



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

IBB/IBILCE



TESE DE DOUTORADO

**Fermentação *in vitro* no mapeamento de atividade prebiótica em produtos de
origem vegetal**

Fábio Perez Ferraz de Mello

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas
IBB/IBILCE



TESE DE DOUTORADO

**Fermentação *in vitro* no mapeamento de atividade prebiótica em produtos de
origem vegetal**

Fábio Perez Ferraz de Mello

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas – IBB/IBILCE

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Mello, Fabio Perez Ferraz de.

Fermentação *in vitro* no mapeamento de atividade prebiótica em produtos de origem vegetal / Fabio Perez Ferraz de Mello. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Capes: 21001006

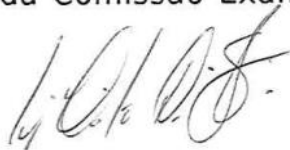
1. Fermentação. 2. Microbioma Gastrointestinal. 3. Prebióticos.

Palavras-chave: Fermentação *in vitro*; Microbiota intestinal; Prebióticos.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE FÁBIO PEREZ FERRAZ DE MELLO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Instituto de Biociências, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de FÁBIO PEREZ FERRAZ DE MELLO, intitulada **Fermentação in vitro no mapeamento de atividade prebiótica em produtos de origem vegetal**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, Profa. Dra. MARIA RITA MARQUES DE OLIVEIRA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Humanas e Ciências da Nutrição e Alimentação / Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. LIGIA YUKIE SASSAKI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica Médica Geral / Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB/UNESP, Professor Doutor CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ (Participação Presencial) do(a) Departamento de Cirurgia / Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Dr. RICARDO LUIS ARAÚJO DIAS (Participação Virtual) do(a) Setor Industrial / Verum Ingredients. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI



Luiz Claudio Di Stasi
Professor Titular - Farmacologia
IB-UNESP - Botucatu



Agradecimentos

Este trabalho só pode ser realizado com a ajuda de muitos amigos e colegas, muitos destes que foram essenciais para seguir no caminho do aprendizado sem mesmo estarem conscientes disto.

Sou grato pela parceria realizada com a empresa Verum Ingredients do Brasil, Ricardo e Luciana por propiciar ambientes de discussões ricas e diversas, apoio financeiro, científico, além da oportunidade.

Agradeço imensamente aos companheiros do Laboratório de Fitomedicamentos Farmacologia e Biotecnologia pelas incessantes horas de trabalho compartilhado, risadas, histórias e aprendizado. Agradeço especialmente ao Luiz Domingues por toda dedicação no ensino de técnicas analíticas e visão de um mundo molecular, bem como Ana Quaglio por toda infindável paciência em todos os embates científicos, análise molecular e lapidação deste trabalho e do profissional que o realizou.

Agradeço aos servidores do Departamento de Biofísica e Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu: Cristina, Paulo, Luiz, Hélio, Janete e Giovana por todo apoio institucional e manutenção necessária para a realização das tarefas mais simples às mais complexas.

Agradeço aos companheiros do grupo de pesquisa “Farmacologia de Produtos Naturais”, em especial ao Professor Julio Gálvez por me receber em seu grupo, Antonio, Mari, Maycon, Alba e Maria Helena por todo acolhimento, paciência e ensinamentos.

O processo de doutoramento é fruto de uma caminhada que se iniciou há muito tempo, influenciado por diversas pessoas com as quais meu caminho cruzou e um pouco desse encontro permaneceu. Uma dessas pessoas é o Professor Jairo Giacomini, que me inspirou a curiosidade científica e também a pensar sobre a magnitude do universo de um modo curiosamente simples, muito obrigado! Bem como todos os demais educadores que tive ao longo da vida e forneceram ferramentas para discernir, obrigado. Obrigado Paula por acreditar na minha capacidade e pelo apoio para

ingressar no ensino superior. Agradeço, e muito, aos camaradas da República Bagudos, uma família escolhida que me acompanha até o presente e na qual nos fortalecemos. Agradeço também ao Professor José Ricardo e todo o Laboratório de Biomagnetismo por me receber e apoiar nos primeiros passos científicos.

