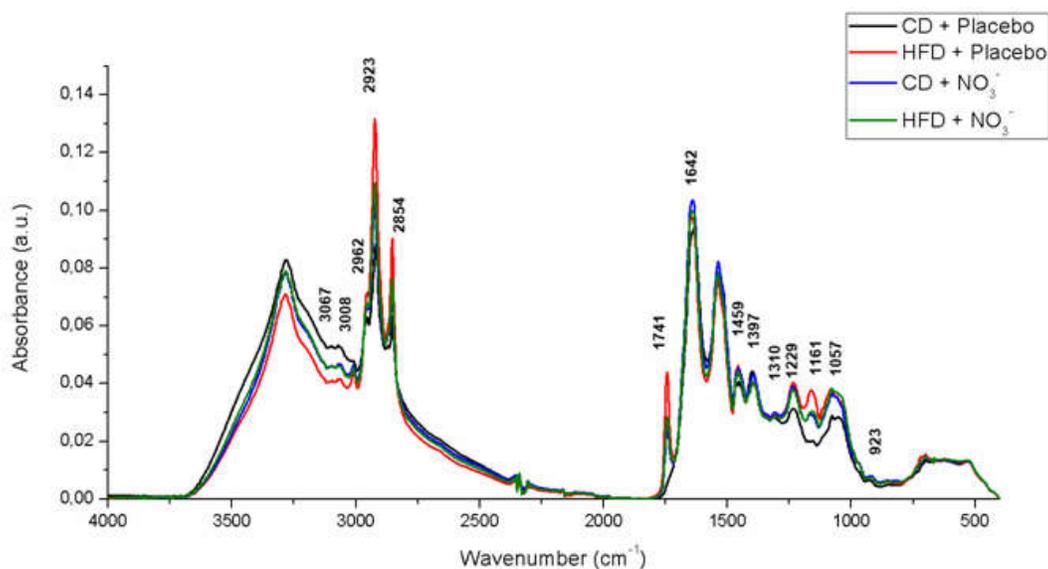
Valores descritos como média ± D.P.M *p < 0. 05 vs CD + Placebo.

[025]. Exemplo 2

[026]. O exemplo refere-se a análise dos espectros de ATR-FTIR provenientes de fígados de animais controles e obesos que receberam placebo ou nitrato de sódio.

[027]. Na Figura 1 são apresentadas as médias dos espectros de ATR-FTIR de fígado nos 4 grupos estudados.

Figura 1. Espectros de ATR-FTIR de fígado nos 4 grupos estudados.



[028] A Tabela 2 indica o componente que interage com os raios infravermelhos de acordo com o componente molecular do fígado.

Tabela 2. Modo vibracional de ATR-FTIR e seu respectivo componente molecular no fígado.

