

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 05/12/2019.

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciência Farmacêuticas

**UMA INVESTIGAÇÃO EXPLORATÓRIA DO
CONSUMO CRÔNICO DE SUCO DE LARANJA
NA MICROBIOTA INTESTINAL DE MULHERES
ADULTAS**

Ana Carolina Delgado Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof(a).Dr(a).Katia Sivieri

Araraquara
2017

UMA INVESTIGAÇÃO EXPLORATÓRIA DO CONSUMO CRÔNICO DE SUCO DE LARANJA NA MICROBIOTA INTESTINAL DE MULHERES ADULTAS

Ana Carolina Delgado Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof(a).Dr(a).Katia Sivieri

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L732u Lima, Ana Carolina Delgado
Uma investigação exploratória do consumo crônico de suco de laranja na microbiota intestinal de mulheres adultas / Ana Carolina Delgado Lima. – Araraquara, 2017.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Ciências dos Alimentos.

Orientador: Katia Sivieri.

1. Prebióticos. 2. Microbiota intestinal. 3. AGCC. 4. Suco de laranja pasteurizado. I. Sivieri, Katia, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440.

CAPES: 50700006



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Uma investigação exploratória do consumo crônico de suco de laranja na microbiota intestinal dos indivíduos saudáveis

AUTORA: ANA CAROLINA DELGADO LIMA

ORIENTADORA: KÁTIA SIVIERI


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. KÁTIA SIVIERI

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP


Profa. Dra. FERNANDA LOPES KINOUCHI

Curso de Farmácia da Área de Ciências da Saúde / Universidade Paulista - UNIP


Profa. Dra. THAIS BORGES CESAR

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 05 de dezembro de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Humberto e Margarete, aos meus irmãos, minha madrinha Valquíria, meu namorado Gabriel e sua família por sempre acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade de aprendizado.

À minha querida família, que com carinho, amor e conselhos me ensinaram que na vida é preciso lutar sempre.

Agradeço à Profa. Dra. Katia Sivieri, pela orientação e ensinamentos durante o desenvolvimento dessa dissertação.

Agradeço a minha madrinha Valquíria por sempre acreditar no meu potencial

Agradeço ao Gabriel e sua família pelo apoio, amor e carinho que foram fundamentais para o meu equilíbrio.

Agradeço a querida amiga Clara Cecatti pela ajuda e dedicação comigo durante todo desenvolvimento dessa dissertação.

Agradeço a amiga Melaine pela disposição de sempre me ajudar.

Agradeço aos voluntários pela disposição de me ajudar no desenvolvimento dessa dissertação.

À CitrusBr (Matão) pelo fornecimento do suco de laranja.

À CAPES, pela bolsa e financiamento.

À Dra. Maria Angela Tallarico Adorno e Dra. Isabel Kimiko Sakamoto do Departamento de Engenharia Ambiental da EESC/USP, pelo auxílio nas análises de ácidos graxos de cadeia curta e de PCR-DGGE.

As meninas do Laboratório Microbiologia de Alimentos.

A todos os meus amigos, que sempre se fizeram presentes e me apoiaram nessa etapa.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO	15
Referências	18
Capítulo 1. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
Microbiota Intestinal	21
Compostos Fenólicos.....	24
Suco de Laranja	277
Referências	32
Capítulo 2- Impact of chronic consumption of orange juice on the diversity of the intestinal microbiota of adult women.....	40
ABSTRACT	42
Introduction.....	Erro! Indicador não definido.
Material and methods.....	45
Individuals	45
Orange juice.....	455
Experimental protocol.....	466
Body Composition.....	46
Stool collection	46
Microbiological analysis.....	47
Determination ammonium (NH ₄ ⁺) short-chain fatty acids (SCFA _S)and pH in fecal samples.....	49
Gastrointestinal symptoms and bowel function scores.....	50
Statistical analysis	50
Results	Erro! Indicador não definido.
Body Composition.....	50
Effects of orange juice on the growth of intestinal bacteria	56
Effects of orange juice on the intestinal bacteria metabolism.....	56
Effects of orange juice on intestinal function of individuals.....	56
Discussion	57
Conclusions.....	62