Nossa forma de pensar, absorver experiências e expressá-las depende de fatores que vão muito além da sala de aula, deste modo, o convívio com amigos de diferentes universos foi imprescindível na formação do modo como vejo o mundo. Agradeço imensamente à Dra. Doris por me contagiar com uma forma terna, respeitosa e extremamente cuidadosa de ver o ser humano. Agradeço aos companheiros de música, em especial das bandas Hendrix Power Trio e Black Pardais por serem fundamentais na expressão mais sutil da percepção humana. Agradeço à família Sun pelo acolhimento e por serem uma referência de riqueza na simplicidade. Agradeço especialmente ao amigo Dennis Ryuiti Nakajima por compartilhar espaço, ideias, paciência e fornecer uma importante visão de mundo ao longo de boa parte do doutorado. Bem como agradeço e muito aos amigos de longa data: Matheus, Guilherme, Jairo, Thiago por serem uma referência de para onde seguir.

Imenso e especial sentimento de gratidão pela minha família, minha mãe pelo apoio incondicional desde sempre, meu pai por todas as longas conversas e conselhos, minha vó por toda a base que sempre foi, irmãos pelo apoio mútuo em diferentes momentos e tios pelas boas influências.

Um sincero, profundo e especial agradecimento ao Professor Di Stasi, pela oportunidade, companheirismo e por contagiar com um extremo senso de justiça e perseverança na trajetória científica. Muito mais que isso, por ter toda a paciência e sabedoria de um mestre, ensinar pelo exemplo, viabilizar, permitir que as situações sejam didáticas por si só e tantos outros atributos que me fogem à capacidade de sintetizar em palavras. Obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - 88887.657632/2021-00.

Agradeço à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro através do projeto PIPE (processo número: 2020/11699-9) em parceria com a empresa Verum Ingredients do Brasil.

Prólogo

Nascido e criado em Ipaussu, pequena cidade do interior de São Paulo tive minha primeira oportunidade de formação em um curso técnico de eletrônica, que também gerou a primeira oportunidade de emprego. Durante esta etapa uma dúvida simples - “por que o coração não entra em fadiga?” - me motivou a seguir com os estudos e mudar de área. Após esforços, e apoio de muitas pessoas, ingressei no curso de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP (2012-2016) durante o qual realizei estágio de iniciação científica na área de biofísica do trato gastrointestinal. A persistente curiosidade sobre a natureza de nossos organismos me levou a cursar uma especialização em Laboratório em Metabolismo Nutricional (2017-2018) e outra em Acupuntura (2017-2019) que me ampliaram a visão em termos saúde humana e abordagens múltiplas no estilo de vida, trajetória esta culminou na busca por novas perguntas no contexto das plantas medicinais e alimentos funcionais.

Atividades realizadas ao longo do doutorado (2019-2023)

1. Disciplinas cursadas

Disciplina	Ano	Conceito
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2019	A
Metabolismo Energético	2019	A
Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Montagem e Anotação de transcriptomas	2019	A
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2019	A
Mediadores da Resposta Inflamatória	2019	A
Farmacologia, Biotecnologia e Sociedade	2020	A
O cientista e o professor universitário	2019	A
Imunomodulação por produtos naturais	2019	A
Tópicos especiais em Biologia Geral e Aplicada: Tópicos especiais sobre a melatonina: síntese, mecanismos de ação e propriedades terapêuticas	2019	A
Sociologia dos desastres	2020	A
Farmacologia e Sociedade *	2018	A
Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Alimentos Funcionais*	2018	A

Farmacologia e Sociedade *	2018	A
O cientista e o professor universitário*	2018	A
Imunomodulação por produtos naturais	2019	A
Tópicos especiais em Biologia Geral e Aplicada: Tópicos especiais sobre a melatonina: síntese, mecanismos de ação e propriedades terapêuticas	2019	A

*Disciplinas cursadas antes do ingresso na pós-graduação e aproveitadas como aluno especial

2. Participação em eventos científicos presenciais

Evento	Ano
Congresso Brasileiro de Nutrologia	2019
Congresso Médico Acadêmico de Acupuntura	2019
II Simpósio Internacional em Investigações Químico-Farmacêuticas	2019
9 th World Congress on Targeting Microbiota – Título do resumo: Peel, pulp and whole green dwarf banana (Musa sp AAA) modulate gut microbiota in an <i>in vitro</i> fermentation assay	2022

3. Formação Complementar

- Programa de Doutorado Sanduíche do Exterior/CAPES- Projeto: Avaliação da atividade farmacológica de subprodutos vegetais e seus metabólitos derivados da microbiota intestinal em culturas celulares. Universidade de Granada – Espanha (2022-2023).