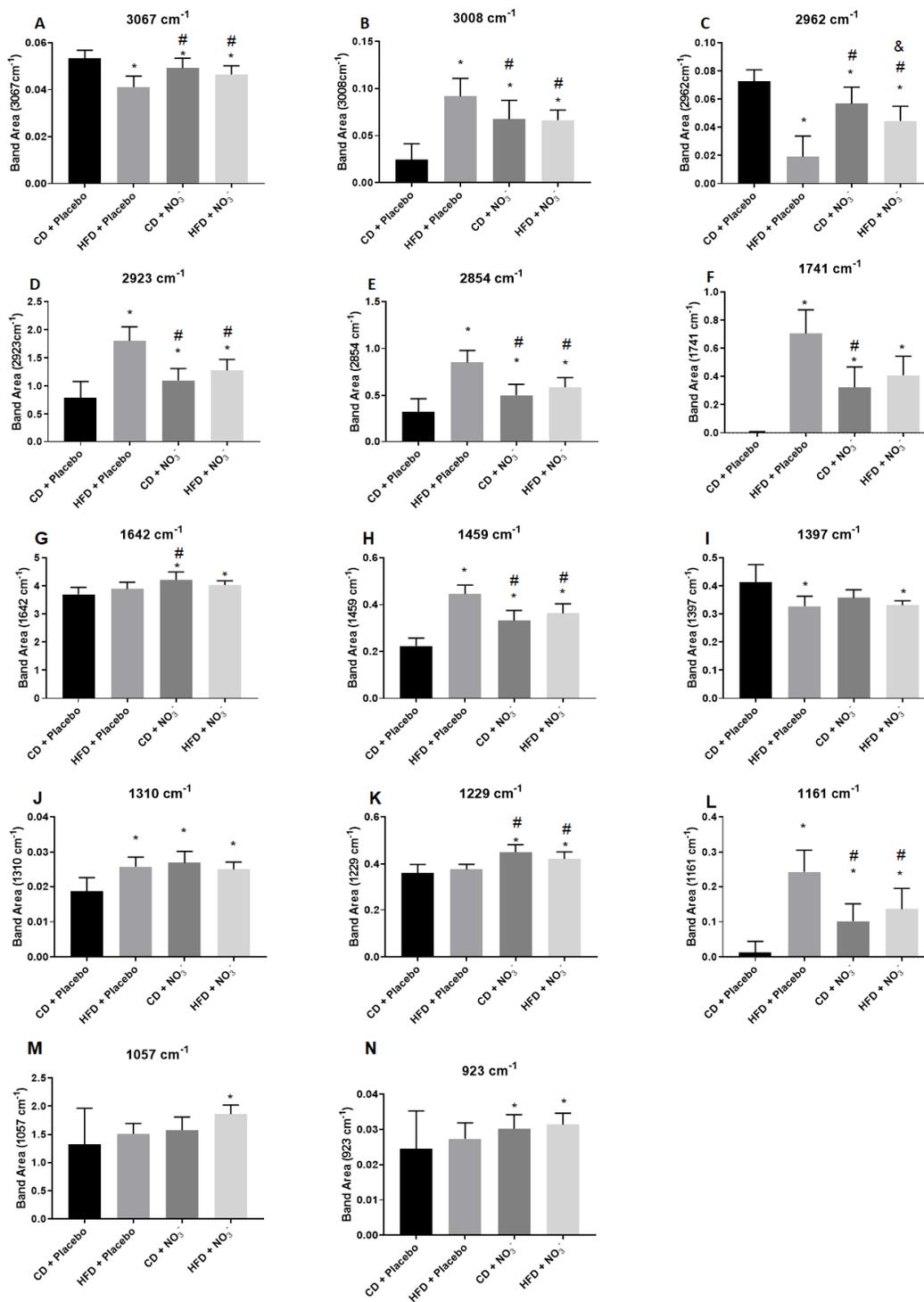
Frequência do m.v.	Componente molecular
3067 cm^{-1}	carbono aromático
3008 cm^{-1}	vas =C-H
2962 cm^{-1}	CH ₃ de membrana plasmática
2923 cm^{-1}	C-H
2854 cm^{-1}	CH ₂
1741 cm^{-1}	C=O
1642 cm^{-1}	Amida I
1459 cm^{-1}	CH ₃
1397 cm^{-1}	Vas C=O de COO ⁻
1310 cm^{-1}	Amida III
1229 cm^{-1}	PO ₂ assimétrico de fosfodiésteres
1161 cm^{-1}	C-O de grupo éster

1057 cm⁻¹	C-O de desoxyribose
923 cm⁻¹	DNA (Z form).

[029]. Exemplo 3

[030]. Considerando o potencial diagnóstico, a análise de alterações de modos vibracionais entre os animais tratados com dieta HFD ou CD serão analisados por meio de curva ROC no próximo exemplo. Os modos vibracionais 3067, 3008, 2962, 2923, 2854, 1741, 1642, 1459, 1310, 1229, 1161 e 923 cm⁻¹ foram alterados em animais CD + NaNO₃ em comparação com CD + Placebo (Figura 2).

Figura 2.



