

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeito da suplementação crônica de Eriocitrina
na microbiota intestinal de indivíduos pré-
diabéticos.**

Fernanda Maria Manzini Ramos

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

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Thais Borges César

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Sivieri

Araraquara

2021

Efeito da suplementação crônica de Eriocitrina na microbiota intestinal de indivíduos pré- diabéticos.

Fernanda Maria Manzini Ramos

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

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Thais Borges César

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Sivieri

Araraquara

2021

-
- R296e** Ramos, Fernanda Maria Manzini.
Efeito da suplementação crônica de Eriocitrina na microbiota intestinal de indivíduos pré-diabéticos / Fernanda Maria Manzini Ramos. – Araraquara: [S.n.], 2021.
95 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.
- Orientadora: Thais Borges César.
Coorientadora: Kátia Sivieri
1. Eriocitrina. 2. Flavonoides cítricos. 3. Pré-diabetes. 4. Bactérias intestinais. I. César, Thais Borges, orient. II. Sivieri, Kátia, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito da suplementação crônica de Eriocitrina na microbiota intestinal de indivíduos pré-diabéticos

AUTORA: FERNANDA MARIA MANZINI RAMOS

ORIENTADORA: THAIS BORGES CESAR

COORIENTADORA: KATIA SIVIERI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciências Nutricionais pela Comissão Examinadora:

Prof. Dra. KATIA SIVIERI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Profa. Dra. VIVIAN MARQUES MIGUEL SUEN (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina do Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. MARIO ROBERTO MAROSTICA JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. JARLEI FIAMONCINI (Participação Virtual)
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Araraquara, 26 de março de 2021

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP.

À minha orientadora Profa. Dra. Thais Borges Cesar, pelo seu papel primordial na conduta não apenas deste trabalho, mas também da minha formação.

À minha coorientadora Profa. Dra. Kátia Sivieri por auxiliar de forma excepcional no desenvolvimento deste trabalho.

À Carolina Barbosa Ribeiro pela parceria em todas as etapas desse trabalho e na minha vida.

Ao Dr. John Manthey, pesquisador da “U.S. Horticultural Research Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, Fort Fierce, Florida, USA, pela colaboração na concepção deste estudo.

Ao Dr. Dragan Milenkovic, pesquisador visitante do “Department of Internal Medicine, UC Davis School of Medicine, University of California, Davis, USA, e pesquisador da “Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont Ferrand, France, pela análise genética da microbiota intestinal dos voluntários.

Ao Sr. Robert Brewster, presidente da empresa “Ingredients by Nature” em Montclair, CA, USA, pelo financiamento deste projeto em convênio firmado com a UNESP e a Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária - FUNDAG, Campinas, SP (Grant/Award 5045).

Aos estudantes de iniciação científica Matheus Marques e Jeane Fan pelo auxílio na coleta de dados, e aos colegas de laboratório Danielli Baeta, Renata Benassi e Mateus Salgaço, que de diferentes formas e em diferentes momentos, auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos voluntários, pela disposição e generosidade.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição pelo ensino e dedicação e funcionárias da Pós-graduação pela atenção e competência.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, em especial ao Sérgio Valadão, pelo suporte durante os procedimentos de coleta e análise bioquímica das amostras.

À farmácia Bandeirantes, em especial ao Evandro Yashuda pelo suporte na confecção das drágeas durante a pesquisa.

À Secretaria da Saúde de Araraquara e SESA pela autorização na coleta de dados nas Unidades de Saúde.

O desejo de ir em direção ao outro, de se comunicar com ele, ajudá-lo de forma eficiente, faz nascer em nós uma imensa energia e uma grande alegria, sem nenhuma sensação de cansaço”

Dalai Lama

Resumo

O objetivo do trabalho foi verificar possíveis alterações na microbiota intestinal e marcadores metabólicos em indivíduos pré-diabéticos que responderam à suplementação com Eriocitrina com redução da glicemia de jejum após 12 semanas, em comparação com o grupo de não respondedores à Eriocitrina, ou sem alteração da glicemia de jejum, e um grupo controle suplementado com placebo. Foram selecionados 45 indivíduos pré-diabéticos, de acordo com critérios previamente estabelecidos. Destes, 32 indivíduos foram suplementados diariamente com Eriocitrina (200 mg/dia) e 13 indivíduos controle foram suplementados com Placebo. Após o tratamento de 12 semanas, os indivíduos tratados com Eriocitrina foram subdivididos em: (1) Respondedores, aqueles que reduziram significativamente a glicose no sangue, e (2) Não Respondedores, aqueles que não tiveram alterações na glicose sanguínea. Todas as medidas foram realizadas no início e no final do estudo, incluindo parâmetros bioquímicos, antropométricos, dietéticos e da microbiota intestinal quanto à abundância relativa de bactérias intestinais e à concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes. Todos os grupos estudados apresentaram microbiota intestinal semelhante no período inicial (basal), com predomínio do filo Firmicutes e bactérias relacionadas à inflamação, como *Lachnospiraceae* e *Blautia*, sugerindo algum grau de disbiose intestinal. Ainda no período basal, observou-se maior abundância relativa do gênero *Coprococcus* no grupo Respondedores, em relação ao grupo Não Respondedores, e da família *Streptococcaceae* no grupo Respondedores em relação ao Placebo. Após 12 semanas de suplementação com Eriocitrina, houve um aumento no gênero *Coprococcus* e uma diminuição na família *Clostridiaceae* no grupo de Não Respondedores. Entre os Respondedores foi detectado aumento na proporção de *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* e redução de *Lactobacillus*. A suplementação de Eriocitrina teve efeitos limitados sobre a microbiota intestinal em indivíduos pré-diabéticos, com poucas alterações nas famílias e gêneros das bactérias intestinais. Provavelmente a ausência de efeitos significativos do tratamento com Eriocitrina na microbiota foi devido à própria condição metabólica pré-diabética, que está associada ao fenômeno da disbiose intestinal. Além disso, as características da dieta dos indivíduos suplementados, com alta concentração de gordura saturada é, presumivelmente, mais um fator relacionado a disbiose da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Eriocitrina; flavonoides cítricos; pré-diabetes; bactérias intestinais.

Abstract

The objective of this work was to verify possible changes in the intestinal microbiota and metabolic markers in pre-diabetic individuals who responded to supplementation with Eriocitrin with reduced fasting glycemia after 12 weeks, compared to the group of non-responders to Eriocitrin, or without alteration of fasting glycemia, and a control group supplemented with placebo. Forty-five pre-diabetic individuals were selected, according to the criteria previously established. From them, 32 individuals were undergoing daily supplementation with Eriocitrin (200 mg/day), and 13 individuals, as control, were supplemented with Placebo. After the 12-week treatment, subjects treated with Eriocitrin were subdivided into: (1) Responders, those who significantly reduced blood glucose, and (2) Non-Responders, those who had no changes on blood glucose. All measurements were performed at the beginning and at the end of the study, including biochemical, anthropometric, dietary and intestinal microbiota parameters regarding the relative abundance of intestinal bacteria and the concentration of short chain fatty acids in the faeces. All groups studied had similar intestinal microbiota in the initial period (baseline), with a predominance of the phylum Firmicutes and bacteria related to inflammation, such as *Lachnospiraceae* and *Blautia*, suggesting some degree of intestinal dysbiosis. Still in the baseline period, a greater relative abundance of the *Coprococcus* genus was observed in the Responders group compared to the Non-Responders group, and of the *Streptococcaceae* family in the Responders group in relation to the Placebo. After 12 weeks of Eriocitrin supplementation, there was an increase in the genus *Coprococcus* and a decrease in the *Clostridiaceae* family in the Non-Responders group. Among the Responders, an increase in the proportion of *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* and a reduction in *Lactobacillus* was detected. Eriocitrin supplementation had limited effects on the intestinal microbiota in pre-diabetic individuals, with little change in the families and genera of the intestinal bacteria. Probably the absence of significant effects of treatment with Eriocitrin in the microbiota was due to the pre-diabetic metabolic condition, which is associated with the phenomenon of intestinal dysbiosis. In addition, the characteristics of the diet of individuals supplemented with a high concentration of saturated fat is, presumably, another factor related to dysbiosis of the intestinal microbiota.

Keywords: Eriocitrin; citrus flavonoids; pre-diabetes; intestinal bacteria.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	American Diabetes Association
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
HbA1c	Hemoglobina Glicada
IDF	International Diabetes Federation
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
IMC	Índice de Massa Corporal
MI	Microbiota Intestinal
OTU	Operation Taxonomic Unit
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
LPS	Lipopolissacarídeos
TLR4	Toll-like 4 Receptor
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
TNF- α	Tumoral Necrosis Factor alpha
IL	Interleucina
3,4- DHCA	3,4-Ácido Diidroxihidrocinâmico

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Estudos realizados com Eriocitrina e seus principais desfechos.	26
Capítulo 1	
Tabela 1. Idade, <i>Operational Taxonomic Units</i> (OTU), Diversidade alfa (índice Chao1 e Shannon), Índice Simpson e Ácidos graxos de cadeia curta no período basal dos grupos estudados.	56
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e pressão arterial dos grupos de estudo no período basal.	61
Tabela 3. Parâmetros antropométricos e dietéticos dos grupos de estudo, segmentados por sexo, no período basal.	62
Tabela 4. <i>Operational Taxonomic Units</i> (OTU), Diversidade alfa (índice Chao1 e Shannon), Índice Simpson e Ácidos graxos de cadeia curta após 12 semanas de suplementação com Eriocitrina ou Placebo.	64
Tabela 5A. Filos de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos de Respondedores, Não Respondedores e Controle.	65
Tabela 5B. Famílias de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos de Respondedores, Não Respondedores e Controle.	66
Tabela 5C. Gêneros de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos de respondedores, não-respondedores e controle.	68
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos e pressão arterial dos grupos estudados após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Placebo.	71
Tabela 7. Parâmetros antropométricos e diéticos dos grupos de estudo, segmentados por sexo, após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Placebo.	74

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Impacto da dieta na microbiota intestinal e na saúde humana.	16
Figura 2. Associação entre disbiose da microbiota intestinal e pré-diabetes.	22
Figura 3. Estrutura geral do flavonoide.	24
Figura 4. Metabolismo da Eriocitrina.	28
Capítulo 1	
Figura 1. Fluxograma do desenho experimental do estudo.	47
Figura 2. Abundância relativa dos filos, famílias e gêneros dos grupos Respondedores, Não Respondedores e Controles no período basal.	60
Figura 3A. Esquema da modificação dos Filos após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos (Respondedores, Não Respondedores e Controle).	65
Figura 3B. Esquema da modificação das Famílias de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos (Respondedores, Não Respondedores e Controle).	67
Figura 3C. Esquema da modificação dos Gêneros de bactérias intestinais após o tratamento com Eriomin ou placebo de acordo com os grupos (respondedores, não-respondedores e controle).	69

Sumário

	Página
1.Introdução	13
1.1 Pré-diabetes	13
1.2 Microbiota Intestinal (MI)	16
1.3 Polifenóis	23
2.Referências bibliográficas	30
CAPÍTULO 1	38
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Metodologia	45
<i>Participantes</i>	45
<i>Desenho Experimental</i>	45
<i>Tamanho da amostra</i>	46
<i>Critérios de Inclusão</i>	48
<i>Critérios de Exclusão</i>	48
<i>Preparação do Suplemento</i>	49
<i>Coleta e Armazenamento das fezes</i>	49
<i>Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta</i>	50
<i>Análise da Microbiota Intestinal</i>	50
<i>Análises Bioquímicas</i>	52
<i>Medidas Antropométricas</i>	52
<i>Consumo Alimentar</i>	54
<i>Pressão Arterial</i>	54
<i>Avaliação da conformidade, Efeitos adversos e Segurança da Eriocitrina</i>	55
<i>Análise Estatística</i>	55
Resultados	56
<i>Baseline</i>	56
<i>Pós-intervenção</i>	63
Discussão	76
Conclusão	87
Referências	88
Considerações Finais	97

Introdução

1.1 Pré-diabetes

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA), 2019, o pré-diabetes é um termo utilizado para indivíduos que apresentam níveis intermediários de glicose sanguínea - entre a normalidade e elevados (como encontrados no diabetes) (1). Tanto a ADA, 2019 quanto a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), 2019 estabelecem como critérios para a identificação desses indivíduos: glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL (5.6 – 6.9 mmol/L) e/ou tolerância à glicose diminuída (avaliada pelo teste oral de tolerância à glicose (TOTG) após 2 horas da ingestão oral de 75 g de glicose) entre 140 e 199 mg/dL (7.8 – 11 mmol/L) e/ou hemoglobina glicada A1c (HbA1c) entre 5,7 e 6,4% (1, 2).

A 9ª Edição do *International Diabetes Federation* (IDF), 2019 apresenta dados alarmantes em relação à prevalência de pré-diabetes (3). Mundialmente, 373,9 milhões de adultos entre 20 e 79 anos (7,5% da população adulta) apresentaram tolerância à glicose diminuída (3). A previsão é que esses números aumentem para 453,8 milhões (8% da população adulta) até 2030 e para 548,4 milhões (8,6% da população adulta) até 2045 (3). No Brasil não existe dados oficiais sobre a prevalência de pré-diabetes.

O pré-diabetes é caracterizado pela presença simultânea de resistência à insulina e disfunção das células β e alguns estágios identificam a progressão desta condição para o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (4). No primeiro estágio da doença há um longo período de resistência à insulina, acompanhado por uma taxa compensatória aumentada de secreção de insulina e aumento da

massa de células β pancreáticas (5,6). O segundo estágio é o período de adaptação estável, quando as células β já não compensam totalmente o aumento da resistência à insulina e assim, os valores de glicemia de jejum e pós-sobrecarga não são completamente mantidos (4).

Se a secreção de insulina fosse capaz de compensar perfeitamente a sua resistência, não ocorreriam alterações observáveis na concentração de glicose (4). Esse fato significa que, por definição, a disfunção das células β já está presente no pré-diabetes (4). Estudos analisando diferentes medidas da função das células β relataram uma redução na secreção de insulina de até 80% em pessoas com pré-diabetes (7-9). Esses achados são corroborados por autópsias que mostraram diminuição de 50% no volume de células β em indivíduos com glicemia de jejum alterada (10).

O terceiro estágio é caracterizado por um período de descompensação, no qual as células β se tornam incapazes de compensar a resistência à insulina e, conseqüentemente, as concentrações de glicose aumentam rapidamente (6,11-13). Esse período se estende do pré-diabetes à manifestação do DM2 (6,11-13).

Resumidamente, a fisiopatologia do pré-diabetes envolve o aumento dos níveis de glicose, diminuição da função das células β e diminuição da sensibilidade à insulina (14,15). Prevê-se que o DM2 seja uma das cinco principais causas de morte nos países de alta renda até 2030 e uma das dez principais causas de morte no mundo, o que enfatiza a importância da saúde pública na redução do risco da doença, assim, a prevenção é uma das principais alternativas (4). Diretrizes publicadas apoiam que intervenções no

estilo de vida com foco na modificação da dieta e no aumento da atividade física devem ser a base da terapia para a prevenção do DM2, principalmente no período de pré-diabetes (16).

Pacientes pré-diabéticos normalmente exibem um perfil antropométrico obeso, incluindo índice de massa corporal (IMC) alterado, aumento de circunferência da cintura e da relação cintura quadril (17,18). Um estilo de vida saudável, com exercícios, alimentação equilibrada e controle de peso pode fornecer a base para o gerenciamento do controle glicêmico (19). Vários estudos sugerem que a composição e função alteradas da microbiota intestinal (MI) estão associadas ao DM2 (20-24) e diretamente relacionadas ao consumo alimentar (25). Um exemplo dessa relação é apresentado no trabalho de Fava et al, 2013 (26), no qual uma dieta com baixo teor de gordura aumentou a abundância de *Bifidobacterium* com redução concomitante na glicose de jejum, dentre outros parâmetros.

Outro exemplo de relação direta entre consumo alimentar e alteração da MI, tendo impacto no perfil glicêmico são as fibras alimentares. Alguns autores observaram que a ingestão de fibras produz alterações benéficas na composição da MI, impactando em parâmetros glicêmicos como a melhora na resistência à insulina, diminuição no pico de glicose pós-prandial e HbA1c e outros parâmetros relacionados indiretamente ao DM2, como redução de citocinas pró-inflamatórias (27-29). Uma dieta desequilibrada em macronutrientes e energia, portanto, pode levar à alterações na MI, sendo este um gatilho para o pré-diabetes e até para o DM2.

A figura 1 apresenta a relação entre alimentação, MI e seu impacto no controle glicêmico.



Figura 1. Impacto da dieta na microbiota intestinal e na saúde humana (adaptada de Singh et al, 2017) (25).

1.2 Microbiota Intestinal (MI)

O intestino adulto abriga aproximadamente 500 a 1.000 espécies bacterianas diferentes e pode ter 10^{12} a 10^{14} microorganismos, 90% das espécies bacterianas pertencem aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, dividindo espaço com outros filos como Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, em menor abundância (30-33). No nível de gênero, os principais constituintes são microorganismos anaeróbios obrigatórios dos gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*,

Peptostreptococcus, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium*, bem como anaeróbios facultativos menos predominantes, como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Proteus* (34,35). Essa composição pode variar de acordo com cada indivíduo, dependendo da genética, dieta, estilo de vida, estado de saúde e higiene (33).

A MI é tão importante quanto outros órgãos do corpo humano para a saúde metabólica (36,37). A MI saudável é benéfica para o hospedeiro e está ligada a atividades vitais como digestão, quebra enzimática de nutrientes e compostos alimentares com produção de energia e metabólitos, produção de vitaminas e degradação xenobiótica (36,37). Tais atividades podem promover a integridade da barreira intestinal, levar à proteção contra patógenos e apoiar a capacidade funcional do epitélio intestinal (36,37).

Aproximadamente 70% dos microorganismos presentes na MI não são cultiváveis em meios convencionais de cultivo ou exigem restritas condições de anaerobiose. Portanto, para a identificação das bactérias presentes na MI se faz necessário o uso de técnicas baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA (região altamente conservada com nove locais que são suficientes para diferenciar várias espécies bacterianas), identificando-as filogeneticamente e quantificando o número de genes presentes (38,39).

As sequências de uma ou mais das nove regiões variáveis do gene 16S rRNA são quantificadas, seguido por comparação com os bancos de dados de sequências bacterianas conhecidos e subsequentemente atribuídos a filogenias microbianas (40,41). A maioria dos pesquisadores agrupa sequências desses genes, que compartilham de 97 a 99% de identidade, na

mesma *Operational Taxonomic Unit* (OTU), que representa um *cluster* de sequências em nível de espécie ou filo (42). Para avaliar a similaridade de comunidades bacterianas é utilizada a análise UniFrac, que se baseia na premissa de que comunidades semelhantes compartilham uma fração maior da árvore filogenética geral (42).

Indivíduos que apresentam maior riqueza de genes bacterianos exibem fenótipos mais saudáveis, já indivíduos com baixa diversidade bacteriana abrigam uma MI associada à inflamação, por uma redução de bactérias produtoras de butirato (ácido graxo de cadeia curta - AGCC), e um aumento do potencial para gerar estresse oxidativo, entre outros fatores (31,43). A "hipótese do desaparecimento do microbioma" está relacionada a taxas mais altas de doenças crônicas, principalmente em países desenvolvidos (33-36). Essa perda de diversidade pode estar ligada a uma dieta rica em gordura, açúcar refinado e pobre em fibras (44). Para avaliar a riqueza bacteriana são utilizados os índices Chao-1 e Shannon. Chao-1 é uma medida de riqueza total e é particularmente útil devido a variância válida que pode ser usada para calcular intervalos de confiança (45,46). Já o índice de Shannon reflete o número de espécies e a uniformidade da abundância de espécies (47).

A MI saudável deve ser avaliada por seu comportamento ao longo do tempo, devendo apresentar certo grau de resiliência a alterações externas (por exemplo, dietéticas ou farmacêuticas) ou internas (por exemplo, relacionadas à idade) (48,49). Mesmo que uma estrutura comunitária específica fornecesse todas as funções essenciais necessárias, sem essa resiliência, não se garantiria suas funções por muito tempo (48,49). Outras

características de uma MI saudável é a estabilidade e diversidade (50), que associadas à resistência ao estresse e à perturbação e sua capacidade de recuperar um perfil funcional saudável, estão entre as propriedades potenciais que caracterizam uma MI saudável (48,50).