Acknowledgements	62
References	Erro! Indicador não definido.
CONCLUSÕES.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
DGEE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DP	Desvio Padrão
UFC	Unidade Formadora de Colônia
PCR	Polymerase Chain Reaction
ISL	Ingestão do Suco de Laranja
OMS	Organização Mundial da Saúde
SHIME	Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem
SFCA	Short-Chain Fatty Acid
POJ	Pasteurized orange juice
Rr	Richeness
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CFU	Colony Forming Unity
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Impact of chronic consumption of orange juice on the diversity of the intestinal microbiota of adult women

Table 1: Mean values and standard deviation of anthropometric data of women during 120 days of trial period.....51

Table 2: Intestinal health of women during the trial period.....57

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Revisão de Literatura

Figura 1: Estruturas Químicas de polifenóis.....24

Figura 2: Estruturas químicas de duas classes de flavonóides.....25

Figura 3:Metabolismo dos polifenóis do tipo flavonóides.....26

Capítulo 2: An exploratory investigation of chronic consumption of orange juice on gut microbiota of adult women

Figure 1: Model of the experimental design used with the subjects of the study.....46

Figure 2: Average population (\pm DP) expressed as log₁₀ CFU/. ml⁻¹ of different bacterial groups in the feces of women during the experimental protocol. n = 10.....52

Figure 3: Analysis of denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) of total bacteria show the four women (F1, F2, F5 and F9), during treatment with orange juice (2 = Basal; 3 = 30 days juice ingestion; 4 = 60 days juice ingestion) and without juice ingestion (5=Washout).....53

Figure 4: Average and standard deviation of concentration of ammonium ions (mmol/L) evaluated in the feces of women during the trial period.....54

Figura 5: SCFA ratios upon feces. Absolute SCFA levels are indicated above each bar (mmol/g) (A). Significant decreases compared to the control are indicated by **, while significant increases are indicated by * ($p \leq 0.05$).Basal:

before juice ingestion, 30 and 60 days: juice ingestion, Washout: without juice ingestion, n=10.....55

Figure 6: Average and standard deviation of pH values evaluated in the feces of women during the trial period.....56

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1: Revisão de Literatura

Quadro 1: Estudos clínicos sobre o efeito da ingestão crônica ou aguda do suco de laranja.....	29
Quadro 2: Estudos in vitro ou vivo do efeito da ingestão do suco de laranja sobre a microbiota intestinal.....	31

RESUMO

Introdução: A microbiota intestinal se mantém em equilíbrio (homeostase) durante a fase adulta do ser humano, porém pode se desestabilizar através do estresse, tratamentos quimioterápicos, medicamentos e dietas. A homeostase pode ser alcançada através da ingestão de probióticos, prebióticos e componentes bioativos, tais como os flavonóides cítricos do tipo hesperitina e naringina. **Objetivo:** Avaliar o efeito da ingestão crônica de suco de laranja pasteurizado (POJ) sobre a microbiota intestinal das mulheres adultas. **Material e métodos:** foram avaliadas dez mulheres adultas, que ingeriram suco de laranja pasteurizado durante 60 dias, com um período de esmaecimento de 30 dias. As fezes foram coletadas antes da ingestão de suco de laranja (basal) e depois a cada 30 dias até o final do experimento, totalizando 120 dias do período experimental. Durante todo o período experimental, foi realizada a avaliação antropométrica de todos os indivíduos que participaram no estudo. Para a avaliação da microbiota intestinal, foram realizados análises microbiológicas dependente de cultivo usando meios seletivos para bactérias anaeróbias totais, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Clostridium* spp. Uma avaliação independente de cultura foi realizada usando a desnaturação Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Para a avaliação dos metabolismos microbiano foram realizadas as análises de pH, amônio (NH₄⁺) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). **Resultados:** A ingestão crônica de suco de laranja não influenciaram nas medidas de composição do corpo, melhorou os parâmetros bioquímicos. O POJ mostrou modulações da composição da microbiota e nas atividades metabólicas. Em particular, os números de *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp nas fezes foram maiores após 60 dias de ingestão POJ. Análise de PCR-DGGE mostrou que a microbiota de todos os indivíduos estudados tinha uma composição semelhante em relação às bactérias totais. Em relação ao metabolismo microbiano, observou-se redução dos valores de NH₄⁺ e aumento ($p \leq 0,05$) na produção de AGCC após 60 dias de ingestão POJ **Conclusão:** Este estudo demonstrou que crônica ingestão de POJ pode ser uma alternativa eficaz para uma alimentação saudável, com efeito, na modulação da microbiota intestinal de mulheres adultas.