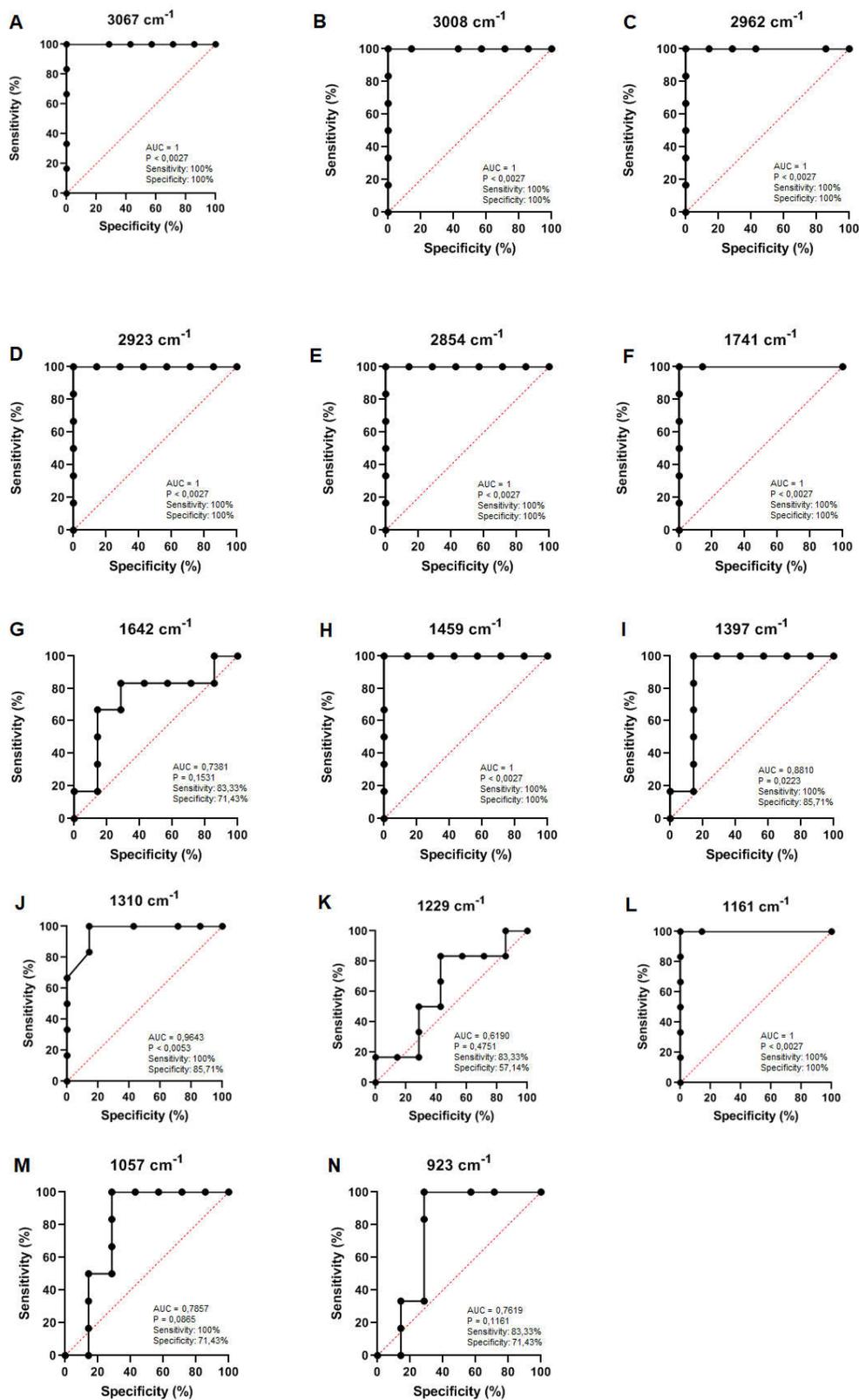
[031]. Exemplo 4

[032]. A curva ROC que demonstra capacidade diagnóstica é demonstrada a seguir.

Os modos vibracionais 3067, 3008, 2962, 2923, 2854, 1741, 1459, 1397, 1310 e

1161 cm^{-1} apresentaram potencial diagnóstico ($P < 0,05$) para alterações no fígado entre animais obesos e animais controles.

Figura 3.



[033]. Metodologia empregada

[034]. A seguir é descrita a metodologia para o desenvolvimento do método de detecção a partir da análise ATR-FTIR de amostras de fígado de animais controles e obesos que receberam placebo ou nitrato de sódio.

[035]. Aspectos éticos e participantes do estudo

[036]. A presente invenção foi no Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia e aprovado pela CEUA (número do protocolo: 128/2015). A descrição das características dos animais foi descrita previamente no exemplo 1.

[037]. Coleta da amostra e preparação

[038]. Amostras de fígado foram coletadas de cada animal e congeladas em -70°C para posterior remoção de água em sistema de Liofilização durante 12 horas.