Segundo Lloyd-Price et al, 2016 (51) muitos estudos se concentram na doença, porém seria interessante uma melhor compreensão da MI saudável para o desenvolvimento de novos diagnósticos e terapias da comunidade microbiana. A descoberta de características específicas da MI que podem distinguir microbiomas saudáveis de não-saudáveis ajudaria no diagnóstico de doenças relacionadas à MI e poderia potencialmente fornecer novos meios para prevenir o aparecimento de doenças ou melhorar o prognóstico (51,52).

A MI está em constante alteração, ganhando e perdendo espécies ao longo do tempo, com diferentes taxas, apresentando diferentes estabilidades, entretanto algumas bactérias permanecem no intestino por muitos anos (49). Além da variabilidade interindividual, as diferenças de perfil de microorganismos no intestino podem ser refletidas pelo padrão da dieta de cada indivíduo ou comunidade e também pela localização geográfica (53). Um estudo comparou a MI de indivíduos de três continentes: Europeu, Americano e Chinês e constatou que a variação entre países na composição taxonômica excedia significativamente as variações interpessoais (54), além disso, não se pode descartar outros fatores que levam as diferenças na MI como exposições na infância e genética (54,55).

Apesar do perfil funcional da MI ser estabelecido desde o início da vida e ter uma tendência de permanecer estável, algumas características individuais podem alterar essa estabilidade (56).

Indivíduos com obesidade e/ou pré-diabetes exibem um padrão diferente de MI em comparação a indivíduos eutróficos, como por exemplo diminuição na abundância do filo Bacteroidetes e aumento de Firmicutes ou ainda especificamente em indivíduos com pré-diabetes e DM2, diminuição na abundância de uma bactéria que coloniza o muco, *Akkermansia muciniphila* (20,21,24,57,58). Acredita-se que a MI desses indivíduos esteja em estado de disbiose, que consiste em alterações na homeostase do microbioma, podendo ser representada pela mudança no número ou diversidade da MI que, pode estar relacionada a certas doenças e condições de saúde, porém não está claro se a disbiose é a causa ou efeito da patologia (59-62).

A associação entre disbiose da MI e obesidade leva ao comprometimento do controle glicêmico, podendo desencadear pré-diabetes e DM2 (63,64). A disbiose da comunidade microbiana intestinal pode levar a um processo inflamatório através da quebra da integridade da barreira intestinal, alterando a expressão de algumas proteínas e aumentando a permeabilidade dessa barreira (65-67). Esse processo leva à translocação de fragmentos da parede celular de bactérias gram negativas, os lipopolissacarídeos (LPS), que são os principais responsáveis pelo processo denominado Endotoxemia Metabólica, também conhecido como inflamação de baixo grau (65-67).

O LPS é considerado um gatilho para a resistência à insulina aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de um receptor denominado *toll-like receptor 4* (TLR-4), que induz o *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) das células epiteliais gastrointestinais, desencadeando inflamação sistêmica, ativação de macrófagos do tipo M1 e infiltração desses no tecido adiposo visceral (68-70). Esse processo contribui para o aumento do estado inflamatório já instalado pelo LPS, com aumento de *tumoral necrosis factor alfa* (TNF- α), interleucinas, como a IL-6, leptina, resistina e proteína C reativa, levando a subsequente resistência à insulina (68-70).

Hábitos alimentares também podem levar ao processo de disbiose, desencadeando inflamação de baixo grau. Uma dieta rica em gordura e gordura saturada pode aumentar a proporção de bactérias que expressam LPS, além de aumentar a permeabilidade da barreira intestinal, levando ao aumento de LPS plasmático, ou seja, à Endotoxemia Metabólica (18,71).

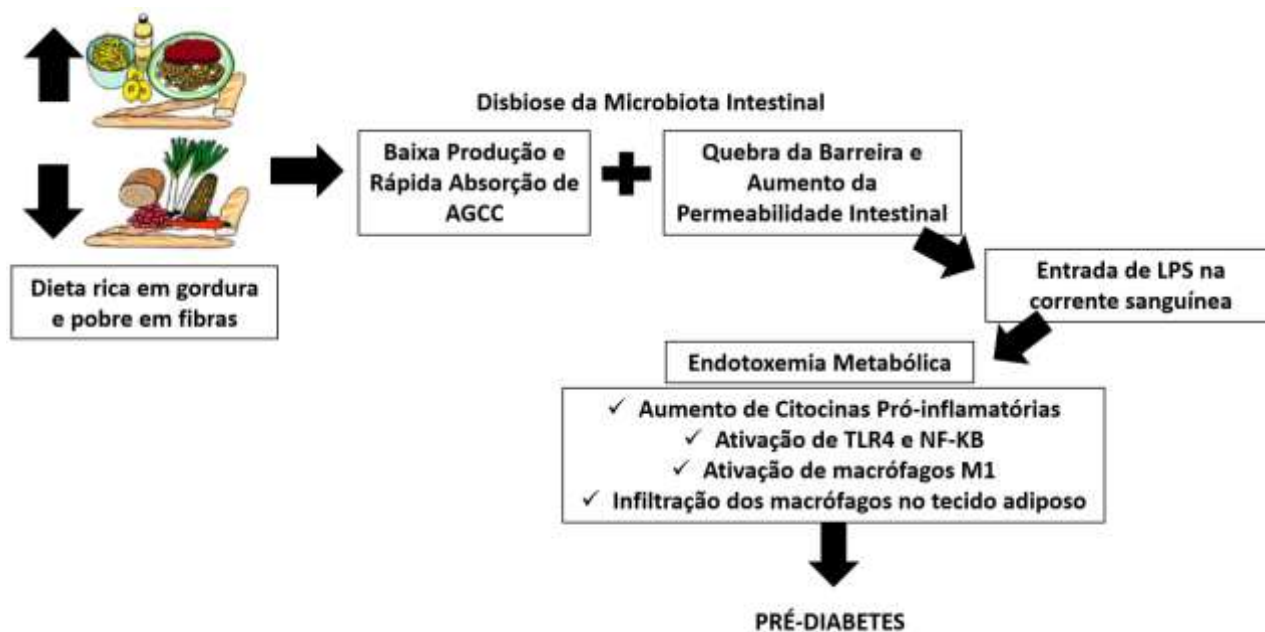


Figura 2. Associação entre disbiose da microbiota intestinal e pré-diabetes (autoria própria).

No estado de hiperinsulinemia há alteração no perfil da MI, caracterizada por diminuição de bactérias produtoras de butirato, como *Roseburia* e *Faecalibacterium prauznitzii* (24,72). O butirato é um AGCC gerado pela fermentação microbiana que pode ser absorvido e utilizado como fonte de energia pelo hospedeiro (73). Os AGCC predominantemente gerados pela MI são o acetato, butirato e propionato, que são facilmente absorvidos pelos colonócitos (74). Uma quantidade significativa de acetato entra na circulação sistêmica e atinge os tecidos periféricos, enquanto o butirato e o propionato são amplamente utilizados pelo epitélio colônico e pelo fígado, respectivamente (74).

Intervenções que objetivam manipular a MI para o tratamento de uma disbiose nem sempre faz com que o indivíduo volte ao seu estado inicial em relação ao perfil das bactérias intestinais, mas muitas vezes essas

intervenções colaboram para um estado saudável (75). Manter o equilíbrio da MI no estágio pré-diabético pode ser uma estratégia interessante para retardar o desenvolvimento do DM2. Uma das formas de se fazer isso seria a modulação da dieta (24). Apesar de outros fatores como idade e genética poderem influenciar a composição da MI, a dieta é mais fácil de ser modificada e apresenta o caminho mais simples para intervenções terapêuticas (55,75).

1.3 Polifenóis

O consumo de polifenóis seria uma opção de intervenção dietética para a melhoria da MI devido ao seu comprovado potencial de modular as comunidades de bactérias intestinais (76). Os polifenóis são metabólitos secundários encontrados em abundância em uma ampla variedade de alimentos, como frutas, legumes, ervas, sementes e cereais, e em bebidas, como café, chá, cacau e vinho (76). Possuem ampla gama de atividades promotoras de saúde, como anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica, antiadipogênica, antidiabética e neuroprotetora, sugerindo, com isso, uma associação entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis e um risco reduzido de várias doenças crônicas, inclusive o pré-diabetes (77-83).

Nos alimentos, a maioria dos polifenóis são encontrados como polímeros ou em formas glicosiladas, o que afeta sua solubilidade em água e funcionalidade (83). Podem ser agrupados em flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides têm como estrutura primária dois anéis de benzeno, A e B, conectados através de um anel C de pirona heterogêneo (figura 3) (84).

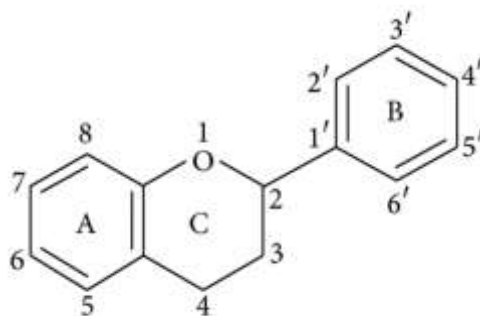


Figura 3. Estrutura geral do flavonoide (85).

Com base na diferença da estrutura genérica do anel C, nos grupos funcionais dos anéis e a posição em que o anel B está ligado ao anel C, os flavonoides podem ser classificados em seis subgrupos: antocianidinas, flavan-3-ols, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonas (86,87).

A classe mais comum de flavonoides encontrados em frutas cítricas são as flavanonas Hesperidina, Naringina e Eriocitrina, podendo estar presentes nas formas agliconas ou glicosídicas, relacionadas à ausência ou presença do carboidrato no anel A, respectivamente (88).

A flavanona Eriocitrina (eriodictiol 7-O- β -rutinosídeo) é encontrada principalmente na casca do limão siciliano e da lima, e vários estudos mostram sua ação antioxidante (89-91). Este efeito antioxidante está implícito na descoberta de outras propriedades como atividade antidiabética (92,93), anticâncer (94), hipolipemiante (95,96) e antiesteatose (97). A maioria dos estudos apontam como função primordial da Eriocitrina sua eficiência contra peroxidação lipídica (92,95,97,98). Trabalho prévio realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que a suplementação de Eriocitrina por 12 semanas em indivíduos pré-diabéticos reduziu em 5% os níveis glicêmicos, mostrando

assim, efeitos positivos dessa flavanona no metabolismo glicídico (99). Esse é o único estudo clínico encontrado atualmente na literatura.

A tabela 1 aponta alguns estudos utilizando modelo animal ou ensaios *in vitro* realizados com Eriocitrina e seus principais desfechos.

Tabela 1. Estudos realizados com Eriocitrina e seus principais desfechos.

ESTUDO	MODELO EXPERIMENTAL	DOSE ERIOCITRINA	TEMPO	PRINCIPAIS RESULTADOS
Guo et al, 2019 (100)	Camundongos	30 mg/kg	8 dias	O tratamento com eriocitrina apresentou efeito anti-inflamatório e antioxidante nos camundongos induzidos à doença inflamatória intestinal.
Wang et al, 2016 (101)	Células de hepatocarcinoma humano	n.d.	24 h	O tratamento com eriocitrina inibiu proliferação de células de carcinoma hepatocelular, interrompendo o ciclo celular na fase S e induzindo apoptose.
Hiramitsu et al, 2014 (97)	Peixe Zebrafish e Células de Hepatocarcinoma humano	2 mg / 30 µM	4 semanas / 48 hs / 2 dias	O tratamento com eriocitrina ativou a biogênese mitocondrial <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , o que resultou em um efeito protetor contra a esteatose hepática induzida por dieta rica em gordura.
Miyake et al, 2006 (96)	Ratos	0,35% e 0,70%	3 semanas	O tratamento com eriocitrina apresentou efeito redutor dos lipídios séricos como colesterol total, VLDL + LDL, triglicerídeos e fosfolipídios.
Minato et al, 2003 (98)	Ratos	600 mg / kg	Agudo	O tratamento com eriocitrina preveniu a peroxidação lipídica causada pelo exercício.
Miyake et al, 2000 (102)	Ratos	75 µmol / kg	Agudo	O tratamento com eriocitrina apresentou atividade antioxidante contra peroxidação lipídica.
Miyake et al, 1998 (92)	Ratos	0,2%	27 dias	O tratamento com eriocitrina diminuiu os níveis de triglicérides e apresentou efeito antioxidante.

Em relação ao metabolismo da Eriocitrina, após ingerida, pequena parte é diretamente absorvida pelo intestino delgado, enquanto que a maior parte é transferida para o intestino grosso, onde sofre ação das enzimas α -rhamnosidases e β -glucosidase produzidas pelas bactérias da MI (102). A Eriocitrina é hidrolisada em Eriodictiol sendo posteriormente convertido em 3,4-Ácido Diidroxihidrocinâmico (3,4- DHCA) (102).

O Eriodictiol pode ser absorvido pelo intestino e transportado por meio da veia porta até o fígado ou ainda ser degradado na MI em Ácido 3- (3', 4'-dihidroxifenil) Propiônico, que sofre desidroxilação formando um isômero do Ácido Hidroxifenilpropiônico - o ácido Fenilpropiônico, que é o principal produto fenólico final (102,103).

Quando transportado para o fígado, ocorre o processo de metilação dos grupos hidroxil, transformando parte do Eriodictiol em Homoeriodictiol e Hesperitina. Ainda no fígado, a enzima UDP-glicuronil transferase é responsável pela conjugação dos metabólitos, processo em que é adicionado ácido glucurônico e/ou ácido sulfúrico fazendo com que se tornem mais polares (96).

Após deixar o fígado, os metabólitos (Eriodictiol, Homoeriodictiol e Hesperitina) conjugados, podem seguir dois caminhos: através da bile chegar ao intestino delgado onde são absorvidos ou excretado nas fezes, ou são encaminhados até o rim, onde parte dos metabólitos são desconjugados sendo excretados na sua forma livre e conjugada (102).

A figura 4 ilustra o metabolismo da Eriocitrina.

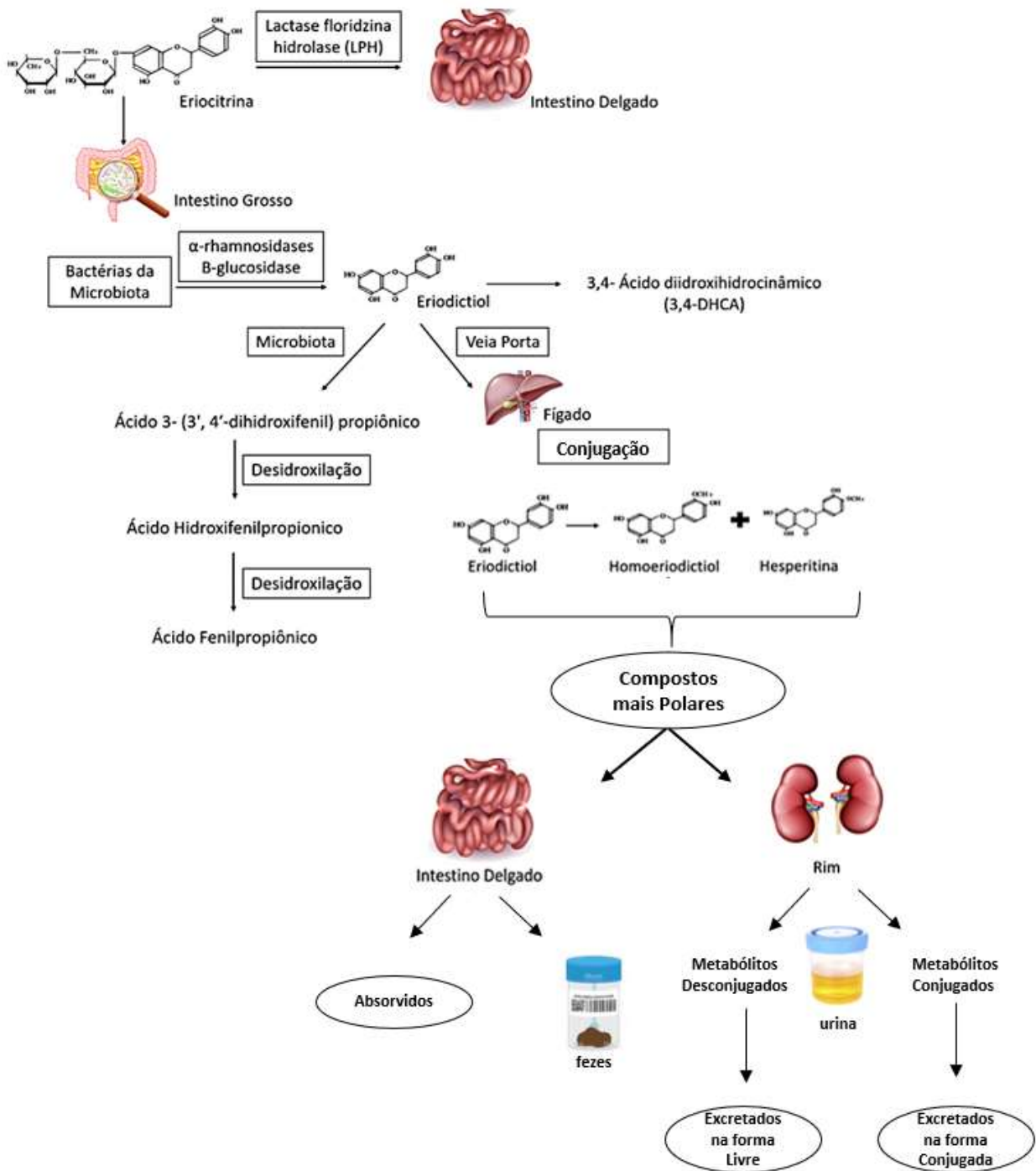


Figura 4. Metabolismo da Eriocitrina (adaptado de Miyake et al, 2006, Miyake et al, 2000 e Mosele et al, 2014) (96,102,103).

A análise dos metabólitos da Eriocitrina no plasma e urina apontam que quatro horas após sua ingestão, seus metabólitos podem ser encontrados em sua forma conjugada no plasma. Já na urina de 24 horas, esses metabólitos são encontrados em sua forma conjugada e não conjugada (102).

Como os demais polifenóis dos alimentos, a Eriocitrina é degradada pelas bactérias intestinais no seu metabólito Eriodictiol antes de ser absorvida e alcançar os tecidos alvos onde vai exercer diferentes funções. Assim, a Eriocitrina fornece nutrientes e energia para as bactérias intestinais e concomitante reduz o estado de disbiose do pré-diabetes. Baseados nesses fatos, a hipótese desse estudo é que a suplementação de Eriocitrina modula MI dos indivíduos pré-diabéticos reduzindo a disbiose dessa condição. Conseqüentemente, a redução da disbiose levaria à modificações benéficas nos parâmetros bioquímicos com possível reversão do pré-diabetes.

1. Referências bibliográficas

1. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019.
2. SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Editora Clannad, 2019.
3. International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas. 2019. Disponível em <https://www.diabetesatlas.org/en/>.
4. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012; 379(9833): 2279–90. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60283-9.
5. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest*. 1988; 81(2): 435–41. doi: 10.1172/JCI113338.
6. DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009; 58(4): 773–95. doi: 10.2337/db09-9028.
7. Ferrannini E, Balkau B, Coppack SW, Dekker JM, Mari A, Nolan J, et al. Insulin resistance, insulin response, and obesity as indicators of metabolic risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(8): 2885–92. doi: 10.1210/jc.2007-0334.
8. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA. Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: Results from the San Antonio metabolism (SAM) study. *Diabetologia*. 2004; 47(1): 31–9. doi: 10.1007/s00125-003-1263-9.
9. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of β -cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006; 29(5): 1130–9. doi: 10.2337/diacare.2951130.
10. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52(1): 102–10. doi: 10.2337/diabetes.52.1.102.
11. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009; 373(9682): 2215–21. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60619-X
12. Weir GC, Bonner-Weir S. Five of stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004; 53 (Suppl.3:S16-21). doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s16.
13. Mason CC, Robert L. Hanson WCK. Progression to Type 2 Diabetes Characterized by Moderate Then Rapid Glucose Increases. *Diabetes*. 2007; 56(8): 2054-61. doi: 10.2337/db07-0053.
14. Brannick B, Wynn A, Dagogo-Jack S. Prediabetes as a toxic environment for the initiation of microvascular and macrovascular complications. *Exp Biol Med*. 2016; 241(12): 1323–31. doi: 10.1177/1535370216654227.
15. Gérard C, Vidal H. Impact of gut microbiota on host glycemic control. *Front Endocrinol*. 2019; 10(29): 1–13. doi: 10.3389/fendo.2019.00029.
16. Bansal N. Prediabetes diagnosis and treatment: A review. *World J Diabetes*. 2015; 6(2): 296-303. doi: 10.4239/wjd.v6.i2.296.