Palavras-Chaves: Prebióticos, microbiota intestinal, AGCC.

ABSTRACT

Introduction: The gut microbiota remains balanced (homeostasis) during the adult stage of the human being, but can be destabilized through stress, chemotherapeutic treatments, medicines and diets. Homeostasis can be achieved through ingestion of probiotic, prebiotic, and bioactive components such as hesperitin and naringin-type citrus flavonoids. **Objective:** To evaluate the effect of chronic ingestion of pasteurized orange juice (POJ) on the intestinal microbiota of adult women. **Material and Methods:** Ten adult women were evaluated, which ingested pasteurized orange juice during 60 days, with a washout period of 30 days. The stool was collected before orange juice intake (basal) and then every 30 days until the end of the experiment, totaling 120 days of experimental period. Throughout the experimental period, the anthropometric evaluation of all individuals who participated in the study was performed. For the evaluation of the intestinal microbiota, plate count analyzes were performed using selective media for total anaerobic bacteria, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Clostridium* spp. An independent culture evaluation was performed using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). The pH, ammonium (NH₄⁺) and short chain fatty acids (SCFA) were evaluated for microbial metabolism. **Results:** Chronic intake of orange juice did not influence the body composition measurements but improved blood biochemical parameters. POJ showed positive modulations of the microbiota composition and metabolic activity. In particular, numbers of faecal *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus* spp were higher after 60 days of POJ intake. PCR-DGGE analysis showed that the microbiota of all the individuals studied had a similar composition in relation to total bacteria. In relation to the microbial metabolism, it was observed reduction of NH₄⁺ values and increase ($p \leq 0.05$) in the production of SCFA after 60 days of POJ intake **Conclusion:** This study has shown that chronic intake of POJ can be an effective alternative for healthy eating, with effect on the modulation of the intestinal microbiota of adult women.

Keywords: Prebiotic, Intestinal Microbiota, SFCA.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Estima-se que o trato gastrointestinal seja habitado por 10^{11} células por mL de conteúdo luminal, compreendendo cerca de 400 a 500 espécies bacterianas (1). A microbiota intestinal é composta por bactérias anaeróbias estritas, que superam as anaeróbias facultativas e bactérias aeróbias (2). Os principais filos mais comuns encontrados são quatros, entre eles os Bacteroidetes, Actinobactérias, Proteobactérias e os Firmicutes. Os gêneros mais comuns encontrados são os *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.* e *Ruminococcus spp.* (3).

A composição da microbiota intestinal é influenciada por fatores imunológicos e dietéticos (2). A dieta possui uma influência muito grande sobre o ambiente do intestino, incluindo o pH, trânsito intestinal e mudanças na microbiota intestinal (1). A microbiota exerce as funções de degradação de componentes não digeríveis da dieta, como as fibras, modulação do sistema imunológico, síntese de vitaminas K e B₁₂ e produção ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (4).

Os benefícios à saúde do hospedeiro dependem do equilíbrio entre bactérias comensais e patogênicas (5). Segundo Eckburgg et al. (6), a microbiota intestinal se mantém estável e equilibrada (homeostase) durante a fase adulta, porém pode se desestabilizar através do estresse, tratamentos quimioterápicos, remédios e dietas. No entanto o equilíbrio da microbiota pode se alcançada através da ingestão de alimentos probióticos, ingredientes prebióticos e compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos (1). Os compostos fenólicos são transformados pela microbiota intestinal em metabólitos bioativos, os quais podem promover a manutenção da homeostase

intestinal e estimular o crescimento de bactérias benéficas (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) e inibindo o de bactérias patogênicas (*Clostridium* spp.) (7).