[039]. Espectroscopia ATR-FTIR

[040]. Os espectros foram medidos na região entre 4.000 e 400 cm^{-1} usando o espectrômetro FTIR VERTEX 70/70v. O sistema estava acoplado com diamante de platina ATR (disco de diamante com função de elemento de reflexão interna) que permite análise sem inclusão em pastilhas de KBr. Em seguida os fígados liofilizados ($10\text{ }\mu\text{g}$) foram inseridos diretamente no cristal para análise. Para todos os espectros ocorreu uma repetição destes passos para uma análise em duplicata. Para remoção de background foi analisado o espectro do ar, para posterior correção do espectro. Em seguida, foi realizada a correção da linha de base de todas amostras. Para homogeneização de análises, todos os espectros foram obtidos em temperatura entre $21-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e a cada amostra teve 32 varreduras.

[041]. Pré-processamento de dados espectrais

[042]. O software OPUS foi usado para calcular a área sob a região espectral que corresponde a componentes específicos das amostras.

[043]. Análise Estatística

[044]. Após o pré-processamento espectral, os valores foram analisados por ANOVA e Curva ROC, de acordo com os testes paramétricos ou testes não paramétricos de acordo com a distribuição da variável apropriados. Assumiu-se um intervalo de confiança de 0,95 e um $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada nas versões 5.00 e 7.03 do GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

REIVINDICAÇÕES

1 – MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES EM COMPONENTES MOLECULARES DE FÍGADO DE ANIMAIS OBESOS POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR baseado em um sistema direto de análise dos modos vibracionais 3067, 3008, 2962, 2923, 2854, 1741, 1459, 1397, 1310 e 1161 cm^{-1} sem necessidade de cortes histológicos e processamento de dados multivariados, o que simplifica e reduz custos da análise.

2- MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES EM COMPONENTES MOLECULARES DE FÍGADO DE ANIMAIS TRATADOS COM NITRATO DE SÓDIO OBESOS POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR baseado em um sistema direto de análise dos modos vibracionais 3067, 3008, 2962, 2923, 2854, 1741, 1642, 1459, 1310, 1229, 1161 e 923 cm^{-1} sem necessidade de cortes histológicos e processamento de dados multivariados, o que simplifica e reduz custos da análise.

REFERÊNCIAS

ABENAVOLI, L. [et al.] Effects of Mediterranean diet supplemented with silybin-vitamin E-phospholipid complex in overweight patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, v. 9, n. 4, p. 519-527, 2015.

<https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1004312>

ABENAVOLI, L. [et al.] Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: mediterranean diet. *World J Gastroenterol.*, v. 20, n. 45, p. 16831-16840, 2014.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i45.16831>

ALVES, O. L. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier: feliz combinação de velhos conhecimentos de óptica, matemática e informática. Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES). Instituto de Química. UNICAMP. Disponível em:

<http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_meprotec_espec_fourier.pdf>.

Acesso em: 22 jan. 2019.

ANDREW, P., Enzymatic function of nitric oxide synthases, *Cardiovasc. Res.*, v. 43, n. 3, p. 521–531, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00115-7)

ANTOSOVA, M., Nitric oxide—important messenger in human body. *Open J. Mol. Integr. Physiol.*, v. 02, p. 98–106, 2012.

<https://doi.org/10.4236/ojmip.2012.23014>

ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*, v. 13, p. 321-350, Jan 2018. ISSN 1553-4014.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>

ARAÚJO, A. R. [et al.] Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int*, v. 38 Suppl 1, p. 47-51, Feb 2018. ISSN 1478-3231.

<https://doi.org/10.1111/liv.13643>

BELLISOLA, G.; SORIO, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *American journal of cancer research*, v. 2, p. 1-21, 2012.

BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*, v. 9, n. 16, p. 715-732, Jun 2017. ISSN 1948-5182. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>

BENETTI, C. Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de fragmento da região mandibular com laser de Er, Cr: YSGG ou broca multilaminada. 2014. 88f. Tese (Doutorado), Instituto De Pesquisas Energéticas E Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2014.