17. Matos LN, Giorelli G de V, Dias CB. Correlation of anthropometric indicators for identifying insulin sensitivity and resistance. *Sao Paulo Med J.* 2011;129(1):30–5. doi: 10.1590/s1516-31802011000100006.
18. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions Between Gut Microbiota and Host Metabolism Predisposing to Obesity and Diabetes. *Annu Rev Med.* 2011; 62:361–80. doi: 10.1146/annurev-med-012510-175505.
19. Hajiaghaalipour F, Khalilpourfarshbafi M, Arya A. Modulation of Glucose Transporter Protein by Dietary Flavonoids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Biol. Sci.* 2015; 11(5): 508-24. doi: 10.7150/ijbs.11241.
20. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*; 2013; 498(7452):99–103. doi: 10.1038/nature12198.
21. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085.
22. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*; 2012; 490(7418): 55–60. doi: 10.1038/nature11450.
23. Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abeet H, et al. Gut dysbiosis and detection of “live gut bacteria” in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2014; 37:2343–50. doi: 10.2337/dc13-2817.
24. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71108. doi: 10.1371/journal.pone.0071108.
25. Singh RS, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017;15(1): 73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
26. Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population. *Int J Obes (Lond).* 2013; 37(2): 216–23. doi: 10.1038/ijo.2012.33.
27. Keim NL, Martin RJ. Dietary whole grain–microbiota interactions: insights into mechanisms for human health. *Adv Nutr.* 2014; 5(5):556–7. doi: 10.3945/an.114.006536.
28. Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J.* 2013; 7(2):269–80. doi: 10.1038/ismej.2012.104.
29. Kim MS, Hwang SS, Park EJ, Bae JW. Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environ Microbiol Rep.* 2013; 5(5):765–75. doi: 10.1111/1758-2229.12079.
30. Blaut M, Clavel T. Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease. *J Nutr.* 2007; 137(3): 751S-5S. doi: 10.1093/jn/137.3.751S.

31. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012; 486(7402): 215–21.
32. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486(7402): 207–14. doi: 10.1038/nature11234.
33. Kalinkovich A, Livshits G. A cross talk between dysbiosis and gut-associated immune system governs the development of inflammatory arthropathies. *Semin Arthritis Rheum*. 2019; 49(3): 474–84. doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.05.007.
34. Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*. 1974; 27(5): 961–79. PMID: PMC380185.
35. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(11): 4799–807. doi: 10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999.
36. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J*. 2016; 92(1087): 286–300. doi: 10.1136/postgradmedj-2015-133285.
37. Van De Wiele T, Van Praet JT, Marzorati M, Drennan MB, Elewaut D. How the microbiota shapes rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12(7): 398–411. doi: 10.1038/nrrheum.2016.85.
38. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe*. 2008; 3(6): 417–27. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.001.
39. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009; 19(12): 2317–23. doi: 10.1101/gr.096651.109.
40. Neefs JM, Van De Peer Y, De Rijk P, Chapelle S, de Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21(13): 3025–49. doi: 10.1093/nar/21.13.3025.
41. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015; 31(1): 69–75. doi: 10.1097/MOG.000000000000139
42. Lozupone C, Knight R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8228–35. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
43. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013; 500(7464): 541–6. doi: 10.1038/nature12506.
44. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinction in the gut microbiota compounds over generations. 2016; 529(7585): 212–5. doi: 10.1038/nature16504.
45. Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*. 1987;43(4): 783-91. <https://doi.org/10.2307/2531532>.

46. Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005; 54(2):219-31. doi: 10.1016/j.femsec.2005.03.012.
47. Guinane CM, Tadrous A, Fouhy F, Ryan CA, Dempsey EM, Murphy B, et al. Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *MBio.* 2013; 4(1):e00366-12. doi:10.1128/mBio.00366-12.
48. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe.* 2012; 12(5): 611–22. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.012
49. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science.* 2013; 341(6141): 1237439. doi: 10.1126/science.1237439.
50. Bodelier PL. Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. *Front Microbiol.* 2011; 2:80. doi: 10.3389/fmicb.2011.00080.
51. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1): 51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
52. Börnigen D, Morgan XC, Franzosa EA, Ren B, Xavier RJ, Garrett WS, et al. Functional profiling of the gut microbiome in disease-associated inflammation. *Genome Med.* 2013; 5(65): 1–13. doi: 10.1186/gm469.
53. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 2011; 334(6052): 105–8. doi: 10.1126/science.1208344.
54. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(8): 834–41. doi: 10.1038/nbt.2942.
55. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM Jr, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe.* 2015; 17(1): 72–84. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.010.
56. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Peet A, Tillmann V, et al. The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression towards Type 1 Diabetes. *Cell Host Microbe.* 2015; 17(2): 260–73. doi: 10.1016/j.chom.2015.01.001.
57. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in lactobacillus in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS ONE.* 2009; 23(4): e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125.
58. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009; 457(7228): 480-4. doi: 10.1038/nature07540.
59. Remely M, Dworzak S, Hippe B, Zwielehner J, Aumüller E, Brath H, et al. Abundance and diversity of microbiota in type 2 diabetes and obesity. *J Diabetes Metab.* 2013; 4:3. doi: 10.4172/2155-6156.1000253.
60. Lambeth SM, Carson T, Lowe J, Ramaraj T, Leff JW, Luo L, et al. Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes.* 2015; 2(3): 1–7. doi: 10.15436/2376-0949.15.031.

61. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(31):11070–5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
62. Kim A. Dysbiosis a review highlighting obesity and inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2015; 49(Suppl 1):S20–4. doi: 10.1097/MCG.0000000000000356.
63. Aydin Ö, Nieuwdorp M, Gerdes V. The gut microbiome as a target for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2018; 18(8): 55. doi: 10.1007/s11892-018-1020-6.
64. Harsch IA, Konturek PC. The role of gut microbiota in obesity and type 2 and type 1 diabetes mellitus: new insights into “Old” diseases. *Med Sci*. 2018; 6(2):32. doi: 10.3390/medsci6020032.
65. Burcelin R. Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease. *Mol. Metab*. 2016; 5(9): 771–81. doi: 10.1016/j.molmet.2016.05.016.
66. Gomes JMG, Costa JA.; Alfenas RCG. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism*. 2017; 68: 133–144. doi: 10.1016/j.metabol.2016.12.009.
67. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handb. Exp. Pharmacol*. 2012; (209): 251–73. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3_11.
68. Neyrinck AM, Schüppel VL, Lockett T, Haller D, Delzenne NM. Microbiome and metabolic disorders related to obesity: Which lessons to learn from experimental models. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;57(8): 256–64. doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.012.
69. Torres S, Fabersani E, Marquez A, Gauffin-Cano P. Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. *European Journal of Nutrition*. 2018; 58(1): 27-43. doi: 10.1007/s00394-018-1790-2.
70. Zhi C, Huang J, Wang J, Cao H, Bai Y, Guo J, et al. Connection between gut microbiome and the development of obesity. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019; 38(11):1987–98. doi: 10.1007/s10096-019-03623-x.
71. Neves AL, Coelho J, Couto L, Leite-Moreira A, Roncon-Albuquerque R. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J Mol Endocrinol*. 2013; 51(2): R51–64. doi: 10.1530/JME-13-0079.
72. de Vos WM, Nieuwdorp M. Genomics: A gut prediction. *Nature*. 2013; 498(7452): 48–9. doi: 10.1038/nature12251.
73. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 2013; 34(1): 39–58. doi: 10.1016/j.mam.2012.11.001.
74. Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. 2012; 7(4): e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.
75. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. 2006; 312(5778):1355–1359. doi: 10.1126/science.1124234.
76. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(11):5315–21. doi: 10.1021/jf0009293.

77. Jennings A, Welch AA, Fairweather-Tait SJ, Kay C, Minihane AM, Chowienczyk P, et al. Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(4): 781–8. doi: 10.3945/ajcn.112.042036.
78. Cassidy A, O'Reilly ÉJ, Kay C, Sampson L, Franz M, Forman JP, et al. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(2): 338–47. doi: 10.3945/ajcn.110.006783.
79. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(3): 740–51. doi: 10.3945/ajcn.111.023457.
80. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Valderas-Martinez P, Casas R, Arranz S, et al. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: A randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2013; 32(2): 200–6. doi: 10.1016/j.clnu.2012.08.022.
81. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Arranz S, Valderas-Martínez P, Casas R, et al. Dealcoholized red wine decreases systolic and diastolic blood pressure and increases plasma nitric oxide: Short communication. *Circ Res.* 2012; 111(8):1065–8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.275636.
82. Zamora-Ros R, Agudo A, Luján-Barroso L, Romieu I, Ferrari P, Knaze V, et al. Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(6): 1398–408. doi: 10.3945/ajcn.112.037358. doi: 10.3945/ajcn.112.037358.
83. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(4): 1365–402. doi: 10.3390/ijms11041365.
84. Vollmer M, Esders S, Farquharson FM, Neugart S, Duncan SH, Schreiner M, et al. Mutual Interaction of Phenolic Compounds and Microbiota: Metabolism of Complex Phenolic Apigenin-C- and Kaempferol-O-Derivatives by Human Fecal Samples. *J Agric Food Chem.* 2018;66(2): 485–97. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04842.
85. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J.* 2013; 29:162750. doi: 10.1155/2013/162750.
86. Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr.* 2003;133(10): 3248S-3254S. doi: 10.1093/jn/133.10.3248S.
87. Castellano G, González-Santander JL, Lara A, Torrens F. Classification of flavonoid compounds by using entropy of information theory. *Phytochemistry.* 2013; 93: 182–91. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.03.024.
88. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727–47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
89. Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Isolation of Eriocitrin (Eriodictyol 7-rutinoside) from Lemon Fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and Its Antioxidative Activity. *Food Sci Technol Int Tokyo.* 1997; 3(1): 84–9. <https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.3.84>.

90. Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T. Isolation of C-Glucosylflavone from Lemon Peel and Antioxidative Activity of Flavonoid Compounds in Lemon Fruit. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(12): 4619–23. <https://doi.org/10.1021/jf970498x>.
91. Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T. Characteristics of Antioxidative Flavonoid Glycosides in Lemon Fruit. *Food Sci Technol Int Tokyo*. 1998; 4(1): 48–53. <https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.4.48>.
92. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*. 1998; 33(7): 689–95. doi: 10.1007/s11745-998-0258-y.
93. Tanaka T, Oka T, Shimada Y, Umemoto N, Kuroyanagi J, Sakamoto C, et al. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: Pharmacogenomic network of cardiovascular disease models. *J Pharmacol Sci*. 2008; 107(1): 8–14. doi: 10.1254/jphs.08r03fm.
94. Li L, Feng X, Chen Y, Li S, Sun Y, Zhang L. A comprehensive study of eriocitrin metabolism in vivo and in vitro based on an efficient UHPLC-Q-TOF-MS/MS strategy. *RSC Adv*. 2019;9(43):24963–80. doi: 10.1039/C9RA03037A.
95. Hajimahmoodi M, Moghaddam G, Mousavi SM, Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B. Total antioxidant activity, and hesperidin, diosmin, eriocitrin and quercetin contents of various lemon juices. *Trop J Pharm Res*. 2014; 13(6): 951–6. doi: 10.4314/tjpr.v13i6.18.
96. Miyake Y, Suzuki E, Ohya S, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, et al. Lipid-lowering effect of eriocitrin, the main flavonoid in lemon fruit, in rats on a high-fat and high-cholesterol diet. *J Food Sci*. 2006; 71(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00192.x>.
97. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, Inoue T, Katagiri T, Zang L, et al. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci Rep*. 2014;4: 3708. doi: 10.1038/srep03708.
98. Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, et al. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci*. 2003; 72(14): 1609–16. doi: 10.1016/s0024-3205(02)02443-8.
99. Ribeiro CB, Ramos FM, Manthey JA, Cesar TB. Effectiveness of Eriomin® in managing hyperglycemia and reversal of prediabetes condition: A double-blind, randomized, controlled study. *Phytother Res*. 2019; 33(7):1921-1933. doi: 10.1002/ptr.6386.
100. Guo G, Shi W, Shi F, Gong W, Li F, Zhou G, et al. Anti-inflammatory effects of eriocitrin against the dextran sulfate sodium–induced experimental colitis in murine model. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019; 33(11): e22400. <https://doi.org/10.1002/jbt.22400>.
101. Wang Z, Zhang H, Zhou J, Zhang X, Chen L, Chen K, et al. Eriocitrin from lemon suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells through inducing apoptosis and arresting cell cycle. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 78(6): 1143–50. doi: 10.1007/s00280-016-3171-y.
102. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinoshita N, Osawa T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of Eriocitrin-treated rats. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(8): 3217–24. doi: 10.1021/jf990994g.

103. Mosele JI, Martín-Peláez S, Macià A, Farràs M, Valls RM, Catalán U, et al. Study of the catabolism of thyme phenols combining in vitro fermentation and human intervention. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(45): 10954-61. doi: 10.1021/jf503748y.

CAPÍTULO 1

Efetividade da suplementação com Eriocitrina na microbiota intestinal de indivíduos pré-diabéticos: efeito da disbiose e dos ácidos graxos saturados da dieta.

Efetividade da suplementação com Eriocitrina na microbiota intestinal de indivíduos pré-diabéticos: efeito da disbiose e dos ácidos graxos saturados da dieta.

Fernanda M. M. Ramos¹, Carolina B. Ribeiro², Lucélia Cabral³, Dragan⁴ Milenkovic, Kátia Siviere¹, Thais B. Cesar¹

1 Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

2 Unibras - Faculdade de Rio Verde, Rio Verde.

3 Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

4 Departamento de Nutrição, Segurança Química dos Alimentos e Comportamento do Consumidor, Instituto Nacional de Agricultura, Alimentação e Meio Ambiente da França (INRAE).

Resumo

O pré-diabetes é uma condição na qual os níveis glicêmicos estão alterados, porém não se enquadram nos valores relacionados ao diabetes. Diversas alterações caracterizam essa condição e a disbiose da microbiota intestinal é uma delas. Uma das formas de modular a disbiose, com o intuito de reestabelecer uma microbiota saudável, com possível impacto nos parâmetros bioquímicos é a suplementação de flavonoides, dentre eles a Eriocitrina que é uma flavanona encontrada em frutas cítricas e a grande maioria dos estudos apontam para suas propriedades antioxidantes, porém há evidências no controle glicêmico após seu consumo. O objetivo desse estudo foi avaliar se a suplementação de Eriocitrina em pacientes pré-diabéticos por 12 semanas alterou significativamente a microbiota intestinal desses indivíduos refletindo nos parâmetros bioquímicos, principalmente glicêmicos. Foram selecionados 45 indivíduos que receberam Eriocitrina ou Placebo, e para a análise dos resultados, foi realizada uma subdivisão do grupo que suplementou Eriocitrina, entre os que responderam à suplementação, com diminuição da glicemia de jejum, chamado Respondedores e os que não responderam à suplementação, ou seja, que não apresentaram diminuição na glicemia de jejum, chamado de Não Respondedores. As avaliações foram realizadas no início e final do estudo, dentre elas, Avaliação Bioquímica, Avaliação Antropométrica, Avaliação Dietética e Análise da Microbiota Intestinal em relação à abundância relativa das bactérias e à concentração de ácidos graxos de cadeia curta, através das fezes coletadas também nesses dois momentos. Foram observadas alterações iniciais na microbiota intestinal dos três grupos analisados (Respondedores, Não Respondedores e Controle). Os grupos estudados apresentaram microbiota intestinal semelhantes no baseline, com predomínio do filo Firmicutes e de bactérias relacionadas à inflamação como *Lachnospiraceae* e *Blautia*, indicando disbiose intestinal. Ainda no período basal, foi observado abundância relativa maior do gênero *Coprococcus* no grupo Respondedores em relação ao grupo Não Respondedores e a família *Streptococcaceae* apresentou abundância relativa maior no grupo Respondedores em relação ao grupo Controle. Após a suplementação de Eriocitrina, houve aumento do gênero *Coprococcus* e diminuição da família *Clostridiaceae* no grupo Não Respondedores. Entre os Respondedores foi detectado aumento na proporção de *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* e redução de *Lactobacillus*. Apesar da suplementação de Eriocitrina ou Placebo ter refletido em poucos efeitos na microbiota intestinal de indivíduos pré-diabéticos, as discretas alterações ocorridas em algumas famílias e gêneros, foram observadas apenas entre os grupos que suplementaram Eriocitrina. As características da dieta, com alta concentração de gordura saturada, foi o ponto crucial para os resultados poucos evidentes.

Palavras-Chave: flavonoides cítricos; pré-diabetes; bactérias intestinais.

Abstract

Pre-diabetes is a condition in which blood glucose levels are altered, but do not fit the values related to diabetes. Several changes characterize this condition and dysbiosis of the intestinal microbiota is one of them. One of the ways to modulate dysbiosis, in order to reestablish a healthy microbiota, with a possible impact on biochemical parameters, is the supplementation of flavonoids, among them Eriocitrin which is a flavanone found in citrus fruits and the great majority of studies point to its antioxidant properties, however there is evidence on glycemic control after consumption. The aim of this study was to evaluate whether the supplementation of Eriocitrin in pre-diabetic patients for 12 weeks significantly altered the intestinal microbiota of these individuals, reflecting in the biochemical parameters, mainly glycemic. Forty-five individuals were selected who received Eriocitrin or Placebo, and for the analysis of the results, a subdivision of the group that supplemented Eriocitrin was performed, between those who responded to the supplementation, with a decrease in fasting glucose, called Responders and those who did not respond to the supplementation, that is, they did not present a decrease in fasting glycemia, called Non-Responders. The evaluations were carried out at the beginning and end of the study, including Biochemical Assessment, Anthropometric Assessment, Dietary Assessment and Analysis of the Intestinal Microbiota in relation to the relative abundance of bacteria and the concentration of short chain fatty acids, through the feces collected also in these two moments. Initial changes were observed in the intestinal microbiota of the three groups analyzed (Responders, Non-Responders and Controls). The studied groups presented similar intestinal microbiota in the baseline, with a predominance of the phylum Firmicutes and inflammation-related bacteria such as *Lachnospiraceae* and *Blautia*, indicating intestinal dysbiosis. Still in the basal period, a greater relative abundance of the *Coprococcus* genus was observed in the Responders group in relation to the Non-Responders group and the *Streptococcaceae* family showed a greater relative abundance in the Responders group in relation to the Control group. After Eriocitrin supplementation, there was an increase in the *Coprococcus* genus and a decrease in the *Clostridiaceae* family in the Non-Responders group. Among the Responders, an increase in the proportion of *Coriobacteriaceae*, Ruminococcaceae and a reduction in *Lactobacillus* was detected. Although Eriocitrin or Placebo supplementation reflected in few effects on the intestinal microbiota of pre-diabetic individuals, the discreet changes that occurred in some families and genders were observed only between the groups that supplemented Eriocitrin. The characteristics of the diet, with a high concentration of saturated fat, was the crucial point for the less evident results

Key-words: citrus flavonoids; pre-diabetes; intestinal bacteria.

Introdução

Pré-diabéticos são indivíduos que não possuem parâmetros glicêmicos relacionados ao diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), mas são parâmetros elevados para serem considerados normais (1). De acordo com a American Diabetes Association (ADA), 2019, indivíduos pré-diabéticos apresentam glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL (5,6 - 6,9 mmol/L), tolerância à glicose diminuída, entre 140 e 199 mg/dL (7,8 - 11 mmol/L), identificada pelo teste oral de tolerância à glicose, após 2 horas de ingestão de 75 g de glicose e, hemoglobina glicada A1c (HbA1c) entre 5,7 e 6,4% (1). O pré-diabetes está associado à obesidade, principalmente visceral e também a um perfil disbiótico da microbiota intestinal (MI) (1,2). A disbiose consiste na diminuição da abundância de bactérias na MI, além de mudanças em outros fatores, como resistência, resiliência, estabilidade, diversidade e diminuição de bactérias produtoras de butirato, um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) (3,4).

Em relação à abundância de bactérias, alguns estudos relatam que indivíduos com sobrepeso e pré-diabetes apresentam proporções reduzidas de membros do filo Bacteroidetes e aumento de membros do filo Firmicutes em relação aos indivíduos eutróficos (5-10). A disbiose pode ser um gatilho para o desenvolvimento de Endotoxemia Metabólica, que consiste em uma inflamação causada pela disbiose da MI e ocorre através da translocação de fragmentos da parede celular de bactérias gram negativas, denominados lipopolissacarídeos (LPS) (11-15). O LPS, principal responsável pelo processo de Endotoxemia Metabólica, atravessa a barreira intestinal, devido ao aumento da permeabilidade causada pela disbiose, levando à secreção de citocinas pró-

inflamatórias, que ativam um receptor chamado *Toll-like receptor 4* (TLR-4) e o *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) das células epiteliais, desencadeando assim, inflamação sistêmica (11-15).