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila. Os principais grupos de polifenóis são flavonóides, álcoois fenólicos, estilbenos e lignanas (8). As principais fontes de flavonóides incluem frutos (uvas, cerejas, maçã, frutas cítricas entre outros) e hortaliças (pimenta, tomate, espinafre, cebola e brócolis) (9). Os estudos *in vitro* têm demonstrado que os flavonóides do tipo hesperitina e naringina presente no suco de laranja tem apresentado uma variedade de atividades biológicas, entre elas antioxidantes, antiinflamatória, antitumorais, redução de colesterol elevado e aumento da sensibilidade à insulina (10).

O suco de laranja juntamente com as frutas cítricas tem sido muito valorizado como parte essencial de uma dieta nutritiva e saborosa. Os sabores fornecidos pelo suco de laranja e pelas frutas cítricas estão entre os mais preferidos no mundo. Além disso, o suco de laranja e as frutas cítricas são fontes ricas de vitaminas, minerais e fibras alimentares que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento nutricional global (11,12).

O consumo diário do suco de laranja está sendo associada com a redução do aparecimento de doenças crônicas, melhora no perfil lipídico, diminuição o colesterol total e marcadores de inflamatórios. Esses efeitos ocorrem devido à presença de compostos bioativos, tais como ácido ascórbico, carotenoides e flavonóides (hesperitina e naringina) presente no suco de

laranja (13,14). Estudos envolvendo a ingestão de suco de laranja e o efeito sobre a microbiota ainda são escassos.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da ingestão crônica do suco de laranja pasteurizado sobre a microbiota de mulheres adultas.

Referências

1. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*. 2013; 69(1):52-60.
2. Walsh C, Guinane C, O'Toole P. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters*. 2014; 588(22): 4120-4130.
3. Ferreira F, Dos Santos F, Jardim de Lima L, Nicolli L. Microbiota indígena do trato gastrointestinal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2010; 10(1): 78-93.
4. Almeida LB, Marinho CB, Souza CS, Cheib V. Disbiose intestinal. *Revista Brasileira Nutrição Clínica*. 2009; 24(1): 58-65.
5. Erickson KL, Hubbard NE. Symposium : Probiotic Bacteria : Implications for Human Health Probiotic Immunomodulation in Health and Disease. *Journal Nutricional*. 2000;1(2):403-409.
6. Eckburg PB, Bik E, Bernstein C, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308(5728):1635-1638.
7. Dueñas M, Cueva C, Muñoz-González C, Jiménez-Giroón A, Sanchez-Patán F, et al. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed Research International*. 2015; 2015:1-15.
8. D'archivio M, Filesì C, Benedetto R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*. 2007; 43(4):348-61.
9. BARNES J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Review. Journal of. Pharmacy and Pharmacology*. 2001; 5(3):5583-600.

10. Pereira-Caro G, Borges G, Ribas A, Calani L, Del Rio, D, Roberts, SA et al. In vitro colonic catabolism of orange juice (poly) phenols. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015; 59: 465-475.
11. Food and Agriculture Organization (FAO) University School of Nutrition Science and Policy. William D. Clay is Chief. Nutrition Programs Service, Food and Nutrition Division. Massachusetts, United States; 2014
12. Henning SM, Yang J, Shao P, Lee RP, Huang J, et al. Health benefit of vegetable/fruit juice-based diet: Role of microbiome. *Scientific Reports*. 2017; 7:21-67.
13. Apteckmann NP, Cesar TB. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. *Lipids in Health and Disease*. 2013; 12(119):1-10.
14. Molan A, Liu Z, Kruger M. et al. The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 2010; 26: 1735-1743.

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos indica que:

- 1- A ingestão crônica de suco de laranja não influenciou nas medidas antropométricas dos voluntários.
- 2- O suco de laranja pasteurizado modificou a composição da comunidade microbiana com aumento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* ssp
- 3- O suco mostrou efeito no metabolismo microbiano como, redução da concentração de íons amônio e aumento do conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta, indicando efeito prebiótico do suco de laranja sobre a microbiota intestinal.
- 4- O suco de laranja mostrou ser uma alternativa eficaz de alimentação saudável e com efeito na modulação da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e eutróficos.