BHASWANT, M. [et al.] Beetroot and Sodium Nitrate Ameliorate Cardiometabolic Changes in Diet-Induced Obese Hypertensive Rats. *Mol Nutr Food Res*, v. 61, n. 12, 2017. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700478>

BLUHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, 288–298, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>

BOGDAN, C., Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, v. 2, p. 907–916, 2001. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>

BORRELL, L. N.; SAMUEL, L. Body mass index categories and mortality risk in US adults: the effect of overweight and obesity on advancing death. *Am J Public Health*, v. 104, n. 3, p. 512-519, 2014. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2013.301597>

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, v. 65, n. 8, p. 1038-48, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>

CABRAL, M. B. C. B. Novas perspectivas em esteato-hepatite não alcoólica. 37 f. 2016. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2016.

CAETANO JÚNIOR, P. C.; STRIXINO, J. F.; RANIERO, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research on Biomedical Engineering*, v. 31, p. 116-124, 2015. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>

CALABRESE, V. [et al.] Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 8, p. 766–775, 2007.

<https://doi.org/10.1038/nrn2214>

CARLSTROM, M. [et al.] Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 107, p. 17716–17720, 2010.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1008872107>

CAZZO, E.; PAREJA, J. C.; CHAIM, E. A. Nonalcoholic fatty liver disease and bariatric surgery: a comprehensive review. *Sao Paulo Med. J.*, v. 135, n. 3, p. 277-295, 2017.

<https://doi.org/10.1590/1516-3180.2016.0306311216>

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. *Análise Instrumental*. Editora Interciência Ltda, Rio de Janeiro – RJ, 2000.

CORTE, C. D. [et al.] Epidemiology and Natural History of NAFLD. *J Med Biochem*, v. 34, n. 1, p. 13-17, Jan 2015. ISSN 1452-8258.

<https://doi.org/10.2478/jomb-2014-0049>

COTRIM, H. P. [et al.] Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*, v. 10, n. 1, p. 33-7, Jan-Mar 2011. ISSN 1665-2681.

[https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31584-4](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31584-4)

CRUPI, V. [et al.] FT-IR spectroscopy for the detection of liver damage. *Spectroscopy*, v. 18, p. 67–73, 2004.

<https://doi.org/10.1155/2004/528728>

DYSON, J.K.; ANSTEE, M.Q.; MCPHERSON, S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterology*, v. 5, n. 3., p. 211-218, 2014.

<https://doi.org/10.1136/flgastro-2013-100403>

DOGAN, A. [et al.] ATR-FTIR spectroscopy reveals genomic loci regulating the tissue response in high fat diet fed BXD recombinant inbred mouse strains. *BMC Genomics*, v. 14, n. 1, p. 386, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-386>

DULY, A. M. P. [et al.] Effect of multiple binge alcohol on diet-induced liver injury in a mouse model of obesity. *Nutrition & Diabetes - Nature*, v. 5, n. 4, p. 154, 2015.

<https://doi.org/10.1038/nutd.2015.4>

ELARINY, H. A.; BARANOVA, A. Comment on: diet-induced obesity associated with steatosis, oxidative stress and inflammation in liver. *Surg Obes Relat Dis.*, v. 8, n. 1, p. 81-83, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.soard.2011.10.004>

FERNANDES, M. R. A. [et al.] Animal Models of Obesity Characterized by Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Chapter 5. In: BARTHOLOMEW, I. *Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy*, Intech Open, 2017.

FESKENS, E. J. M.; SLUIK, D.; VAN WOUDEBERGH, G. J., Meat consumption, diabetes, and its complications. *Curr. Diab. Rep.*, v. 13, n. 2, p. 298–306, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s11892-013-0365-0>

FIGUEIREDO, M.S. Estudo das Propriedades Ópticas e Termo-Ópticas do Biodiesel e suas Misturas. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS. 2009.

FORBES, S. J. Stem cell therapy for chronic liver disease- choosing the right tools for the job. *Gut*, v. 57, n. 2, p. 153– 155, 2008.

<https://doi.org/10.1136/gut.2007.134247>

FOX, S. I. *Fisiologia Humana / Stuart Ira Fox*. 7. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2007, 726 p.

GEERTS, A. [et al.] *In vitro* differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *Journal of Pathology*, v. 9, n. 1, p. 59-68, 1989.

[https://doi.org/10.1016/0168-8278\(89\)90076-7](https://doi.org/10.1016/0168-8278(89)90076-7)

GROSSE, Y. [et al.] Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol.* v. 7, n. 8, p. 628–629, 2006.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70789-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70789-6)

GRUBER, H.J. [et al.] Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes (Lond)*. v. 32, n. 5, p.826-31, 2008.