O processo inflamatório desencadeado pelo LPS, ativa os macrófagos do tipo M1, que entram no tecido adiposo visceral, agravando o estado inflamatório já instalado, através do aparecimento de componentes também responsáveis pela inflamação: *tumor necrosis factor α* (TNF- α), interleucinas (como IL-6), leptina, resistina e proteína C reativa (PCR). Todo esse processo é um dos responsáveis pela resistência à insulina (11-15).

A MI pode apresentar alterações rápidas e às vezes irreversíveis em resposta a fatores ambientais e dietéticos (6,16-23). Reverter a disbiose intestinal de indivíduos pré-diabéticos em um estágio saudável pode ser uma estratégia interessante para conter o desenvolvimento do DM2 (10). Uma das formas seria a modulação da MI por meio da alimentação, com a suplementação de polifenóis.

Os polifenóis são encontrados em uma grande variedade de alimentos, como frutas, vegetais, ervas, sementes e cereais, e em bebidas como café, chá, cacau e vinho (24). Possuem a capacidade de modular a MI, em relação à composição e atividade metabólica. Nos alimentos, a maioria dos polifenóis são encontrados como polímeros ou em formas glicosiladas e podem ser agrupados em flavonoides e não flavonoides (25,26).

As flavanonas são um tipo de flavonoide encontradas principalmente em frutas cítricas e mais especificamente, a Eriocitrina (eriodictiol 7-O- β -rutinosídeo) é encontrada na casca do limão siciliano e da lima (27-29). Estudos mostram

que a Eriocitrina possui propriedades antidiabéticas, anticâncer, hipolipidêmicas, antiesteatose e principalmente antioxidantes (30-35).

Quando ingerida, grande parte da Eriocitrina chega ao intestino grosso, onde sofrerá a ação de bactérias da MI (36,37), sendo hidrolisada em seus metabólitos que são os responsáveis pelos efeitos positivos da flavanona.

Estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou efeitos benéficos da Eriocitrina, em relação ao perfil glicêmico, em indivíduos pré-diabéticos (38), porém o impacto da suplementação de Eriocitrina na MI desses indivíduos não foi avaliado.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da suplementação de Eriocitrina na modulação da MI e consequentemente controlar os níveis glicêmicos de indivíduos pré-diabéticos.

Metodologia

Participantes

O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética da Faculdade de Farmácia da UNESP (CAAE: 67610217.6.0000.5426) e foi incluído no ClinicalTrials.gov (NCT03215043). Os procedimentos realizados neste estudo seguiram as orientações éticas do Conselho Nacional de Saúde (Res. 466/12) e a Declaração de Helsinque (1964). Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os participantes.

Os participantes foram recrutados por meio de cartazes afixados em pontos comerciais da cidade de Araraquara - SP, no Campus da UNESP de Araraquara, por outros meios de comunicação (rádio e redes sociais) e por recrutamento em Centros de Saúde do município de Araraquara - SP, através da análise de prontuários. Um total de 100 indivíduos foi submetido a um questionário de triagem e teste de sangue para avaliar a elegibilidade para o estudo. Cinquenta participantes foram inscritos e 45 completaram o estudo.

Desenho Experimental

Estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, foi conduzido inicialmente com um total de 50 indivíduos elegíveis que foram aleatoriamente alocados, por um investigador independente, em dois grupos: 1) Indivíduos que receberam uma dose diária de 200 mg de Eriocitrina (n = 35), 2) Indivíduos que receberam uma dose diária de Placebo (n = 15).

Todos os participantes foram orientados a manter sua dieta habitual durante o período de intervenção e minimizar a ingestão de alimentos cítricos e bebidas ricas em flavonoides (café, chá, cacau, sucos de frutas e vinho). Os

voluntários foram instruídos a consumir todos os dias uma cápsula do suplemento com um copo de água após o jantar por 12 semanas. Os suplementos foram fornecidos aos participantes a cada duas semanas após a randomização.

No decorrer do estudo, cinco indivíduos foram excluídos por consumirem alta quantidade de alimentos ricos em flavonoides, não fazer uso correto e regular das cápsulas fornecidas, pelo uso de antibiótico devido ao aparecimento de enfermidade e por perda de peso excessiva intencional.

As análises finais foram realizadas com 45 indivíduos. O grupo que tomou Eriocitrina foi avaliado quando à diminuição da glicemia de jejum, desfecho principal do estudo, e assim foi subdividido em 2 grupos: 1) Os que apresentaram diminuição dos níveis de glicemia de jejum, denominados como Respondedores à Eriocitrina; 2) Os que não apresentaram diminuição dos níveis de glicemia de jejum: Não-Respondedores. A dose de Eriocitrina utilizada foi baseada no estudo de Ribeiro et al, 2019, que apresentou resultados positivos quanto à diminuição de glicemia com uma dose de 200 mg/dia (38).

A figura 1 apresenta o desenho experimental de forma resumida.

Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi determinado com nível de significância de 0,05 e poder de 0,8. Com base no estudo de Yari et al. 2019 (39) e considerando o nível de glicemia de jejum como uma variável-chave, calculamos um tamanho de amostra de 13 indivíduos para cada grupo do estudo para detectar uma diferença média de 13 mg/dL na glicemia de jejum, assumindo uma taxa de abandono de 10%.

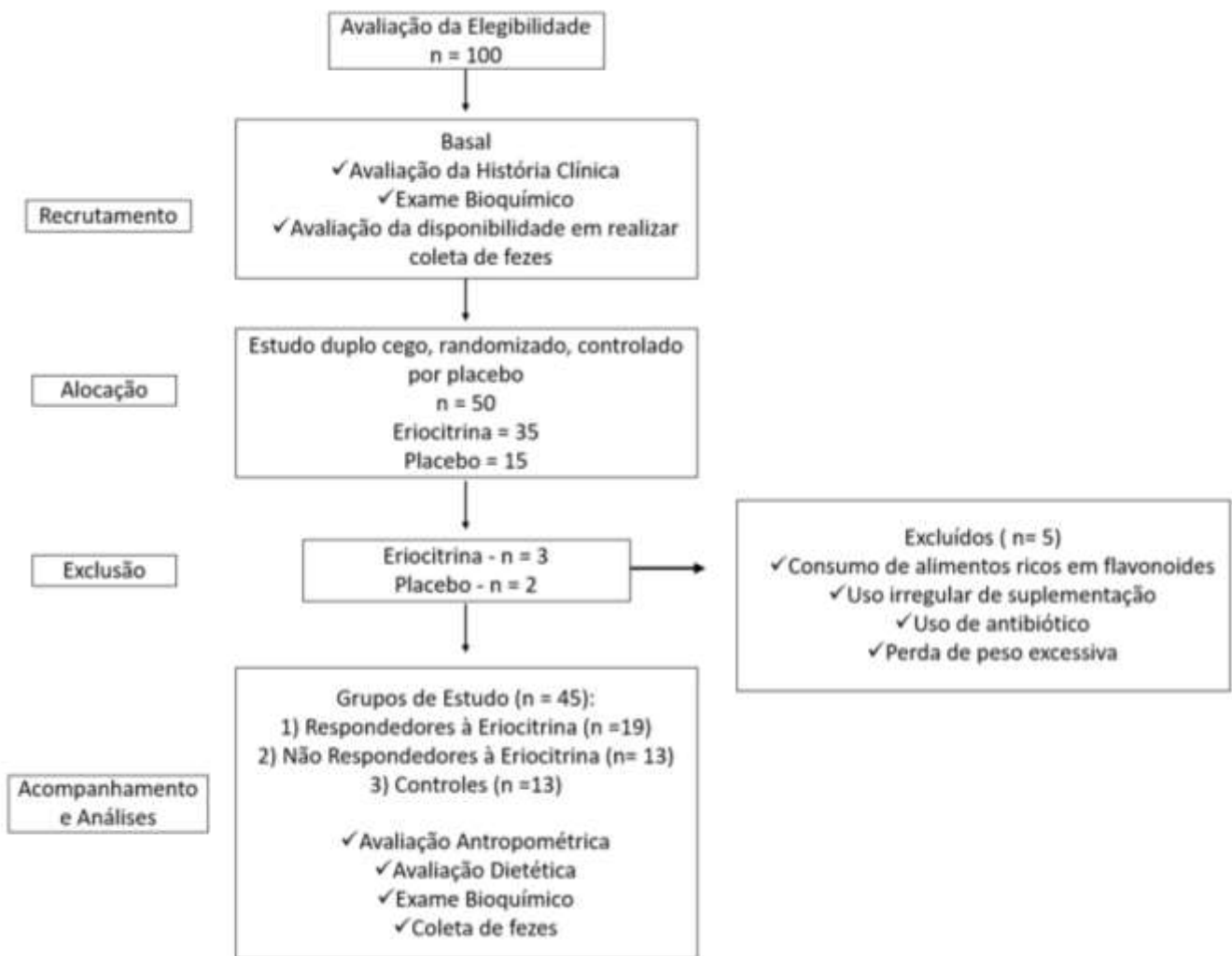


Figura 1. Fluxograma do desenho experimental do estudo.

Crêterios de Inclusão

Para participar do estudo, foram selecionados indivíduos de ambos os sexos com idade entre 30 e 60 anos, pr -diabéticos, identificados por, no mínimo um, dos seguintes cr terios: (a) metabolismo da glicose prejudicado, (b) intolerância à glicose, (c) HbA1c com valores entre 5,7 e 6,4%.

Crêterios de Exclusão

Foram excluídos indivíduos que faziam uso de hipoglicemiantes, medicamentos para perda de peso e suplementos dietéticos (vitaminas, minerais, bioflavon ides ou outros compostos bioativos). Aqueles que praticavam exercício físico intenso (mais de 10h/semana) e que apresentavam condi es fisiológicas ou doenças cr nicas que interferisse nos níveis de glicose sanguínea, como histórico de DM2, doença hepática, síndrome renal, ovário policístico ou disfun o na tireóide.

Também foram excluídos indivíduos com condi es que afetavam a MI, como doenças gastrointestinais, incluindo síndrome de má absor o, doença inflamatória intestinal cr nica, câncer colorretal, doença celíaca, diverticulite e doença de Crohn. Indivíduos com uso regular de laxantes e uso recente (dentro de 3 meses) de antibióticos. Por fim, foram excluídos fumantes, indivíduos com doenças cardiovasculares ou com histórico de uso de drogas ou álcool e gestantes.

Preparação do Suplemento

O produto de intervenção foi o Eriomin[®], suplemento de flavonoides cítricos fornecidos pela Ingredients by Nature TM, Montclair, CA. A pureza foi determinada por HPLC - 70% Eriocitrina, 5% Hesperidina, 4% Naringina e 1% Didimina. O Placebo, contendo amido de milho 100% microcristalino, foi formulado por um farmacêutico independente e sua aparência era a mais semelhante possível ao suplemento ativo.

Como o produto teve uma concentração maior de Eriocitrina, trataremos como efeitos dessa flavanona, mas é importante considerar seu grau de pureza para as interpretações.

Coleta e Armazenamento das fezes

As amostras fecais foram coletadas no início (início da 1^a semana) e final (12^a semana) utilizando um kit de coleta para fezes, que foi oferecido para os voluntários. As fezes foram homogeneizadas, armazenadas em tubo plástico estéril (10 mL) e mantidas a - 80°C no ultracongelador (Haier Biomedical, Qingdao, China) até análise.

Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Foram pesadas em balança analítica (modelo AR2140, Ohaus Corporation, Parsipanny, EUA) 200 mg de amostras de fezes. Foram então adicionados 1.000 μ L de água ultrapura a cada amostra, sendo então agitadas no vórtex por 3 min e medido o pH. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, a suspensão fecal teve o pH ajustado para 2-3 usando 50 μ L de solução de ácido clorídrico 5 mol/L. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 3698 \times g e 4°C (modelo AxySpin R, Axygen, Union City, EUA).

A análise de AGCC foi conduzida usando um cromatógrafo a gás do modelo 2010 (Shimadzu, Gifu, JP) equipado com um injetor sem divisão, um detector de ionização de chama e um amostrador automático CombiPAL. A separação dos AGCC ocorreu através de uma coluna HP-INNOWAX (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m) (Agilent Technologies, La Jolla, EUA). O hidrogênio foi usado como gás de arraste, a taxa de fluxo foi fixada em 1,45 mL/min, e a temperatura do injetor e do detector foi mantida a 240°C.

Análise da Microbiota Intestinal

A extração do DNA de cada amostra foi realizada usando o "Kit de isolamento de DNA PowerLyzer @ PowerSoil" (Qiagen, Valencia, EUA). Foram utilizados os primers 319F/806R para amplificar a região V3-V4 do 16S rRNA. Na etapa 1, os primers direto e reverso continham uma sequência de tags Illumina, um espaçador de comprimento variável, uma sequência de ligação e a sequência alvo 16S para aumentar a diversidade e melhorar a qualidade do sequenciamento e execução. Cada reação de PCR de 25 μ L continha uma

unidade de Polimerase Kapa2G Robust Hot Start (Kapa Biosystems, Wilmington, MA), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de mistura dNTP, 0,2 μmol/L de cada primer e 1 μL de DNA para cada amostra. Na etapa 2, cada amostra foi codificada com uma combinação única de código de barras para frente e para trás com uma sequência de adaptador Illumina P5, um código de barras exclusivo de 8 nt, uma sequência de correspondência parcial do adaptador de avanço usado na etapa 1 e primers reversos com um adaptador de Illumina P7. A reação de PCR na etapa 2 continha uma concentração final de 0,2 μmol/L de cada primer com código de barras exclusivo e 1 μL do produto da reação de PCR na etapa 1. O produto final foi quantificado no instrumento Qubit usando o kit de DNA Qubit Broad Range (Invitrogen, Carlsbad, CA), e os amplicons individuais foram reunidos em concentrações iguais. A biblioteca reunida foi limpa usando contas Ampure XP (Beckman Coulter, Brea, CA) e a banda de interesse foi sujeita a isolamento por eletroforese em gel a 1,5% (Sage Science, Beverly, MA). A biblioteca foi quantificada via qPCR seguido de sequenciamento de extremidade emparelhado de 300 pb usando um instrumento Illumina MiSeq no Genome Center DNA Technologies Core na UC Davis.

A desmultiplexação dos arquivos Raw FASTQ e o ajuste do adaptador das sequências foram realizados usando o dbcAmplicons v. 0.8.5 (<http://github.com/msettles/dbcAmplicons>). As leituras direta e reversa não imersas foram importadas para o QIIME2 versão 2017.12 (<https://qiime2.org>) e as variantes de sequência foram determinadas seguindo o pipeline de análise DADA2. A classificação taxonômica foi atribuída usando um classificador filtrado Naive Bayes, treinado no banco de dados de genes verdes com 99% de identidade, versão 13.8.

Análises Bioquímicas

Amostras de sangue em jejum noturno, de pelo menos 12 horas, foram coletadas no início da 1ª semana e no final do estudo (12ª semana). A coleta foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Araraquara-SP e o soro foi armazenado a -80°C .

Marcadores bioquímicos - glicose de jejum, tolerância oral à glicose, HbA1c, insulina, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e triglicerídios foram analisados por kits comerciais (Labtest, Brasil). A lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) foi calculada (40), assim como a avaliação do modelo de homeostase (HOMA - IR), sendo o ponto de corte de $\geq 2,71$ (41). Marcadores metabólicos e inflamatórios – peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), glucagon, peptídeo C, adiponectina, *tumoral necrosis factor alfa* (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa ultra sensível (PCR-us) foram analisados pelo Luminex Milliplex® (RP3X Scientific, Ribeirão SP, Brasil). A peroxidação lipídica foi avaliada pelo ensaio TBARS (42) e a capacidade antioxidante total pelo ensaio de radicais ABTS+ (43). Marcadores hepáticos e renais - aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase (γ GT) e creatinina foram realizados por kits comerciais (Labtest, Brasil).

Medidas Antropométricas

Os seguintes parâmetros antropométricos foram avaliados: peso corporal (kg), altura (m), índice de massa corporal (IMC) (kg/m^2), circunferência da cintura

(cm), massa magra (kg), massa gorda (kg), gordura corporal (%) e área de gordura visceral (cm²).

Para a aferição do peso corporal, massa magra, massa gorda, percentual de gordura corporal e área de gordura visceral foi utilizado equipamento de bioimpedância tetrapolar de alta frequência (Inbody 720®). Os participantes foram orientados a jejuar por duas horas, não ingerir álcool e produtos que contivessem cafeína como um dos componentes nas últimas 24 horas, usar roupas leves, sem metal, urinar pelo menos 20 minutos antes do teste, retirar qualquer tipo de adorno metálico e não praticar atividade física intensa nas últimas 24 horas. A altura foi medida no início do estudo, por meio de estadiômetro com precisão de 0,1 cm. O IMC foi calculado pelo peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado. A medida da circunferência da cintura foi feita no ponto médio aproximado entre a margem inferior da última costela palpável e o topo da crista ilíaca (44).

Consumo Alimentar

Os participantes foram orientados a completar um Diário Alimentar de três dias (dois dias de semana e um dia de fim de semana) durante a semana inicial e durante a semana final do estudo. Foi solicitado aos participantes o registro de tudo o que comeram ou beberam durante os três dias, descrevendo cada item em detalhes, incluindo detalhes de cozimento e adição de sal, açúcar, especiarias e molhos. Depois de concluído, o diário foi revisado durante a consulta para adicionar informações necessárias. Os participantes foram instruídos a manter sua dieta habitual e atividade física durante todo o período experimental.

A ingestão alimentar diária dos participantes foi calculada e feita uma média dos três dias registrados. A análise da ingestão de energia, macronutrientes e micronutrientes foi realizada por meio do programa DietBox®, com base na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

Para a quantificação das necessidades energéticas dos indivíduos do estudo foram utilizadas fórmulas referentes à população com sobrepeso e obesidade (45), para as quais foi considerado sexo, idade, altura, peso e nível de atividade física (igual a 1 pelo fato dos participantes serem sedentários). Foi então realizada a comparação da média do consumo energético com a média da necessidade energética, segregando entre homens e mulheres.

Pressão Arterial

A pressão arterial foi medida com monitor digital (ReliOn, HEM - 741 CRELN, EUA).

Avaliação da conformidade, Efeitos adversos e Segurança da Eriocitrina

A cada duas semanas, durante as visitas gerais, os participantes foram orientados a devolver as cápsulas restantes. Nessas visitas, eles receberam novas cápsulas para o próximo intervalo. Em cada visita regular, todos os participantes foram questionados sobre eventos adversos ou qualquer desconforto durante a intervenção. A conformidade do uso das cápsulas foi avaliada pela contagem das cápsulas devolvidas em cada visita. Os participantes que consumiram mais de 90% das cápsulas fornecidas e completaram todas as avaliações, tiveram boa adesão e foram incluídos na análise estatística.

Análise Estatística

Os dados são apresentados como Média \pm DP. A análise estatística foi realizada usando o programa BioEstat 5.0. O teste de Shapiro Wilk foi realizado primeiramente para analisar a normalidade das amostras. ANOVA unilateral (para dados normais) e Kruskal Wallis (para dados não normais) foram usados para identificar diferenças entre os grupos no baseline e período final. Para avaliar as alterações após suplementação de Eriocitrina e Placebo, foi realizado um Teste t nas amostras normais e Wilcoxon nas amostras não normais. A significância foi $p \leq 0,05$.

Resultados

Baseline

Quarenta e cinco indivíduos participaram do estudo, sendo 24 mulheres e 21 homens com média de idade de 51 anos, variando de 32 a 60 anos.

A Tabela 1 apresenta o número de indivíduos, média de idade, perfil da MI em relação às *Operational Taxonomic Units* (OTU), diversidade (índice Chao1, Shannon e índice Simpson) e os AGCC (ácidos acético, propiônico e butírico) no período basal dos grupos de estudo.

Quanto aos AGCC, as concentrações de ácido acético foram maiores, seguida pelos ácidos butírico e propiônico.

Não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 1. Idade, *Operational Taxonomic Units* (OTU), Diversidade (índice Chao1 e Shannon e Índice Simpson) e Ácidos graxos de cadeia curta no período basal dos grupos de estudo.

Variáveis	Respondedores	Não Respondedores	Controles
n	19	13	13
Idade	49 ± 9	56 ± 4	51 ± 9
Perfil da Microbiota Intestinal			
OTU	64825 ± 32060	63706 ± 29064	56353 ± 24219
Diversidade			
Chao1	1745 ± 345	1739 ± 434	1928 ± 313
Shannon	5,7 ± 0,6	5,6 ± 0,8	6,0 ± 0,5
Simpson	0,94 ± 0,04	0,92 ± 0,05	0,95 ± 0,03
AGCC (mmol/L)			
Ácido Acético	15,0 ± 3,0	20,0 ± 11	11,0 ± 4,3
Ácido Butírico	5,2 ± 3,2	3,6 ± 2,5	4,6 ± 2,0
Ácido Propiônico	3,0 ± 1,3	2,7 ± 0,8	3,9 ± 2,6

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Abreviações: OTU: *Operational Taxonomic Units*; AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta.

A Figura 2 apresenta as bactérias com maior abundância relativa na MI dos pré-diabéticos participantes do estudo, no período basal, esse perfil foi semelhante nos três grupos. Quanto à abundância relativa, a maioria das bactérias intestinais destacadas se enquadraram em quatro filos: Firmicutes, Actinobactérias, Bacteroidetes e Proteobactérias. Quanto às famílias, houve destaque para *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* e *Erysipelotrichaceae*, já entre os gêneros, os mais predominantes foram *Blautia*, gêneros não identificados da família *Lachnospiraceae*, *Coprococcus* e *Ruminococcus*.

A Tabela 2 apresenta variáveis bioquímicas/metabólicas (Glicemia, Insulina, HOMA, HbA1c, Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), Colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, Triglicerídios, Creatinina, Uréia, Aspartato Aminostransferase (AST), Alanina Aminostransferase (ALT), Fosfatase Alcalina, Gama GT, Proteína C reativa ultra sensível (PCR-us), GLP1, Glucagon, C-Peptídeo, Adiponectina, IL-6, TNF α , Peroxidação Lipídica (MDA) e Capacidade Antioxidante (ABTS)) e variáveis hemodinâmicas (Pressão Arterial) dos grupos estudados no período basal. Assim como o perfil da MI, no início do estudo, os grupos apresentaram certa homogeneidade em relação aos parâmetros apresentados, apenas alguns parâmetros bioquímicos como LDL-colesterol e as enzimas hepáticas AST e ALT apresentaram valores menores no grupo Respondedores em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$ em todos os parâmetros) e a enzima hepática Gama GT apresentou valores menores no grupo Não Respondedores em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$).

A pressão arterial dos voluntários dos três grupos foi estatisticamente semelhante e de acordo com a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2020 os indivíduos eram normotensos (46).

A Tabela 3 apresenta variáveis antropométricas (IMC, Massa Magra, gordura Corporal, Relação Cintura-Quadril, Área de Gordura Visceral, Circunferência Abdominal) e dietéticas (Energia, Carboidratos, Proteínas, Lipídios, Colesterol, Ácidos Graxos Saturados, Fibras) dos grupos estudados, segmentados por sexo, no período basal.

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao perfil antropométrico. Em todos os casos, os indivíduos apresentaram IMC médio correspondente à obesidade ($> 30 \text{ kg/m}^2$) e todos os grupos se enquadraram ao perfil de Síndrome Metabólica por apresentarem três dos cinco fatores estabelecidos pelo NCEP-ATP III para essa síndrome: circunferência abdominal aumentada e níveis altos de triglicérides e glicose sanguínea (47).

Quanto ao perfil dietético, as recomendações estabelecidas pelas DRIS, 2002 (45) apontam necessidade energética de aproximadamente 2500 kcal para homens e 2000 kcal para mulheres, considerando o diagnóstico de sobrepeso e obesidade dos voluntários. No presente estudo, o consumo energético médio entre os homens foi de aproximadamente 3000 kcal e de 2500 kcal para mulheres. O consumo de 500 kcal acima do recomendado em ambos os sexos, identifica uma dieta hipercalórica.

Quanto ao percentual de consumo de macronutrientes em relação ao consumo energético, é estabelecido pelas DRIS, 2002 (45) um percentual de 45 - 65% para carboidratos, 10 - 30% para proteínas e 20 - 35% para os lipídios. No presente estudo, a quantidade média de carboidratos consumida foi de 45% para

homens e 46% para mulheres, 16% de proteínas para ambos os sexos e 39% de lipídios para homens e 38% para mulheres.

Quanto aos lipídios, o percentual médio de consumo de ácidos graxos saturados, em relação ao consumo energético total, foi de 14% para homens e 16% para as mulheres. A Recomendação é que o consumo de ácidos graxos saturados seja menor que 10% (45). Valores superiores à recomendação podem levar a um aumento dos lipídios sanguíneos, especialmente o LDL-colesterol.

Quanto ao colesterol dietético, a atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose, 2017 (48) não estabelece um valor máximo para o consumo, porém é preciso ter cautela em relação a altas quantidades consumidas desse nutriente. No presente estudo a média do consumo de colesterol dietético foi de 500 mg para homens e 560 mg para as mulheres.

Finalmente os voluntários consumiram em média 19 g/dia (em ambos os sexos) de fibras dietéticas. A recomendação é de 25 - 38 g/dia (45), sendo, portanto, considerada uma dieta insuficiente nesse nutriente.

O perfil dietético dos voluntários se mostrou hipercalórico, com alto teor de gordura saturada e baixa quantidade de fibras sem diferenças estatísticas entre os grupos.



Figura 2. Abundância relativa dos filos, famílias e gêneros dos grupos de estudo.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e pressão arterial dos grupos de estudo no período basal.

<i>Variáveis</i>	<i>Respondedores</i>	<i>Não Respondedores</i>	<i>Controles</i>
Bioquímicas/Metabólicas			
Perfil Glicídico			
Glicemia (mg/dL)	106 ± 12	102 ± 11	103 ± 8,1
Insulina (µU/mL)	19 ± 8,9	21 ± 11	20 ± 8,2
HOMA-IR	4,5 ± 1,8	5,4 ± 2,9	5,0 ± 2,3
HbA1c (%)	6,0 ± 0,5	5,8 ± 0,4	5,9 ± 0,4
TOTG (mg/dL)	154 ± 14	146 ± 22	157 ± 19
Perfil Lipídico			
Colesterol total (mg/dL)	185 ± 33	196 ± 44	222 ± 55
LDL-colesterol (mg/dL)	102 ± 31 ^A	114 ± 31 ^{AB}	140 ± 40 ^B
HDL-colesterol (mg/dL)	45 ± 8,5	46 ± 6,3	45 ± 10
Triglicerídios (mg/dL)	165 ± 74	152 ± 70	167 ± 75
Perfil Hepático e Renal			
ALT (U/L)	20 ± 6,3 ^A	24 ± 12 ^{AB}	35 ± 17 ^B
AST (U/L)	19 ± 4,0 ^A	24 ± 8,6 ^{AB}	27 ± 8,2 ^B
Fosfat. Alcalina (U/L)	58 ± 13	66 ± 16	67 ± 12
Gama GT (U/L)	39 ± 32 ^{AB}	26 ± 12 ^A	57 ± 35 ^B
Creatinina (mg/dL)	0,85 ± 0,29	0,87 ± 0,16	0,90 ± 0,15
Uréia (mg/dL)	34 ± 15	35 ± 7,7	32 ± 8,7
Perfil Metabólico e Inflamatório			
GLP1 (pmol/L)	8,4 ± 2,7	7,6 ± 2,1	8,0 ± 2,1
Glucagon (pg/ml)	144 ± 17	142 ± 15	147 ± 13
C-Peptídeo (pg/ml)	2290 ± 861	2171 ± 840	1779 ± 483
Adiponectina (µg/mL)	18 ± 8,1	19 ± 8,5	19 ± 5,2
IL-6 (pg/ml)	6,7 ± 5,0	5,8 ± 2,9	7,6 ± 5,3
TNF-α (pg/ml)	5,8 ± 1,9	4,5 ± 1,6	5,5 ± 1,3
PCR-us (mg/dL)	0,44 ± 0,42	0,48 ± 0,43	0,39 ± 0,25
Peroxidação lipídica (mM)	1,6 ± 0,8	1,9 ± 0,8	2,3 ± 1,2
Capacidade Antioxidante (µM)	1,86 ± 0,10	1,90 ± 0,03	1,88 ± 0,04
Hemodinâmicas			
PA Sistólica (mmHg)	124 ± 12	126 ± 10	125 ± 10
PA Diastólica (mmHg)	77 ± 12	82 ± 6	78 ± 8

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Letras maiúsculas: diferença entre os grupos.

Abreviações: HOMA-IR: *homeostasis model assessment-insulin resistance*, HbA1c: hemoglobina glicada, TOTG: teste oral de tolerância à glicose, LDL-colesterol: *low density lipoprotein cholesterol*, HDL: *high density lipoprotein cholesterol*, AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, Gama GT: gama glutamil transferase, PCR-us: proteína c reativa ultra sensível, GLP1: *glucagon-like peptide-1*, IL-6: interleucina-6, TNF-α: *tumor necrosis factor-α*.

Tabela 3. Parâmetros antropométricos e dietéticos dos grupos de estudo, segmentados por sexo, no período basal.

Variáveis	Respondedores		Não Respondedores		Controles	
	Homens n = 9	Mulheres n = 10	Homens n = 6	Mulheres n = 7	Homens n = 6	Mulheres n = 7
<u>Antropométricas</u>						
IMC (kg/m ²)	29 ± 4,7	36 ± 7,1	32 ± 4,8	33 ± 6,4	37 ± 6,1	34 ± 5,8
Massa Magra (kg)	35 ± 4,2	27 ± 4,6	37 ± 4,9	27 ± 2,6	40 ± 5,9	30 ± 4,9
Gordura Corporal (%)	28 ± 9,1	45 ± 6,9	32 ± 6,2	44 ± 8,1	36 ± 4,2	42 ± 7,8
Relação Cintura-Quadril	1,03 ± 0,10	1,02 ± 0,07	1,04 ± 0,10	1,14 ± 0,11	1,10 ± 0,08	1,02 ± 0,10
Área da Gordura Visceral (cm ²)	116 ± 47	153 ± 34	138 ± 46	163 ± 42	173 ± 38	145 ± 39
Circunf. Abdominal (cm)	102 ± 14	110 ± 13	111 ± 15	102 ± 7,9	119 ± 10	121 ± 41
<u>Dietéticas</u>						
Energia (kcal)	2646 ± 841	2662 ± 437	3358 ± 804	2242 ± 655	3138 ± 854	2600 ± 281
Carboidratos (g), (%)	297 ± 105 (45%)	313 ± 75 (47%)	389 ± 82 (46%)	258 ± 59 (46%)	353 ± 77 (45%)	293 ± 67 (45%)
Proteínas (g), (%)	113 ± 59 (17%)	106 ± 13 (16%)	142 ± 42 (17%)	89 ± 24 (16%)	118 ± 58 (15%)	96 ± 19 (15%)
Lipídios (g), (%)	112 ± 41 (38%)	110 ± 17 (37%)	138 ± 38 (37%)	95 ± 31 (38%)	139 ± 40 (40%)	116 ± 20 (40%)
Colesterol (mg)	488 ± 202	611 ± 66	528 ± 167	445 ± 134	512 ± 196	621 ± 182
Ácidos Graxos Saturados (g)	32 ± 8,8 (11%)	46 ± 6 (16%)	46 ± 17 (12%)	46 ± 8,8 (18%)	61 ± 14 (17%)	41 ± 12 (14%)
Fibras (g)	19 ± 2,5	17 ± 4,0	20 ± 1,7	21 ± 3,6	19 ± 4,1	20 ± 1,8

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Abreviações: IMC: *índice de massa corporal*.

Pós-intervenção

A tabela 4 apresenta o perfil da MI em relação às OTUs, diversidade (índice Chao1, Shannon e índice Simpson) e os AGCC (ácidos acético, propiônico e butírico) dos grupos estudados após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Placebo. Foi identificada diminuição do ácido acético em todos os grupos ($p=0,06$ para Respondedores, $p=0,01$ para Não Respondedores e $p=0,03$ para Controles) após 12 semanas de suplementação (de Eriocitrina e Placebo).

A tabela 5 (A, B e C) e Figura 3 (A, B e C) apresentam a abundância relativa dos filos, famílias e gêneros dos grupos estudados após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Controle. A família *Streptococcaceae* apresentou abundância relativa maior no grupo Respondedores em relação ao grupo Controle no início do estudo ($p<0,05$). Já após 12 semanas de estudo, a família *Clostridiaceae* apresentou diminuição significativa no grupo Não Respondedores ($p=0,008$).

O gênero *Coprococcus* apresentou abundância relativa maior no grupo Respondedores em relação ao grupo Não Respondedores no baseline ($p<0,05$). Esse mesmo gênero apresentou aumento significativo no grupo Não Respondedores ($p=0,02$) após 12 semanas de suplementação com Eriocitrina.

Em todas as tabelas é apresentado o percentual de aumento ou diminuição de cada parâmetro.

Tabela 4. *Operational Taxonomic Units* (OTU), Diversidade (índice Chao1, Shannon e Índice Simpson) e Ácidos graxos de cadeia curta após 12 semanas de suplementação com Eriocitrina ou Placebo.

Variáveis	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
OTU	0	64825 ± 32060	63706 ± 29074	56353 ± 24219
	12	63706 ± 31610	69047 ± 35996	67820 ± 26397
	$\Delta_{(12-0)}$	7%	8%	20%
Diversidade				
Chao1	0	1745 ± 345	1739 ± 434	1928 ± 313
	12	1702 ± 337	1606 ± 391	1820 ± 247
	$\Delta_{(12-0)}$	-3%	-8%	-6%
Shannon	0	5,7 ± 0,6	5,6 ± 0,8	6,0 ± 0,5
	12	5,7 ± 0,6	5,6 ± 0,8	5,9 ± 0,4
	$\Delta_{(12-0)}$	0%	0%	-2%
Simpson	0	0,94 ± 0,04	0,92 ± 0,05	0,95 ± 0,03
	12	0,94 ± 0,03	0,93 ± 0,05	0,95 ± 0,02
	$\Delta_{(12-0)}$	0%	0,5%	0%
AGCC (mmol/L)				
Ac. Acético	0	15 ± 3,0 ^a	20 ± 11 ^a	11 ± 4,3 ^a
	12	9,2 ± 3,5 ^b	9,0 ± 5,3 ^b	5,9 ± 2,2 ^b
	$\Delta_{(12-0)}$	-38%	-54%	-47%
Ac. Propiônico	0	3,0 ± 1,3	2,7 ± 0,8	3,9 ± 2,6
	12	3,2 ± 1,2	2,6 ± 2,3	2,3 ± 0,7
	$\Delta_{(12-0)}$	8%	-6%	-41%
Ac. Butírico	0	5,1 ± 3,2	3,6 ± 2,5	4,6 ± 2,0
	12	3,8 ± 2,0	3,7 ± 1,9	3,9 ± 2,1
	$\Delta_{(12-0)}$	-25%	5%	-16%

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Letras minúsculas: diferença entre os tempos.

Abreviações: OTU: *Operational Taxonomic Units*; AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta.

Tabela 5. Abundância relativa dos Filos (A), Famílias (B) e Gêneros (C) das principais bactérias intestinais encontradas nos grupos de estudo após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Placebo.

Tabela 5A. Filos de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos de Respondedores, Não Respondedores e Controle.

Filo (%)	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
Firmicutes	0	91 ± 8,5	89 ± 11	90 ± 7,3
	12	92 ± 8,7	92 ± 5,7	93 ± 5,0
	$\Delta_{(12-0)}$	1%	3%	3%
Actinobactéria	0	3,9 ± 4,9	6,0 ± 12	3,9 ± 3,6
	12	3,6 ± 3,9	4,6 ± 5,5	3,4 ± 2,1
	$\Delta_{(12-0)}$	-6%	-23%	-12%
Bacterioidetes	0	1,8 ± 2,3	2,1 ± 3,0	1,9 ± 2,6
	12	2,2 ± 4,7	2,5 ± 2,8	0,8 ± 0,5
	$\Delta_{(12-0)}$	21%	19%	-58%
Proteobacteria	0	2,1 ± 5,3	0,9 ± 2,7	2,8 ± 7,1
	12	0,8 ± 1,7	0,4 ± 0,4	1,8 ± 5,1
	$\Delta_{(12-0)}$	-62%	-59%	-34%

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

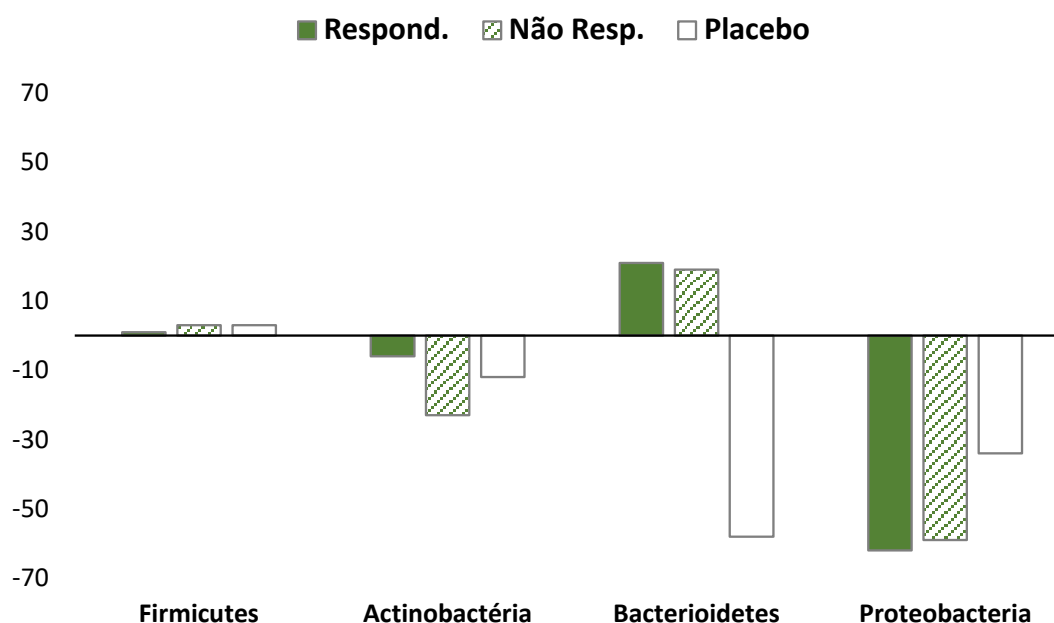


Figura 3A. Esquema da modificação dos Filos após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos (Respondedores, Não Respondedores e Controle).

Tabela 5B. Famílias de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos de Respondedores, Não Respondedores e Controle.

Família (%)	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
<i>Lachnospiraceae</i>	0	60 ± 20	45 ± 22	61 ± 18
	12	61 ± 21	56 ± 24	67 ± 12
	$\Delta_{(12-0)}$	2,6%	25%	11%
<i>Ruminococcaceae</i>	0	8,5 ± 5,1	19 ± 13	10 ± 5,8
	12	11 ± 7,7	20 ± 18	7,5 ± 4,1
	$\Delta_{(12-0)}$	28%	10%	-24%
<i>Clostridiaceae</i>	0	5,5 ± 10	13 ± 14 ^a	7,1 ± 12
	12	5,1 ± 7,5	5,2 ± 5,3 ^b	5,9 ± 6,7
	$\Delta_{(12-0)}$	-7,9%	-59%	-18%
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0	8,9 ± 8,2	3,4 ± 2,4	5,8 ± 6,2
	12	8,9 ± 9,8	2,9 ± 2,4	5,8 ± 6,3
	$\Delta_{(12-0)}$	1%	-13%	0%
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0	2,3 ± 4,1	2,6 ± 4,7	1,7 ± 2,3
	12	1,2 ± 2,0	2,8 ± 5,3	1,8 ± 1,7
	$\Delta_{(12-0)}$	-45%	9%	6%
<i>Coriobacteriaceae</i>	0	1,5 ± 1,1	3,3 ± 6,9	2,1 ± 2,4
	12	2,3 ± 3,3	1,8 ± 1,6	1,6 ± 0,7
	$\Delta_{(12-0)}$	55%	-47%	-27%
<i>Clostridiales; f_</i>	0	1,5 ± 0,8	3,6 ± 5,5	2,5 ± 2,3
	12	1,6 ± 1,1	3,6 ± 5,5	2,1 ± 1,6
	$\Delta_{(12-0)}$	6%	0%	-18%
<i>Streptococcaceae</i>	0	2,1 ± 2,7 ^A	1,7 ± 3,2 ^{AB}	0,8 ± 1,0 ^B
	12	2,2 ± 3,4	2,0 ± 2,2	1,5 ± 1,1
	$\Delta_{(12-0)}$	4,4%	13,8%	80,2%
<i>Lactobacillaceae</i>	0	2,1 ± 4,2	1,3 ± 3,6	0,2 ± 0,4
	12	1,0 ± 3,6	2,2 ± 4,6	0,2 ± 0,3
	$\Delta_{(12-0)}$	-51%	67%	0%
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	1,9 ± 5,4	0,9 ± 2,7	2,6 ± 7,1
	12	0,7 ± 1,7	0,3 ± 0,4	1,8 ± 5,1
	$\Delta_{(12-0)}$	-65%	-62%	-31%
<i>Bacteroidaceae</i>	0	0,4 ± 0,6	0,7 ± 1,0	1,0 ± 1,4
	12	0,5 ± 0,9	0,9 ± 1,4	0,3 ± 0,3
	$\Delta_{(12-0)}$	33%	24%	-71%

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.
Letras maiúsculas: diferença entre os grupos.