<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803795>

GUH, D. P. [et al.] The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: asystematic review andmeta-analysis. BMC Public Health.,v. 9, n. 1, p. 88, 2009.
<https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88>

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. v. 8, p. 34–44, jan. 2011.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.191>

HEZEL, M.P. [et al.] Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. Redox Biol. v. 5, p. 234-242, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.004>

HILL, J. O.; PETERS, J. C. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. Science, v. 280, 1371–1374, 1998.
<https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1371>

HOBBS, D.A.; GEORGE, T.W.; LOVEGROVE, J.A. The effects of dietary nitrate on blood pressure and endothelial function: a review of human intervention studies. Nutrition Research Reviews, v. 26, p. 210–222, 2013.
<https://doi.org/10.1017/S0954422413000188>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 538 p.

KHAUSTOVA, S., [et al.] Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. The Analyst, v. 135, p. 3183-3192, 2010.
<https://doi.org/10.1039/c0an00529k>

KOCHAN, K. [et al.] FT-IR imaging for quantitative determination of liver fat content in Non-Alcoholic Fatty Liver The Royal Society of Chemistry/ Analyst J. Name., v. 00, p. 1-3, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins Patologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 604 p.

LEITE, N. C. [et al.] Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. Liver Int, v. 31, n. 5, p. 700-6, May 2011. ISSN 1478-3231.
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02482.x>

LE NAOUR, F. [et al.] Quantitative Assessment of Liver Steatosis on Tissue Section Using Infrared Spectroscopy. *Gastroenterology*, v. 148, p. 295–297, 2015.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.038>

LIU, Y.Z. [et al.] Chronic stress induces steatohepatitis while decreases visceral fat mass in mice. *BMC Gastroenterology*, v. 106, n. 14, p. 1-8, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-106>

LOMONACO, R. [et al.] Nonalcoholic fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. *Drugs*, v. 73, p. 1-14, 2013.
<https://doi.org/10.1007/s40265-012-0004-0>

LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v. 38, p. 87–104, 1995.
[https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(05\)80001-5](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(05)80001-5)

LUNDBERG, J. O. [et al.] Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovasc. Res.*, v. 89, n. 3, p. 525–532, 2011.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq325>

LUNDBERG, J. O. [et al.] Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 12, p. 865-869, 2009.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.260>

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M., Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 37, p. 395–400, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027>

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 7, p. 156–167, 2008.
<https://doi.org/10.1038/nrd2466>

MA, J. [et al.] Body mass index in young adulthood and premature death: analyses of the US National Health Interview Survey linked mortality files. *Am J Epidemiol.*, v. 174, n. 8, p. 934-944, 2011.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwr169>

MANDE, S-L. A-S. [et al.] Nitrate in drinking water: a major polluting component of groundwater in gulf region aquifers, south of Togo. *International Journal of the Physical Sciences*, v. 7, n. 1, p. 144-152, 2012.

<https://doi.org/10.5897/IJPS11.874>

MARCIANO, R. C.; URIAS, G. M. P. C.; CARVALHO, C. Esteatose hepática em ratos com obesidade induzida. *Rev Ciên Saúde*, v. 2, n. 3, p. 19-24, 2017.

MARTELLI, A. Metabolismo Hepatocelular dos Lipídeos: uma Abordagem Clínica e Histopatológica do Acúmulo Intracelular de Lípidos (Esteatose) do Parênquima Hepático Induzida pelo Álcool. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 12, n. 1, p. 55-59, 2010.

MASARONE, M. [et al.] Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials.*, v. 9, n. 3, p. 126-133, 2014.

<https://doi.org/10.2174/1574887109666141216111143>

MCNALLY, B.; GRIFFIN, J.L.; ROBERTS L.D. Dietary inorganic nitrate: From villain to hero in metabolic disease? *Mol. Nutr. Food Res.* v. 60, p. 67–78, 2016.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201500153>

MEHTA, K.; [et al.] Non alcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutrition Reviews*, v. 60, n. 9, p. 289-93, 2002.