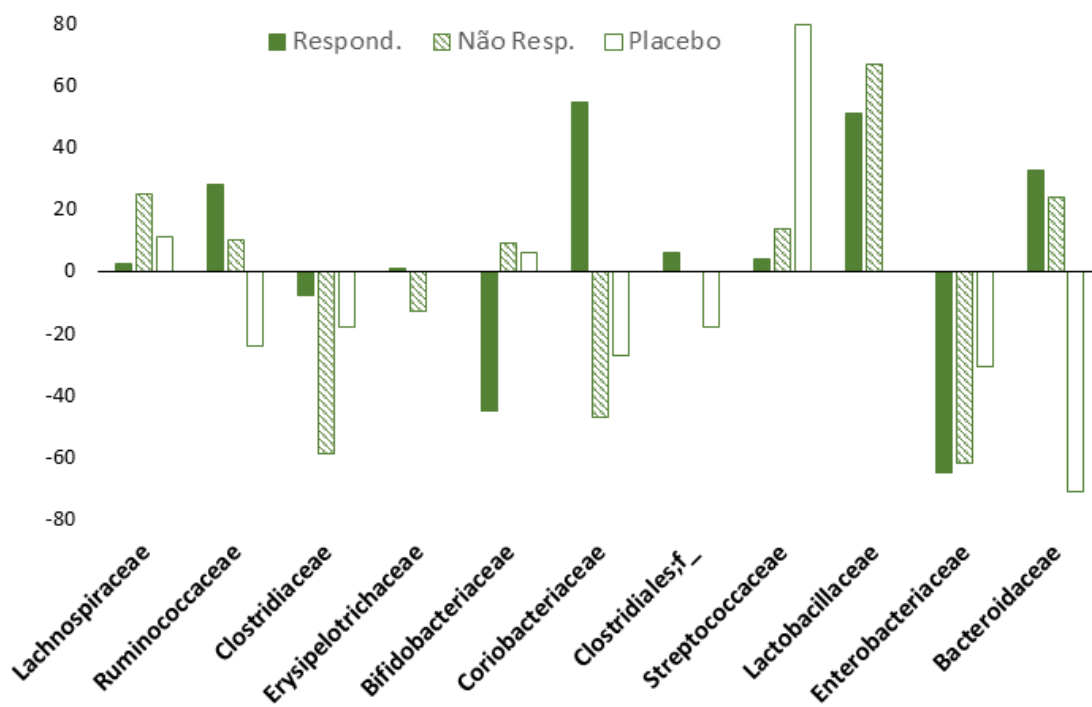


Figura 3B. Esquema da modificação das Famílias de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos (Respondedores, Não Respondedores e Controle).

Tabela 5C. Gêneros de bactérias intestinais após o tratamento com Eriocitrina ou Placebo de acordo com os grupos de respondedores, não-respondedores e controle.

Gênero (%)	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
<i>Blautia</i>	0	24 ± 15	21 ± 13	24 ± 15
	12	22 ± 14	24 ± 14	29 ± 15
	$\Delta_{(12-0)}$	-7%	13%	22%
<i>Lachnospiraceae;g_</i>	0	19 ± 14	12 ± 5,9	16 ± 8,7
	12	22 ± 17,0	15 ± 9,1	18 ± 9,8
	$\Delta_{(12-0)}$	17%	31%	11%
<i>Coprococcus</i>	0	11 ± 3,6 ^A	6,1 ± 3,1 ^{Ba}	10 ± 4,4 ^{AB}
	12	11 ± 4,4	11 ± 7,0 ^b	11 ± 6,9
	$\Delta_{(12-0)}$	0%	66%	9%
<i>Ruminococcus</i>	0	4,8 ± 3,2	7,1 ± 5,0	8,9 ± 12
	12	5,3 ± 5,6	8,9 ± 9,7	8,1 ± 8,2
	$\Delta_{(12-0)}$	10%	25%	-9%
<i>Catenibacterium</i>	0	4,1 ± 7,0	1,2 ± 1,9	0,5 ± 1,0
	12	4,4 ± 7,4	0,6 ± 1,2	0,9 ± 2,4
	$\Delta_{(12-0)}$	6%	-44%	102%
<i>Ruminococcaceae;g_</i>	0	3,5 ± 2,2	11 ± 12	4,5 ± 3,2
	12	5,2 ± 3,8	11 ± 12	4,2 ± 3,3
	$\Delta_{(12-0)}$	47%	0%	-6%
<i>Faecalibacterium</i>	0	2,8 ± 2,7	3,4 ± 3,5	2,3 ± 2,7
	12	2,9 ± 4,3	4,0 ± 5,5	1,1 ± 1,0
	$\Delta_{(12-0)}$	5%	20%	-51%
<i>Erysipelotrichaceae;g_</i>	0	2,4 ± 4,2	1,7 ± 2,2	2,7 ± 2,4
	12	2,4 ± 3,8	1,4 ± 1,6	2,2 ± 2,2
	$\Delta_{(12-0)}$	0%	-20%	-14%
<i>Eubacterium</i>	0	2,3 ± 3,3	0,5 ± 0,5	2,6 ± 5,2
	12	2,1 ± 4,0	0,8 ± 1,9	2,5 ± 4,5
	$\Delta_{(12-0)}$	-9%	75%	-4%
<i>Dorea</i>	0	2,1 ± 1,1	1,7 ± 1,1	4,0 ± 4,7
	12	2,4 ± 1,4	2,1 ± 1,1	2,7 ± 1,7
	$\Delta_{(12-0)}$	12%	21%	-32%
<i>Clostridiales_g</i>	0	1,5 ± 0,8	3,6 ± 5,5	2,5 ± 2,3
	12	1,6 ± 1,1	1,8 ± 1,6	2,1 ± 1,6
	$\Delta_{(12-0)}$	+ 6,3%	-49%	-18%
<i>Bifidobacterium</i>	0	2,2 ± 4,1	2,6 ± 4,7	1,7 ± 2,3
	12	1,2 ± 2,0	2,8 ± 5,3	1,8 ± 1,7
	$\Delta_{(12-0)}$	-45%	9%	6%
<i>Eubacterium</i>	0	2,3 ± 3,3	0,5 ± 0,5	2,6 ± 5,2
	12	2,1 ± 4,0	0,8 ± 1,9	2,5 ± 4,5
	$\Delta_{(12-0)}$	-9%	75%	-4%
<i>Streptococcus</i>	0	2,1 ± 2,7	1,6 ± 3,2	0,8 ± 1,1
	12	2,2 ± 3,4	1,9 ± 2,2	1,4 ± 1,1
	$\Delta_{(12-0)}$	7%	17%	74%

Tabela 5C: Continuação

Gênero (%)	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
<i>Lactobacillus</i>	0	2,1 ± 4,2	1,2 ± 3,3	0,2 ± 0,4
	12	1,0 ± 3,6	2,2 ± 4,5	0,2 ± 0,3
	$\Delta_{(12-0)}$	-51%	78%	0%
<i>Collinsella</i>	0	0,9 ± 0,9	1,0 ± 1,0	1,5 ± 2,0
	12	1,7 ± 3,3	1,3 ± 1,7	1,1 ± 0,8
	$\Delta_{(12-0)}$	97%	28%	-23%
<i>Enterobacteriaceae;g_</i>	0	1,7 ± 4,9	0,2 ± 0,7	2,5 ± 7,1
	12	0,5 ± 1,5	0,4 ± 0,4	1,8 ± 5,1
	$\Delta_{(12-0)}$	-68%	44%	-30%
<i>Prevotella</i>	0	1,1 ± 1,9	0,8 ± 2,3	0,6 ± 1,1
	12	1,2 ± 3,4	0,9 ± 1,6	0,4 ± 0,5
	$\Delta_{(12-0)}$	11%	4,3%	-36%
<i>Peptostreptococcaceae;g_</i>	0	1,4 ± 4,7	2,1 ± 3,7	0,6 ± 0,8
	12	0,2 ± 0,4	0,6 ± 0,6	0,5 ± 0,5
	$\Delta_{(12-0)}$	-83%	-70%	-9%

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Letras maiúsculas: diferença entre os grupos.

Letras minúsculas: diferença entre os tempos.

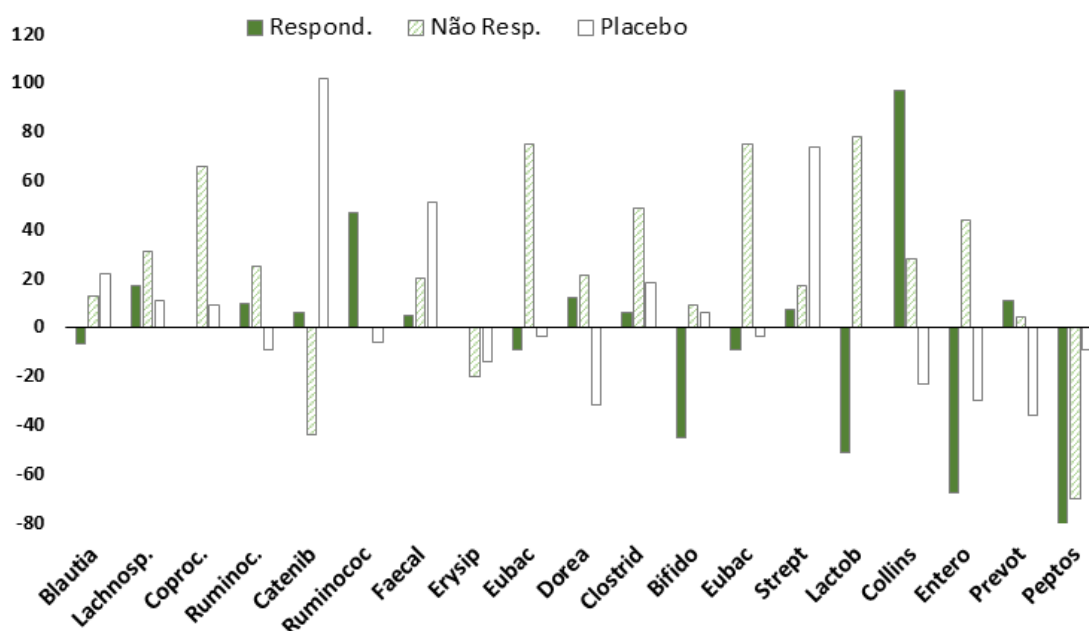


Figura 3C. Esquema da modificação dos Gêneros de bactérias intestinais após o tratamento com Eriomin ou placebo de acordo com os grupos (respondedores, não-respondedores e controle).

A Tabela 6 apresenta variáveis bioquímicas/metabólicas e variáveis hemodinâmicas (Pressão Arterial) dos grupos estudados após 12 semanas de suplementação com Eriocitrina ou Placebo. A glicemia de jejum apresentou diminuição no grupo Respondedores ($p < 0,001$) e aumento no grupo Controle ($p = 0,005$), e esse foi o parâmetro principal que segregou esses dois grupos. As enzimas hepáticas AST e ALT apresentaram aumento significativo no grupo Respondedores ($p = 0,02$ e $0,03$ respectivamente), enquanto que a enzima hepática gama GT apresentou aumento significativo no grupo Não Respondedores ($p = 0,02$).

Os demais parâmetros (Insulina, HOMA, HbA1c, Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), Colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, Triglicerídios, Creatinina, Uréia, Fosfatase Alcalina, PC reativa ultra sensível, GLP1, Glucagon, C-Peptídeo, Adiponectina, IL-6, TNF-, MDA e ABTS e Pressão Arterial) não apresentaram diferenças significativas após as intervenções.

A Tabela 7 apresenta variáveis antropométricas e dietéticas dos grupos estudados, segmentados por sexo, após 12 semanas de suplementação com Eriocitrina ou Placebo. Não houve diferenças significativas em nenhuma das variáveis estudadas.

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos e pressão arterial dos grupos estudados após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Placebo.

Bioquímicos/ Metabólicos	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
Perfil Glicídico				
Glicemia (mg/dL)	0	106 ± 12 ^a	102 ± 10 ^a	103 ± 8,1
	12	99,0 ± 11,0 ^b	105 ± 11 ^b	105 ± 12
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-7% ^A	4% ^B	2% ^B
Insulina (μU/mL)	0	18 ± 8,9	21 ± 11,0	20 ± 8,2
	12	18 ± 8,3	23 ± 12,0	18 ± 10
	Δ ₍₁₂₋₀₎	0%	10%	-6%
HOMA-IR	0	4,5 ± 1,8	5,4 ± 2,9	5,0 ± 2,3
	12	4,4 ± 1,9	6,1 ± 3,4	5,0 ± 3,5
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-4%	14%	0%
HbA1c (%)	0	6,0 ± 0,5	5,8 ± 0,4	5,9 ± 0,4
	12	5,9 ± 0,5	5,8 ± 0,9	5,8 ± 0,5
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-2%	0%	-1%
TOTG (mg/dL)	0	154 ± 14	146 ± 22	157 ± 19
	12	145 ± 21	135 ± 15	160 ± 25
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-6%	-8%	20%
Perfil Lipídico				
Colesterol total (mg/dL)	0	185 ± 33	196 ± 44	222 ± 55
	12	185 ± 39	199 ± 36	222 ± 45
	Δ ₍₁₂₋₀₎	0%	2%	0%
LDL-colesterol (mg/dL)	0	102 ± 31 ^A	114 ± 31 ^{AB}	140 ± 40 ^B
	12	101 ± 35 ^A	119 ± 27 ^{AB}	141,0 ± 34 ^B
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-1%	4%	1%
HDL-colesterol (mg/dL)	0	45 ± 8,5	46 ± 6,3	45 ± 10,2
	12	44 ± 7,0	46 ± 8,0	44 ± 11
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-1,4%	0%	-2%
Triglicerídios (mg/dL)	0	165 ± 74	152 ± 70	167 ± 75
	12	167 ± 65	176 ± 85	189 ± 75
	Δ ₍₁₂₋₀₎	1%	16%	14%
Perfil Hepático e Renal				
ALT (U/L)	0	20 ± 6,3 ^{Aa}	24 ± 12 ^{AB}	35 ± 17 ^B
	12	22 ± 8,3 ^{Ab}	23 ± 11 ^A	40 ± 15 ^B
	Δ ₍₁₂₋₀₎	11%	-1%	14%
AST (U/L)	0	19 ± 4,0 ^{Aa}	24 ± 8,6 ^{AB}	27 ± 8,2 ^B
	12	21 ± 4,5 ^{Ab}	21 ± 5,3 ^{AB}	30 ± 8,0 ^B
	Δ ₍₁₂₋₀₎	8,7% ^A	-12,4% ^B	12,4% ^A

Tabela 6. Continuação

Bioquímicos/ Metabólicos	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
Perfil Hepático e Renal				
Fosfat. Alcalina (U/L)	0	58 ± 13	66 ± 16	67 ± 12
	12	57 ± 15	65 ± 12	67 ± 18
	$\Delta_{(12-0)}$	-0,5%	-1%	0%
Gama GT (U/L)	0	39 ± 32 ^{AB}	26 ± 12 ^{Aa}	57 ± 35 ^{Ba}
	12	39 ± 29 ^{AB}	30 ± 14 ^{Ab}	68 ± 37 ^{Bb}
	$\Delta_{(12-0)}$	0%	17%	19%
Creatinina (mg/dL)	0	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	12	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	$\Delta_{(12-0)}$	0%	0%	0%
Uréia (mg/dL)	0	34 ± 15	35 ± 7,7	32 ± 8,7
	12	32 ± 9,0	38 ± 15	33 ± 9,4
	$\Delta_{(12-0)}$	-6%	8%	3%
Perfil Metabólico e Inflamatório				
GLP1 (pmol/L)	0	8,4 ± 2,7	7,6 ± 2,1	8,0 ± 2,1
	12	9,7 ± 2,0	9,0 ± 1,8	8,0 ± 1,8
	$\Delta_{(12-0)}$	15%	18%	0,02%
Glucagon (pg/ml)	0	144 ± 17	142 ± 15	147 ± 13
	12	130 ± 11	130 ± 10	142 ± 18
	$\Delta_{(12-0)}$	-9%	-9%	-3%
C-Peptídeo (pg/ml)	0	2.290 ± 861	2.171 ± 840	1.779 ± 483
	12	2.0009 ± 667	1.987 ± 822	1.743 ± 532
	$\Delta_{(12-0)}$	-12%	-9%	-2%
Adiponectina (µg/mL)	0	18 ± 8,1	19 ± 8,5	19 ± 5,2
	12	21 ± 6,6	24 ± 9,3	19 ± 4,8
	$\Delta_{(12-0)}$	15%	25%	6%
IL-6 (pg/ml)	0	6,7 ± 5,0	5,8 ± 2,9	7,6 ± 5,3
	12	6,1 ± 4,2	5,4 ± 2,4	7,6 ± 6,1
	$\Delta_{(12-0)}$	-10%	-8%	0%
TNF-α (pg/ml)	0	5,8 ± 1,9	4,5 ± 1,6	5,5 ± 1,3
	12	5,4 ± 2,0	4,4 ± 1,1	5,2 ± 1,7
	$\Delta_{(12-0)}$	-7%	-1%	-5%
PCR-us (mg/dL)	0	0,44 ± 0,38	0,48 ± 0,43	0,39 ± 0,25
	12	0,42 ± 0,31	0,43 ± 0,36	0,32 ± 0,15
	$\Delta_{(12-0)}$	-14%	6,6%	-18%

Tabela 6. Continuação

Bioquímicos/ Metabólicos	Semana de tratamento	Respondedores	Não Respondedores	Controles
Peroxidação Lipídica (mM)	0	1,60 ± 0,76	1,94 ± 0,79	2,25 ± 1,22
	12	1,49 ± 0,68	1,63 ± 1,02	2,05 ± 1,21
	$\Delta_{(12-0)}$	-7%	-16%	-9%
Capacidade Antioxidante (μ M)	0	1,86 ± 0,10	1,90 ± 0,03	1,88 ± 0,04
	12	1,90 ± 0,03	1,91 ± 0,02	1,89 ± 0,03
	$\Delta_{(12-0)}$	+ 2%	+ 0,6%	+ 0,5%
Hemodinâmicas				
Pressão Sistólica (mmHg)	0	124 ± 12	126 ± 10	125 ± 10
	12	126 ± 18	130 ± 18	124 ± 11
	$\Delta_{(12-0)}$	2%	3%	-1%
Pressão Diastólica (mmHg)	0	77 ± 12	82 ± 6,0	78 ± 8,0
	12	77 ± 11	81 ± 8,0	74 ± 10
	$\Delta_{(12-0)}$	-1%	-1%	-5%

Nota: os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

Letras maiúsculas: diferença entre os grupos.

Letras minúsculas: diferença entre os tempos

Tabela 7. Parâmetros antropométricos e diéticos dos grupos de estudo, segmentados por sexo, após 12 semanas de intervenção com Eriocitrina ou Placebo.

Variáveis	Semana de tratamento	Respondedores		Não Respondedores		Controle	
		Homens n = 9	Mulheres n = 10	Homens n = 6	Mulheres n = 7	Homens n = 6	Mulheres n = 7
Antropométricas							
IMC (kg/m ²)	0	29 ± 4,7	36 ± 7,1	32 ± 4,8	33 ± 6,4	37 ± 6,1	34 ± 5,8
	12	28 ± 4,5	36 ± 7,6	32 ± 4,3	33 ± 6,3	37 ± 6,1	34 ± 5,8
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-3,4%	0%	0%	0%	0%	0%
Massa Magra (kg)	0	35 ± 4,2	27 ± 4,6	37 ± 4,9	27 ± 2,6	40 ± 5,9	30 ± 4,9
	12	35 ± 4,5	27 ± 4,9	37 ± 4,1	28 ± 2,9	40 ± 5,7	30 ± 4,9
	Δ ₍₁₂₋₀₎	0%	0%	0%	-3,6%	0%	0%
Gordura Corporal (%)	0	28 ± 9,1	45 ± 6,9	32 ± 6,2	44 ± 8,1	36 ± 4,2	42 ± 7,8
	12	27 ± 9,0	44 ± 6,5	31 ± 5,8	44 ± 7,3	37 ± 4,4	42 ± 78,2
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-3,6%	-2,2%	-3,1%	0%	2,8%	0%
Relação Cintura- Quadril	0	1,03 ± 0,10	1,02 ± 0,07	1,04 ± 0,10	1,14 ± 0,11	1,10 ± 0,08	1,02 ± 0,10
	12	1,00 ± 0,08	1,04 ± 0,09	1,06 ± 0,11	1,13 ± 0,11	1,11 ± 0,10	1,04 ± 0,09
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-2,9%	2%	1,9%	-0,9%	0,9%	2%
Área de Gordura Visceral (cm ²)	0	116 ± 47	153 ± 34	138 ± 46	163 ± 42	173 ± 38	145 ± 39
	12	113 ± 48	152 ± 39	138 ± 47	166 ± 42	176 ± 39	144 ± 38
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-2,6%	-0,7%	0%	1,8%	1,7%	-0,7%
Circunferência Abdominal (cm)	0	102 ± 14	110 ± 13	111 ± 15	102 ± 7,9	119 ± 10	121 ± 41
	12	102 ± 13	110 ± 15	112 ± 14	109 ± 16	121 ± 13	121 ± 40
	Δ ₍₁₂₋₀₎	0%	0%	0,9%	6,9%	1,7%	0%

Tabela 7. Continuação

Variáveis	Semana de tratamento	Respondedores		Não Respondedores		Controles	
		Homens n = 9	Mulheres n = 10	Homens n = 6	Mulheres n = 7	Homens n = 6	Mulheres n = 7
<u>Dietéticas</u>							
Energia (kcal)	0	2646 ± 841	2662 ± 437	3358 ± 804	2242 ± 555	3138 ± 854	2600 ± 281
	12	2751 ± 1142	2697 ± 477	3274 ± 780	2079 ± 708	3000 ± 400	2752 ± 267
	Δ ₍₁₂₋₀₎	4%	1,3%	-2,5%	-7,3%	-4,4%	5,8%
Carboidratos (g)	0	297 ± 105 (43%)	313 ± 75 (47%)	389 ± 82 (46%)	258 ± 59 (46%)	353 ± 77 (45%)	293 ± 67 (45%)
	12	296 ± 194 (43%)	337 ± 63 (50%)	386 ± 77 (47%)	250 ± 88 (48%)	323 ± 47 (43%)	316 ± 65 (46%)
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-0,3%	7,7%	-0,8%	-3,1%	-8,5%	7,8%
Proteínas (g), (%)	0	113 ± 59 (17%)	106 ± 13 (16%)	142 ± 42 (17%)	89 ± 24 (16%)	118 ± 63 (15%)	96 ± 19 (15%)
	12	120 ± 59 (17%)	100 ± 11 (15%)	142 ± 43 (17%)	83 ± 33 (16%)	119 ± 60 (16%)	98 ± 29 (14%)
	Δ ₍₁₂₋₀₎	6,2%	-5,7%	0%	-6,7%	0,8%	2,1%
Lipídios (g), (%)	0	112 ± 41 (38%)	110 ± 17 (37%)	138 ± 39 (37%)	95 ± 31 (38%)	139 ± 40 (40%)	116 ± 20 (40%)
	12	121 ± 93 (40%)	105 ± 23 (35%)	129 ± 39 (36%)	83 ± 20 (36%)	137 ± 53 (41%)	122 ± 13 (40%)
	Δ ₍₁₂₋₀₎	8%	4,5%	-6,5%	-13%	-1,4%	5,1%
Colesterol (mg)	0	488 ± 202	611 ± 66	528 ± 167	445 ± 134	512 ± 196	621 ± 182
	12	474 ± 160	531 ± 90	536 ± 170	454 ± 128	561 ± 29	547 ± 172
	Δ ₍₁₂₋₀₎	-3%	-13%	1,5%	2%	9,6%	-12%
Ac. G. Saturados (g)	0	32 ± 8,8 (11%)	46 ± 6,0 (16%)	46 ± 17 (12%)	46 ± 8,8 (18%)	61 ± 14 (17%)	41 ± 12 (14%)
	12	37 ± 21 (12%)	50 ± 19 (17%)	43 ± 18 (12%)	44 ± 11 (19%)	57 ± 5,9 (17%)	40 ± 10 (13%)
	Δ ₍₁₂₋₀₎	16%	8,7%	-6,5%	-4,3%	-6,6%	-2,4%
Fibras (g)	0	19 ± 2,5	17 ± 4,0	20 ± 1,7	21 ± 3,5	19 ± 4,1	20 ± 1,8
	12	20 ± 4,7	19 ± 3,0	19 ± 2,9	20 ± 1,1	21 ± 4,5	18 ± 2,8
	Δ ₍₁₂₋₀₎	5,3%	12%	-5%	-4,8%	11%	-10%

Nota: os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Abreviações: IMC: índice de massa corporal.

Discussão

Sabe-se que os compostos fenólicos, como os flavonoides, contidos nos alimentos exercem ação efetiva sobre as bactérias intestinais, modulando o crescimento de espécies benéficas e reduzindo linhagens patogênicas. Assim, a identificação das bactérias intestinais no período pré-doença, como no pré-diabetes, fornece informações sobre a instalação e progressão da doença, e pode ser utilizado como uma ferramenta no monitoramento e na recuperação da MI (10). Assim, com o intuito de estabelecer possíveis benefícios do uso da Eriocitrina como um suplemento alimentar natural, este estudo avaliou as principais modificações da MI e parâmetros clínicos, metabólicos e bioquímicos relacionados, antes e após o tratamento com Eriocitrina (200 mg/dia) em indivíduos pré-diabéticos.

As avaliações realizadas pré-suplementação de Eriocitrina ou Placebo apontaram um perfil microbiológico homogêneo entre os grupos experimentais, todos constituídos por indivíduos pré-diabéticos e que receberam doses diárias de Eriocitrina ou Placebo. O perfil de AGCC nas fezes dos voluntários mostrou uma razão molar de ácido acético, butírico e propiônico de 66:20:14, respectivamente. Observa-se na literatura (49,50) que indivíduos obesos tendem a manter uma razão entre os ácidos graxos fecais de 60:20:20%, similar aos valores encontrados no presente estudo, em que os pacientes eram predominantemente obesos ou sobrepesados.

Foi ainda encontrado no período basal, e para todos os grupos de indivíduos, que a abundância relativa de bactérias intestinais se enquadrava majoritariamente no filo Firmicutes, família *Lachnospiraceae* e gênero *Blautia*, e

a proporção entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes foi de 98:2%. Estudos apontam a predominância de bactérias do filo Firmicutes como uma identidade da MI de indivíduos pré-diabéticos e obesos, sendo considerado por esse fato, um estado de disbiose intestinal (8,10,51). A maior abundância de bactérias desse filo faz com que a quebra de polissacarídeos, realizada por essas bactérias, resulte em uma maior extração de energia, e ao contrário do que ocorre com indivíduos magros, nos obesos essa energia é armazenada no tecido adiposo e não excretada pelas fezes, colaborando ainda mais para o processo de obesidade e disbiose (52,53).

A predominância de *Lachnospiraceae*, uma representante do filo Firmicutes está relacionada à distúrbios no metabolismo da glicose (54). Lippert et al, 2017 apontaram abundância aumentada dessa família entre indivíduos com desregulação glicêmica e síndrome metabólica (54) e Salonen et al, 2014 associaram a família *Lachnospiraceae* com obesidade relacionada à dieta (55). O gênero *Blautia*, membro da família *Lachnospiraceae*, identificado como o gênero mais abundante entre os participantes deste estudo, é composto por bactérias com potencial patogênico (54). Lippert et al, 2017 (54) apontaram correlação positiva deste gênero com os níveis séricos de glicose e insulina e Leclercq et al, 2014 (56) apresentaram uma associação do gênero *Blautia* com o aumento da permeabilidade intestinal, o que pode levar à Endotoxemia Metabólica e iniciar o processo que culmina no pré-diabetes (56). O perfil disbiótico apresentado pelos voluntários do estudo, com a presença de bactérias inflamatórias e alta abundância do filo Firmicutes, é comumente encontrado entre indivíduos com pré-diabetes, obesidade e síndrome metabólica (54).

Após o período de tratamento com Eriocitrina, foram identificados os indivíduos Respondedores a esse flavonoide como aqueles que reduziram pelo menos 5% a sua glicemia inicial com o tratamento. Aqueles que não reduziram, ou que aumentaram a glicemia de jejum, foram identificados como Não Respondedores à Eriocitrina. Apesar da homogeneidade da MI nos grupos, a família *Streptococcaceae* apresentou abundância relativa significativamente maior no grupo Respondedores, em relação ao grupo Controle, no início do estudo. Essa família está relacionada ao consumo elevado de gordura (57), o que poderia ser uma barreira ao grupo Respondedores em reduzir a glicemia de jejum mesmo com a suplementação de Eriocitrina. O gênero *Coprococcus* também apresentou abundância relativa maior nesses indivíduos em relação ao grupo Não-Respondedores. Bactérias desse gênero, junto a outras, apresentam características anti-inflamatórias (58,59) e são encontradas em indivíduos com um perfil de MI mais saudável (60). A abundância relativa maior de *Coprococcus* no grupo Respondedores, pode ter sido relevante para a redução do perfil glicêmico observado após o tratamento com Eriocitrina.

O perfil da MI está relacionado, além dos parâmetros bioquímicos, ao consumo alimentar (61). Assim no período basal, antes da suplementação de Eriocitrina ou Placebo, foi identificado alto consumo energético, com um excesso de aproximadamente 25% das necessidades energéticas dos indivíduos com sobrepeso e obesos, associado a alto consumo de ácidos graxos saturados (acima de 10%) e baixa ingestão de fibras (45). O alto consumo de gordura está associado à abundância de bactérias da família *Lachnospiraceae* (54). Alguns autores apontaram que a alta ingestão de gordura, junto à níveis elevados de gordura saturada, leva à diminuição de bactérias gram-negativas como

Bifidobacterium spp., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides* e *Eubacterium* (62,63), todos esses gêneros apresentaram baixa abundância relativa entre os pré-diabéticos desse estudo (dados não apresentados). O alto consumo energético, principalmente de gordura, leva à disbiose intestinal, tendo um impacto direto na glicemia, devido ao aumento de bactérias produtoras de LPS e alteração da estrutura das proteínas responsáveis pela junção da barreira intestinal, facilitando a permeabilidade do LPS para a corrente sanguínea, o que causa alterações no perfil glicêmico, através da Endotoxemia Metabólica (64-66).

Lambeth et al, 2015 (67) comparou a MI de diabéticos, pré-diabéticos e indivíduos metabolicamente saudáveis e sugeriu que a modulação da MI de pré-diabéticos poderia ter um impacto positivo evitando a transição para o DM2. Uma das alternativas de modular a MI em disbiose entre pré-diabéticos, com impacto no perfil metabólico, é através da alimentação, com a suplementação de flavonoides (24). Apesar dos flavonoides apresentarem como característica marcante a modulação da MI (68), como a atividade inibitória de bactérias pela hesperidina (69,70), propriedades anti-fúngicas das catequinas (71), ou modulação positiva das populações bacterianas intestinais pelas antocianinas (72), a suplementação com Eriocitrina parece ter provocado poucas alterações no perfil das bactérias intestinais desses indivíduos.

Para avaliar o impacto dessa flavanona no ambiente intestinal é preciso primeiramente entender seu metabolismo. Estudos com animais experimentais observaram que a Eriocitrina é hidrolizada pela MI antes de ser absorvida. Segundo Kuhnan, 1976 (73) e Hollman et al., 1997 (74) as espécies *Bacteroides distasonis* ou *Bacteroides uniformis* são responsáveis por hidrolisar a Eriocitrina

em Eriodictiol, enquanto que a espécie *Clostridium butyricum* converte o Eriodictiol em 3,4 Ácido Diidroxihidrocinâmico (3,4-DHCA). Em seguida, esses e outros metabólitos formados são transportados para o fígado ou rins, onde serão metabolizados em produtos secundários, como glucuronídeos e sulfatos, circulando para outros órgãos e/ou sendo excretados na urina ou fezes (36).

Além disso, estudo *in vitro* sugeriu que o Eriodictiol, um dos metabólitos da Eriocitrina, pode também ser degradado por bactérias intestinais, como as espécies *Eubacterium ramulus* (75) e *Clostridium orbiscindens* (76). Inicialmente, o Eriodictiol é degradado em ácido 3- (3', 4'-dihidroxifenil) propiônico, que é desidroxilado formando um isômero do ácido hidroxifenilpropiônico, o ácido fenilpropiônico, que é o principal produto fenólico final (37).

A espécie *Bacteroides uniformis* foi identificada tanto entre os voluntários que foram suplementados com Eriocitrina quanto os Controles, e houve diminuição de sua abundância relativa em todos os grupos, porém no grupo Respondedores a diminuição foi 22%, enquanto que no grupo Não Respondedores foi de 44% e Controles 82% ($p > 0.05$). Bactérias da espécie *Eubacterium ramulus* também foram identificadas, com aumento de 9% de sua abundância relativa após a suplementação de Eriocitrina, tanto no grupo Respondedores quanto no grupo Não Respondedores, e diminuição de 43% no grupo Controle ($p > 0.05$) (dados não apresentados).

Quanto ao ácido propiônico formado após degradação e desidroxilação do Eriodictiol, o grupo que respondeu à suplementação de Eriocitrina, apresentou um aumento de 8%, enquanto os outros grupos apresentaram diminuição na concentração desse ácido ($p > 0.05$). Isso pode ser um indicativo de um trabalho mais eficiente de hidrólise da Eriocitrina no grupo

Respondedores. O propionato tem a função de estimular a glicogênese intestinal (77) e com isso ativar circuitos neuronais intestinais do cérebro, exercendo assim um papel antidiabético (78). Estudos em ratos mostraram que o ácido propiônico tem a capacidade de estimular a secreção de GLP1 (79), porém nesse estudo, não foi observado diferenças significativas nos níveis de GLP1 entre os grupos Respondedores e Não Respondedores.

Apesar de termos detectado nos grupos de pacientes espécies de bactérias relacionadas ao metabolismo da Eriocitrina, e que provavelmente colaboraram pelas modestas alterações bioquímicas e metabólicas observadas, seria necessário, entretanto, ter uma rede complexa de diferentes espécies bacterianas para a biotransformação completa da Eriocitrina, o que está diretamente relacionado à variabilidade individual (68). Além disso, dentro do período experimental proposto de 12 semanas, que parece ser razoável para um estudo clínico, não foi suficiente para provocar modificação significativa das bactérias envolvidas no metabolismo da Eriocitrina, ocorrendo apenas variações modestas no ambiente intestinal.

Em relação a essas pequenas modificações, a família *Clostridiaceae* apresentou diminuição significativa de sua abundância relativa após suplementação de Eriocitrina no grupo Não Respondedores, neste grupo também houve aumento do gênero *Coprococcus*. O fato de o grupo Respondedores já ter iniciado o estudo com abundância relativa maior desse gênero, em relação ao grupo Não Respondedores, sugere que o perfil da MI inicial colaborou mais com os resultados positivos, em relação ao metabolismo glicêmico observado no grupo Respondedores, que o aumento de *Coprococcus* após a suplementação no grupo Não Respondedores.

Apesar de poucas diferenças significativas, apenas os grupos que foram suplementados com Eriocitrina apresentaram alterações na MI. Porém, mesmo que sem diferença estatística, algumas bactérias merecem destaque quanto ao percentual de aumento ou diminuição da abundância relativa após suplementação da Eriocitrina. No nível de filo, Bacteroidetes apresentou um aumento de aproximadamente 20% nos dois grupos que suplementaram Eriocitrina e diminuição de 58% no grupo Controle. O aumento das bactérias desse filo sugere uma melhora no perfil metabólico (5,6) e essa melhora foi identificada apenas no grupo Respondedores.

Em relação à família *Coriobacteriaceae*, relacionada à transformação química de polifenóis (80), um estudo realizado com indivíduos diabéticos, que consumiram kiwi por 12 semanas, mostrou estabilidade em relação à diversidade da MI, porém o aumento significativo na abundância relativa dessa família, refletiu em diminuição nos valores de HbA1c (81). No presente estudo, apenas o grupo Respondedores apresentou aumento no percentual de abundância relativa ($p > 0,05$) dessa família, enquanto que nos demais grupos, foi observado diminuição. Esse aumento pode estar relacionado ao metabolismo mais eficiente da Eriocitrina no grupo Respondedores, que no caso deste estudo, refletiu na diminuição da glicemia de jejum.

A família *Ruminococcaceae* apresentou um aumento maior na abundância relativa ($p > 0,05$) no grupo Respondedores e isso pode ser explicado pelo fato dessas bactérias apresentarem relação inversa com marcados de doenças inflamatórias (54), ou seja, o aumento do percentual de abundância relativa de bactérias dessa família pode ter sido um dos contribuintes para a melhora do perfil glicêmico no grupo Respondedores.

Em relação aos gêneros, ao analisar os grupos que suplementaram Eriocitrina, observamos aumento no percentual de bactérias do gênero *Faecalibacterium* e diminuição no grupo Controle ($p>0,05$), essas bactérias estão relacionadas à manutenção da integridade da barreira intestinal e estudos apontam baixa abundância desse gênero entre indivíduos diabéticos (82-84). Entre os *Lactobacillus*, apenas o grupo Respondedores apresentou diminuição de 51% ($p>0,05$). Alguns estudos apontam que espécies desse gênero se correlacionam positivamente com a glicemia de jejum e níveis de HbA1c (7,8,83), sendo sua diminuição, neste estudo, condizente com a resposta glicêmica apresentada pelo grupo que respondeu à suplementação de Eriocitrina.

Prevotella e *Ruminococcus*, são dois gêneros que estão relacionados à quantidade de fibras alimentares e melhora do metabolismo glicêmico (18,85,86). Apesar do consumo desse nutriente não ter alterado após 12 semanas de intervenção, os grupos que suplementaram Eriocitrina - Respondedores e Não Respondedores, apresentaram aumento ($p>0,05$), enquanto que o grupo Controle apresentou diminuição no percentual de abundância relativa desses dois gêneros. Ou seja, mesmo que a ingestão de fibras não tenha aumentado, a flavanona Eriocitrina pode ter feito papel semelhante das fibras e apenas no grupo Respondedores o aumento desses gêneros pode ter colaborado na melhora do perfil glicêmico.

O consumo alimentar é um ponto chave ao analisar a intervenção ocorrida por 12 semanas nesse estudo. Os supostos benefícios da suplementação de Eriocitrina, principalmente no perfil da MI, teve como maior barreira o alto consumo energético e de ácidos graxos saturados, associados a baixa quantidade de fibras. Hábitos alimentares são positivamente correlacionados

com a MI em humanos, tanto na sua diversidade quanto composição (60). Uma dieta com excesso de gordura saturada altera a composição da parede intestinal desencadeando o processo que leva à Endotoxemia Metabólica (87,64-66). Ao mesmo tempo, o consumo inadequado de fibras pode prejudicar a biodisponibilidade e o metabolismo de flavonoides na MI (88).

Em relação ao perfil bioquímico, houve aumento das enzimas hepáticas AST e ALT no grupo Respondedores e aumento da também enzima hepática gama GT no grupo Não Respondedores, após 12 semanas de estudo, porém os valores permaneceram clinicamente adequados. Já as outras enzimas hepáticas avaliadas, assim como marcadores da função renal e do perfil lipídico dos voluntários, não apresentaram alterações significativas evidenciando que a suplementação de Eriocitrina não foi prejudicial, nem tóxica.

A suplementação de Eriocitrina também não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Marcadores inflamatórios como *tumor necrose fator α* (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR) associados à baixa concentração de adiponectina, estão relacionados à resistência insulínica (89). As endotoxinas, liberadas por bactérias gram-negativas são as principais responsáveis pelo processo de resistência à insulina associada à MI, são responsáveis por ativar a cascata inflamatória de NF κ B, por meio da fosforilação da quinase I κ B (90). O consumo de polifenóis inibe essa fosforilação para que o processo inflamatório seja atenuado (90). Monagas et al, 2009 (91) relatou também em seu estudo a capacidade de alguns metabólitos fenólicos, após metabolizados pela MI, em atenuar o estado inflamatório, inibindo a secreção de TNF- α , IL-6 entre outras citocinas inflamatórias (91).