<https://doi.org/10.1301/002966402320387224>

MICHA, R.; WALLACE, S. K.; MOZAFFARIAN, D. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*, v. 121, p. 2271–2283, 2010.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924977>

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SVS. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, VIGITEL 2016. Brasília: DF; 2016 citado em Organização Pan-Americana da Saúde. Relatório da Reunião Técnica Internacional de Avaliação Econômica em Saúde com Foco na Obesidade (Brasília, 11 e 12 de junho 2018). Brasília: OPAS; 2018 disponível em:<<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50834>>

MITRA, V.; METCALF, J. Metabolic functions of the liver. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 10, n. 7, p. 334-335, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2009.03.011>

MORAES, A. L.; ALMEIDA, E. C.; SOUZA, L. B. Percepções de obesos deprimidos sobre os fatores envolvidos na manutenção da sua obesidade: investigação numa unidade do programa saúde da família no município do Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Coletiva*, v. 2, p. 553-572, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-73312013000200012>

NASCIMBENI, F. [et al.] From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol.*, v. 59, n. 4, p. 859-871, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.044>

OGUR, R. [et al.] High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of a tocopherol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, n. 1, p. 161, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.051>

OJEDA, J. J.; DITTRICH, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 881, p. 187-211, 2012.

https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8

OLIVEIRA, C. P. Alterações hepáticas em grandes obesos: avaliações clínico-laboratoriais e histopatológicas antes do tratamento cirúrgico da obesidade. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 158p.

de OLIVEIRA, M. L.; SANTOS, L. M. P.; SILVA, E.N. Direct Healthcare Cost of Obesity in Brazil: An Application of the Cost-of-Illness Method from the Perspective of the Public Health System in 2011. *PLoS One*, v.10, n. 4, Abr 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121160>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS (2017). Monitoreo de avances en materia de las enfermedades no transmisibles 2017. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/iris/handle/10665/259806>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

PANNALA, A.S. [et al.] The effect of dietary nitrate on salivary, plasma and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radical Biology & Medicin*, v. 34, p. 576-84, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01353-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01353-9)

PAULO, B. E. de; ROCHA, L. B. Quantificação de mastócitos em lesões reversíveis e irreversíveis do fígado humano. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 23, n. 2, p. 97-105, maio/ago, 2019.

<https://doi.org/10.25110/arqsaude.v23i2.2019.6790>

PARADIES, G. [et al.] Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.*, v. 20, n. 39, p. 14205-14218, 2014.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14205>

PENG, C. [et al.] Vibrational signatures to discriminate liver steatosis grades. *Analyst.*, v. 140, n. 4, p. 1107-18, Feb, 2015.

<https://doi.org/10.1039/C4AN01679C>

PENG, C. [et al.] Discrimination of cirrhotic nodules, dysplastic lesions and hepatocellular carcinoma by their vibrational signature. *J Transl Med.*, v. 14, n. 9, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12967-016-0763-6>

PEREIRA, J.; MATEUS, C. Custos indiretos e associados à obesidade em Portugal. *Revista Portuguesa de Saude Pública*, v. 3, p. 65-80, 2003.

PÉREZ, C. M.; SÁNCHEZ, H.; ORTIZ, A. P. Prevalence of overweight and obesity and their cardiometabolic comorbidities in Hispanic adults living in Puerto Rico. *Journal of Community Health*, v. 38, p. 1140-1146, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s10900-013-9726-5>

PINTO, C. G. S. [et al.] Esteatose Hepática e Estilo de Vida Ativo: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 20, n. 3, p. 125-134, 2012.

POKORNY, L.; MATURANA, I. Sodium Nitrate. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.

<https://doi.org/10.1002/0471238961.1915040916151115.a01>

RITO, A.; BREDA, J. Um olhar sobre a estratégia de nutrição, actividade física e obesidade na União Europeia e em Portugal. *Revista Nutricias*, v. 6, p. 14-17, 2006.

SANGALI, T. D. Terapia nutricional na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em diabéticos: uma revisão bibliográfica. Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Porto Alegre, 2015.

SANTOS, M. F. P. Desenvolvimento e validação de métodos de espectroscopia no infravermelho próximo e médio para caracterização de lamelas de ETAR para uso

agrícola. Dissertação de Mestrado. Engenharia Biológica. UniversidadeTécnica de Lisboa, 2007.

SANYAL, A. J. [et al.] Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.*, v. 362, n. 18, p. 1675-85, 2010.