Apesar de sua conhecida função como antioxidante (30,32,35), neste estudo, indicadores relacionados a esse processo, como avaliação da capacidade antioxidante e peroxidação lipídica, não apresentaram alterações significativas.

Em relação ao perfil hormonal, no estudo de Ribeiro et al, 2019 (38), o hormônio incretina GLP1 mostrou aumento de 15% com a suplementação de Eriocitrina, sendo um dos principais mecanismos pelo qual o perfil glicêmico apresentou resultados positivos. Neste estudo, tanto o grupo Respondedores quanto Não Respondedores apresentaram aumento no percentual, enquanto o grupo Controle apresentou diminuição, porém sem significância estatística. A MI tem influência (positiva ou negativa) na expressão desse hormônio por diferentes mecanismos: primeiro por ser liberado por células enteroendócrinas, a fermentação das fibras pode aumentar essas células, auxiliando no aumento da secreção do GLP1 (92-94). Outro mecanismo, também com efeito positivo, é pela presença de um grupo de bactérias redutoras de sulfato e produtoras de sulfeto de hidrogênio, que podem estimular diretamente a secreção de GLP1 intestinal (95). Alguns mecanismos apontam efeitos negativos da MI na secreção de GLP1, como a ação de bactérias em células mioentéricas, diminuindo a expressão do receptor de GLP1, promovendo motilidade gastrointestinal (97), ou ainda através de um conjunto específico de bactérias do íleo que prejudicam o eixo intestino-cérebro ativado por GLP1, levando à resistência desse hormônio (97). Todos os mecanismos apontam para a importância de uma MI eubiótica para que o GLP1 haja de forma eficiente no controle glicêmico.

Apesar da homogeneidade identificada entre os indivíduos do estudo em relação à composição de bactérias intestinais, a MI é tida como uma impressão

digital, única de cada indivíduo, tendo cada indivíduo sua própria “assinatura intestinal” (98,9) e a literatura aponta que variações interindividuais no metabolismo das flavanonas (100) e na capacidade de bioconversão da MI de cada indivíduo tem influencia na produção dos metabólitos finais, impactando na sua biodisponibilidade (98,99). Brunkwall et al, 2017 (101) sugerem que deve ser feita uma abordagem nutricional personalizada, com uma sinergia entre dieta, probióticos e MI para resultados mais promissores no que diz respeito a modulação da MI e controle glicêmico.

Finalmente, os hábitos alimentares dos participantes do estudo, caracterizado por um excesso do consumo energético, alto consumo de ácidos graxos saturados e baixo consumo de fibras, além de colaborar por uma MI ainda mais disbiótica, certamente contribuiu para um efeito menos evidente da Eriocitrina sobre as bactérias intestinais.

Ponto forte desse estudo foi a administração regular da Eriocitrina em drágeas de concentração conhecida, ou seja, como um nutracêutico, durante um período de tempo moderado (12 semanas). Diferentemente, uma intervenção dietética por meio de um alimento fonte do flavonoide poderia confundir a interpretação dos resultados devido a complexidade da matriz alimentar, além do comportamento dietético individual. Outro ponto positivo são que os participantes apresentavam condição de saúde bastante similar, sendo todos classificados como pré-diabéticos sem uso de hipoglicemiantes. O uso de medicamentos hipoglicemiantes comprovadamente altera a composição da MI (102-104), e eventualmente poderia confundir os efeitos esperados pelo uso da Eriocitrina.

Conclusão

A suplementação com Eriocitrina teve efeitos limitados sobre a MI intestinal em indivíduos pré-diabéticos, com poucas alterações nas famílias e gêneros das bactérias intestinais. Provavelmente a condição metabólica pré-diabética basal e o consumo de dieta hipercalórica, com alta quantidade de ácidos graxos saturados e baixa em fibras, durante o tratamento, foram fatores determinantes da manutenção da disbiose, não favorecendo a ação da Eriocitrina no intestino. Sugere-se assim que a suplementação de Eriocitrina deva ser associada a um padrão alimentar mais saudável para obter uma ação mais efetiva do nutraêutico sobre a MI.

Referências

1. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>.
2. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. 2009; 15(13): 1546-58. doi: 10.2174/138161209788168164.
3. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016; 8(1):51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
4. Plotkin BJ, Viselli SM. Effect of insulin on microbial growth. *Curr Microbiol.* 2000; 41(1): 60–4. doi: 10.1007/s002840010092.
5. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in lactobacillus in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS ONE.* 2009; 23(4): e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125.
6. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009; 457(7228): 480-4. doi: 10.1038/nature07540.
7. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085.
8. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* 2013; 498(7452): 99–103. doi: 10.1038/nature12198.
9. Remely M, Dworzak S, Hippe B, Zwieler J, Aumüller E, Brath H, et al. Abundance and diversity of microbiota in type 2 diabetes and obesity. *J Diabetes Metab.* 2013; 4:3. doi: 10.4172/2155-6156.1000253.
10. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71108. doi: 10.1371/journal.pone.0071108.
11. Burcelin R. Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease. *Mol. Metab.* 2016; 5(9): 771–81. doi: 10.1016/j.molmet.2016.05.016.
12. Gomes JMG, Costa JA.; Alfenas RCG. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism.* 2017; 68: 133–144. doi: 10.1016/j.metabol.2016.12.009.
13. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; (209): 251–73. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3_11.
14. Neyrinck AM, Schüppel VL, Lockett T, Haller D, Delzenne NM. Microbiome and metabolic disorders related to obesity: Which lessons to learn from experimental models?. *Trends in Food Science & Technology.* 2016; 57: 256-264. doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.012.

15. Torres S, Fabersani E, Marquez A, Gauffin-Cano P. Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. *European Journal of Nutrition*. 2018; 58(1): 27-43. doi: 10.1007/s00394-018-1790-2.
16. Zhi C, Huang J, Wang J, Cao H, Bai Y, Guo J, et al. Connection between gut microbiome and the development of obesity. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019; 38(11):1987–98. doi: 10.1007/s10096-019-03623-x.
17. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011; 334(6052): 105–8. doi: 10.1126/science.1208344.
18. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2013; 505(7484): 559-63. doi: 10.1038/nature12820.
19. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinction in the gut microbiota compounds over generations. 2016; 529(7585): 212–5. doi: 10.1038/nature16504.
20. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*. 2008; 6(11): e280. doi: 10.1371/journal.pbio.0060280.
21. Ji Y, Sun S, Goodrich JK, Kim H, Poole AC, Duhamel GE, et al. Diet-induced alterations in gut microflora contribute to lethal pulmonary damage in TLR2/TLR4-deficient mice. *Cell Rep*. 2014; 8(1): 137–49. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.040.
22. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(31):11070–5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
23. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006. doi: 10.1038/4441022a.
24. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(11):5315–21. doi: 10.1021/jf0009293.
25. Vollmer M, Esders S, Farquharson FM, Neugart S, Duncan SH, Schreiner M, et al. Mutual Interaction of Phenolic Compounds and Microbiota: Metabolism of Complex Phenolic Apigenin-C- and Kaempferol-O-Derivatives by Human Fecal Samples. *J Agric Food Chem*. 2018;66(2): 485–97. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04842.
26. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*. 2010; 11(4): 1365–402. doi: 10.3390/ijms11041365.
27. Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Isolation of Eriocitrin (Eriodictyol 7-rutinoside) from Lemon Fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and Its Antioxidative Activity. *Food Sci Technol Int Tokyo*. 1997; 3(1): 84–9. <https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.3.84>.

28. Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T. Isolation of C-Glucosylflavone from Lemon Peel and Antioxidative Activity of Flavonoid Compounds in Lemon Fruit. *J Agric Food Chem.* 1997; 45(12): 4619–23. <https://doi.org/10.1021/jf970498x>.
29. Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T. Characteristics of Antioxidative Flavonoid Glycosides in Lemon Fruit. *Food Sci Technol Int Tokyo.* 1998; 4(1): 48–53. <https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.4.48>.
30. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids.* 1998; 33(7): 689–95. doi: 10.1007/s11745-998-0258-y.
31. Tanaka T, Oka T, Shimada Y, Umemoto N, Kuroyanagi J, Sakamoto C, et al. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: Pharmacogenomic network of cardiovascular disease models. *J Pharmacol Sci.* 2008; 107(1): 8–14. doi: 10.1254/jphs.08r03fm.
32. Li L, Feng X, Chen Y, Li S, Sun Y, Zhang L. A comprehensive study of eriocitrin metabolism in vivo and in vitro based on an efficient UHPLC-Q-TOF-MS/MS strategy. *RSC Adv.* 2019;9(43):24963–80. doi: 10.1039/C9RA03037A
33. Hajimahmoodi M, Moghaddam G, Mousavi SM, Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B. Total antioxidant activity, and hesperidin, diosmin, eriocitrin and quercetin contents of various lemon juices. *Trop J Pharm Res.* 2014; 13(6): 951–6. doi: 10.4314/tjpr.v13i6.18.
34. Miyake Y, Suzuki E, Ohya S, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, et al. Lipid-lowering effect of eriocitrin, the main flavonoid in lemon fruit, in rats on a high-fat and high-cholesterol diet. *J Food Sci.* 2006; 71(9). high-fat and high-cholesterol diet. *J Food Sci.* 2006; 71(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00192.x>.
35. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, Inoue T, Katagiri T, Zang L, et al. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci Rep.* 2014;4: 3708. doi: 10.1038/srep03708.
36. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinase N, Osawa T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of Eriocitrin-treated rats. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(8): 3217–24. doi: 10.1021/jf990994g.
37. Mosele JI, Martín-Peláez S, Macià A, Farràs M, Valls RM, Catalán U, et al. Study of the catabolism of thyme phenols combining in vitro fermentation and human intervention. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(45): 10954-61. doi: 10.1021/jf503748y.
38. Ribeiro CB, Ramos FM, Manthey JA, Cesar TB. Effectiveness of Eriomin® in managing hyperglycemia and reversal of prediabetes condition: A double-blind, randomized, controlled study. *Phytother Res.* 2019; 33(7):1921-1933. doi: 10.1002/ptr.6386.
39. Yari Z, Movahedian M, Imani H, Alavian SM, Hedayati M, Hekmatdoost A. The effect of hesperidin supplementation on metabolic profiles in patients with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Nutr.* 2019. 59(6): 2569-77. doi: 10.1007/s00394-019-02105-2.

40. Friedwald WT, Levy RI, Friedrickson DS. Estimation of concentration of LDL cholesterol in plasma without preparation or ultracentrifugation. *Clinical Chemistry*. 1972; 18(6): 499–502. PMID: 4337382.
41. Matthews D, Hosker JP, Rudenski, AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from man. *Diabetologia*. 1985; 28(7): 412–9. doi: 10.1007/BF00280883.
42. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in sérum or plasma. *Methods in Molecular Biology*. 1998; 108: 101–6. doi: 10.1385/0-89603-472-0:101.
43. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 26(9-10): 1231–7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
44. World Health Organization. Section 5: Collecting Step 2 Data: Physical Measurements. Available online: http://www.who.int/chp/steps/Part3_Section5.pdf?ua=1 (accessed on 18 January 2021).
45. Padovani RM, Maya-Farfan J, Colugnati FAB, Domene SMA. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Rev. Nutr.* 2006; 19(6): 741-60. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000600010>.
46. Barroso et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2020. doi: 10.36660/abc.20201238.
47. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285(19): 2486-97. doi: 10.1001/jama.285.19.2486.
48. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. 2017; 109(2 suppl 1): 1-76.
49. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006; 444(7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414.
50. Fernandes J, Su W, Rahat-Rozenbloom S, Wolever TMS. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. *Nutr. Diabetes*. 2014; 4(6): e121. doi: 10.1038/nutd.2014.23.
51. Caporaso JG, Lauber LC, Walters AW, Berg-Lyons B, Huntley J, Fierer N. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012; 6(8):1621–4. doi: 10.1038/ismej.2012.8.
52. Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids Health Dis*. 2016; 15: 108–16. doi: 10.1186/s12944-016-0278-4.
53. Davis CD. The gut microbiome and its role in obesity. *Nutr Today*. 2016; 51(4): 167–74. doi: 10.1097/NT.000000000000167.

54. Lippert K, Kedenko L, Antonielli L, Kedenko I, Gemeier C, Leitner M. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef Microbes*. 2017;8(4): 545-56. doi: 10.3920/BM2016.0184.
55. Salonen A, Lahti L, Salojärvi J, Holtrop G, Korpela K, Duncan SH, Date P. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J*. 2014; 8(11): 2218–30. doi: 10.1038/ismej.2014.63.
56. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2014; 111(42): E4485-93. doi: 10.1073/pnas.1415174111.
57. Zeng H, Ishaq SL, Zhao FQ, Wright ADG. Colonic inflammation accompanies an increase of β -catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice. *J Nutr Biochem*. 2016; 35: 30-36. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.05.015.
58. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol*. 2010; 12(2): 304–14. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x.
59. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Fems Microbiol Lett*. 2009; 294(1): 1–8, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x.
60. da Silva TF, Casarotti SN, de Oliveira GLV, Penna ALB. The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021; 61(2): 337-355. doi: 10.1080/10408398.2020.1733483.
61. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991; 70(6): 443–59. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x.
62. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991; 70(6): 443–59. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x.
63. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017; 15(1):73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
64. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. 2008; *Diabetes* 57:1470–81. doi: 10.2337/db07-1403.
65. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin. Transl. Gastroenterol*. 2016; 7(10): e196. doi: 10.1038/ctg.2016.54.
66. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 2001; 292: 1115–1118. doi: 10.1126/science.1058709.

67. Lambeth SM, Carson T, Lowe J, Ramaraj T, Leff JW, Luo L. Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes.* 2015; 2(3): 1-7. doi: 10.15436/2376-0949.15.031.
68. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:905215. doi: 10.1155/2015/905215.
69. Bakar NS, Zin NM, Basri DF. Synergy of flavone with vancomycin and oxacillin against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012; 25(3): 633–638. PMID: 22713953.
70. Bae EA, Han MJ, Kim DH. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Medica.* 1999; 65(5): 442–443. doi: 10.1055/s-2006-960805.
71. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British Journal of Pharmacology.* 2013; 168(5): 1059–73. doi: <https://doi.org/10.1111/bph.12009>.
72. Hidalgo M, Oruna-Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JPE, et al. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012; 60(15): 3882–90. doi: 10.1021/jf3002153.
73. Kuhn J. The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 1976; 24: 117-91. PMID: 790781.
74. Hollman PCH, Trijp JMP, Buysman MNCP, Gaag MS, Mengelers MJB, Vries JHM, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various in man. *FEBS Lett.* 1997; 418(1-2): 152-6. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01367-7.
75. Schneider H, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Arch. Microbiol.* 2000; 173(1): 71–5. doi: 10.1007/s002030050010
76. Schoefer L, Mohan R, Schwiertz A, Braune A, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(3): 5849–54. doi: 10.1128/aem.69.10.5849-5854.2003.
77. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell.* 2014; 156(1-2): 84–96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016.
78. Mithieux G, Gautier-Stein A. Intestinal glucose metabolism revisited. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2014; 105(3): 295–301. doi: 10.1016/j.diabres.2014.04.008.
79. Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, et al. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes.* 2015; 39(3): 424–9. doi: 10.1038/ijo.2014.153.

80. Clavel T, Lepage P, Charrier C. The family coriobacteriaceae. In *The Prokaryotes*, 4th ed.; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer International Publishing: Berlin, Germany, 2014; pp. 201–238.
81. Wilson R, Willis J, Geary RB, Hughes A, Lawley B, Skidmore P. SunGold Kiwifruit Supplementation of Individuals with Prediabetes Alters Gut Microbiota and Improves Vitamin C Status, Anthropometric and Clinical Markers. *Nutrients*. 2018; 12;10(7):895. doi: 10.3390/nu10070895.
82. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014; 63(9): 1513-21. doi: 10.1136/gutjnl-2014-306928.
83. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012; 480(7418): 55-60. doi: 10.1038/nature11450.
84. Blandino G, Inturri R, Lazzara F, Di Rosa M, Malaguarnera L. Impact of gut microbiota on diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 2016; 42(5): 303-15. doi: 10.1016/j.diabet.2016.04.004.
85. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X. Dominant and dietresponsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011; 5(2): 220–30. doi: 10.1038/ismej.2010.118.
86. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T. et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015; 22(6) 971–82. doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.001.
87. Neves AL, Coelho J, Couto L, Leite-Moreira A, Roncon-Albuquerque R. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J Mol Endocrinol*. 2013; 51(2): R51–64. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0079>.
88. Cassidy A, Minihane AN. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am. J. Clin. Nutr*. 2017;105(1): 10-22. doi: 10.3945/ajcn.116.136051.
89. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4:93. doi: 10.3389/fendo.2013.00093.
90. Santino A, Scarano A, De Santis S, De Benedictis M, Giovinazzo G, Chieppa M. Gut Microbiota Modulation and Anti-Inflammatory Properties of Dietary Polyphenols in IBD: New and Consolidated Perspectives. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(16): 2344-51. doi: 10.2174/1381612823666170207145420.
91. Monagas M, Khan N, Andrés-Lacueva C, Urpí-Sardá M, Vázquez-Agell M, Lamuela-Raventós RM, et al. Dihydroxylated phenolics acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br. J. Nutr*. 2009; 102(2): 201-6. doi: 10.1017/S0007114508162110.

92. Piche T, des Varannes SB, Sacher-Huvelin S, Holst JJ, Cuber JC, Galmiche JP. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 2003; 124(4) :894–902. doi: 10.1053/gast.2003.50159.
93. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagonlike peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr*. 2004; 92(3):521–6. doi: 10.1079/BJN20041225.
94. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*. 2006; 55(5):1484–90. doi: 10.2337/db05-1360.
95. Pichette J, Fynn-Sackey N, Gagnon J. Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of GLP-1 and improves glycemia in male mice. *Endocrinology*. 2017; 158(10) :3416–25. doi: 10.1210/en.2017-00391.
96. Yang M, Fukui H, Eda H, Kitayama Y, Hara K, Kodani M, et al. Involvement of gut microbiota in the association between gastrointestinal motility and 5HT expression/M2 macrophage abundance in the gastrointestinal tract. *Mol Med Rep*. 2017; 16(3):3482–8. doi: 10.3892/mmr.2017.6955.
97. Grasset E, Puel A, Charpentier J, Collet X, Christensen JE, Tercé F, et al. A specific gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces GLP-1 resistance through an enteric NO-dependent and gut-brain axis mechanism. *Cell Metab*. 2017; 25(5):1075-90. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.013.
98. Selma MV, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J. Agric. Food Chem*. 2009, 57(15): 6485–501. doi: 10.1021/jf902107d.
99. Duda-Chodak A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J. Physiol. Pharmacol*. 2012; 63(5): 497–503. PMID: 23211303.
100. Stevens Y, Rymenant EV, Grootaert C, Van Camp J, Possemiers S, Masclee A, et al. The Intestinal Fate of Citrus Flavanones and Their Effects on Gastrointestinal Health. *Nutrients*. 2019;11(7):1464. doi: 10.3390/nu11071464.
101. Brunkwall L, Orho-Melander M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia*. 2017; 60(6): 943-51. doi: 10.1007/s00125-017-4278-3.
102. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015; 528(7581): 262–6. doi: 10.1038/nature15766.
103. Cabreiro F. Metformin joins forces with microbes. *Cell Host Microbe* 2016; 19(1):1–3. doi: 10.1016/j.chom.2015.12.012.

104. Vera IM, Tapia MS, López LN, Portillo OG, Cruz MG, López AF. A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2019; 45(2): 122-31. doi: 10.1016/j.diabet.2018.09.004.

Considerações Finais

O pré-diabetes é uma enfermidade que tem impacto direto no perfil de bactérias do intestino, porém a modulação do ambiente intestinal tem também impacto direto na melhora do estado metabólico no pré-diabetes, tendo-se assim a oportunidade de reversão dessa condição.

As flavanonas têm sido amplamente estudadas quanto a essa modulação, porém a influência que os hábitos alimentares exercem na MI, além da alta variabilidade do perfil intestinal interindividual, faz com que a suplementação dessa classe de flavonoides não seja tão evidente.

Intervenções individualizadas e o controle alimentar são caminhos que podem ultrapassar a barreira entre MI disbiótica e impacto positivo na MI intestinal com reflexo no perfil metabólico de indivíduos pré-diabéticos.