SASSON, M. [et al.] Prevalence and associated factors of obesity among Panamanian adults. *PLoS ONE*, v. 3, p. 1982–2010, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091689>

SATAPATHY, S. K.; SANYAL, A. J. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*, v. 35, n. 3, p. 221-35, Aug 2015. ISSN 1098-8971.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1562943>

SATAPATHY, S. K.; SANYAL, A. J. Novel treatment modalities for non alcoholic steatohepatitis. *Trends in Endocrinology & Metabolism.*, v. 21, n. 11, p. 668-675, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.003>

SELVARAJUA, R.; SUBBASHINIDEVI, K. FTIR molecular investigation on the concomitant effect of glycine and alcohol induced liver injury Pelagia Research Library. *Der Pharmacia Sinica*, v. 2, n. 3, p. 220-229. 2011. ISSN: 0976-8688 CODEN (USA): PSHIBD

SENDENSKY, A.; DUFOUR, J. F. Liver physiology. In: GINÈS, P.; KAMATH, P. S.; ARROYO, V. (eds.). *Chronic liver failure: Mechanisms and Management*. Humana Press, 2011.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-866-9_2

SHAI, Y. ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1828, n. 10, p. 2306-13, oct. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.027>

SHENG, D. [et al.] A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.05.054>

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SINGAL, A. K.; JAMPANA, S. C.; WEINMAN, S. A. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int.*, v. 31, n. 10, p. 1432-1448, 2011.
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02604.x>

SKOOG, D. A. [et al.] *Fundamentos de química analítica*. 8.ed. São Paulo – SP: Cengage Learning, cap. 24 e 26. 2010.

SPEIJERS, G.J.A.; van den BRANDT, P.A. Nitrate (and potential endogenous formation of N- nitroso compounds) Online. WHO food additives series 50. Available <http://www.inchem.Org> (2003).

SPENGLER, E. K.; LOOMBA, R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clin Proc*, v. 90, n. 9, p. 1233-46, Sep 2015. ISSN 1942-5546.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.06.013>

SPERETTA, G. F. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. G. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. *Revista HUPE*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 61-69, 2014.
<https://doi.org/10.12957/rhupe.2014.9807>

SREEDHAR, H. [et al.] Infrared spectroscopic imaging detects chemical modifications in liver fibrosis due to diabetes and disease. *Biomedical Optics Express*, v. 7, n. 6, may 2016.
<https://doi.org/10.1364/BOE.7.002419>

STUART, B. H. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Wiley, 2005.

SUN, D. (Ed.). *Infrared spectroscopy: for food quality analysis and control*. Academic Press, 2009.

SEVERCAN, F., [et al.]. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *Journal of biophotonics*, v. 3, 621-631, 2010.
<https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>

SWINBURN, B. A. [et al.] The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, v. 378, p. 804–814, 2011.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. *Current Biology Magazine*, v. 27, n. 21, p. R1141-R1155, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.046>

TUNISSIOLLI, N. M. [et al.] Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 18, p. 863-872, apr 2017.

UED, F. V.; WEFFORT, V. R. S. Vitaminas antioxidantes no contexto da doença hepática gordurosa não alcoólica em crianças e adolescentes obesos. *Rev Paul Pediatr.*,v. 31, n. 4, p. 523-30, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-05822013000400016>

VARMA, V. K., [et al.] A label-free approach by infrared spectroscopic imaging for interrogating the biochemistry of diabetic nephropathy progression. Published in final edited form as: *Kidney Int.*, v. 89, n. 5, p. 1153–1159, may 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.027>

WANNMACHER, L. Obesidade como fator de risco para morbidade e mortalidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas. *OPAS/OMS – Representação Brasil*, v. 1, n. 7, p. 1-10, 2016.

WARD, Z. J. [et al.] Redrawing the US obesity landscape: bias-corrected estimate of state-specific obesity prevalence. *PLoS ONE*, v. 3, p. 1-13, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. Fact sheet N°. 311. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 8 abr. 2019.

YOUNES, R.; BUGIANESI, E. A spotlight on pathogenesis, interactions and novel therapeutic options in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 16, 80–82, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41575-018-0094-6>

YOUNOSSI, Z. M. [et al.] Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73-84, jul 2016. ISSN 1527-3350.

<https://doi.org/10.1002/hep.28431>

YOUNOSSI, Z. [et al.] Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 15, p. 11-20, 2018.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>