4. Publicações

Artigo

Calabresi, MFF; Tanimoto, A; Prospero, AG; **Mello, FPF**; Soares, G; Di Stasi, LC; Miranda, JRA. Changes in colonic contractility in response to inflammatory bowel disease: long-term assessment in a model of TNBS-induced inflammation in rats. *Life Sciences*. 2019. 236. 116833

Capítulo de livro

De Mello, FP; Orçati, MZ; Almeida-Junior, LD; Di Stasi LC. Isolated Bioactive Compounds. In: *Natural Plant Products in Inflammatory Bowel Diseases*. 1st ed. Elsevier. 2023. ISBN: 9780323991124

5. Colaboração em outros projetos de pesquisa

- Estudos de fermentação *in vitro* da banana nanica verde (*Musa sp AAA*) e seus efeitos prebiótico e modulador da microbiota intestinal. (Mariah Zajankauskass Orçati – Estágio de iniciação científica – 04/2021 - 12/2021)
- Avaliação da atividade prebiótica do resíduo da cultura do café (*Coffea arabica*) via produção de ácidos graxos de cadeia curta em processo de fermentação *in vitro* (Julia Aguiar da Costa Petry – Trabalho de conclusão de curso 2020-21)

6. Outras atividades

- Palestra: Medicina Tradicional Chinesa. Grupo de agroecologia Timbó (2019 – 2 horas)
- Representação Discente em Programa de Pós-graduação (2019)
- Representação Discente em Programa de Pós-graduação – Suplente (2020)
- Apoio em Pós-graduação *Latu sensu* em Acupuntura – Coordenador de Turma – Centro de Estudos em Terapias Naturais – CETN (2019-2021 – 288 horas)
- Professor voluntário em projeto de extensão Athena (IBB/UNESP) – Cursinho pré-universitário na disciplina de química (2019-2020 – 51 horas)
- Oficina de auriculoterapia – Disciplina de Terapêutica Médica FMB/UNESP (2021 – 4 horas)
- Oficina de auriculoterapia - Disciplina de Terapêutica Médica FMB/UNESP (2020 – 4 horas)
- Organização do III Curso de Inverno de Farmacologia e Biotecnologia - IBB/UNESP (2019)
- Organização do X Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – IBB/UNESP (2021)
- Organização do XI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia - IBB/UNESP (2022)

Sumário

Resumo.....	12
Prefácio.....	16
Capítulo 1.....	29
Introdução.....	29
Objetivo.....	32
Metodologia.....	32
Resultados.....	37
Discussão.....	49
Conclusão.....	53
Referência.....	54
Capítulo 2.....	59
Introdução.....	59
Objetivo.....	60
Metodologia.....	60
Resultados.....	66
Discussão.....	80
Conclusão.....	83
Referência.....	84
Capítulo 3.....	85
Introdução.....	85
Objetivo.....	85
Metodologia.....	86
Resultados.....	90

Discussão	104
Conclusão	105
Referência	108
Considerações finais.....	110
Posfácio	110
Referências.....	114

Resumo: Recentes mudanças nos padrões alimentares, tais como o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados ricos em açúcares e gorduras e pobres em fibras alimentares, estão associadas ao aumento da incidência de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) como a Doença Inflamatória Intestinal. Estes quadros são frequentemente associados à disbiose, que se caracteriza pela alteração da microbiota intestinal em número e variedade de espécies de bactérias, que em condições normais estabelecem uma relação benéfica com o organismo, fornecendo proteção contra patógenos e gerando metabólitos importantes para a saúde humana, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) acetato, propionato e butirato. Esses compostos, uma vez absorvidos, servem como substrato energético para colonócitos ou podem se ligar a receptores específicos (GPR41 e GPR43). Nesse contexto, fibras alimentares podem ser categorizadas como prebióticos, estimulando a proliferação ou a atividade dessas bactérias, e estudos de fermentação *in vitro* se mostram como opções viáveis na avaliação dessas relações. Sendo assim, este trabalho objetivou a padronização de uma técnica de fermentação *in vitro* do tipo “batch”, utilizando amostras fecais humanas e inulina como prebiótico padrão, e através dessa técnica avaliou o potencial prebiótico da farinha *Musa* spp AAA (banana nanica verde) e três subprodutos agrícolas, a saber bagaço de *Citrus aurantium* (laranja), casca de *Coffea arabica* (café) e caroço de *Euterpe oleracea* (açai). A atividade prebiótica foi determinada com base na produção de AGCCs e pela modulação da microbiota de microrganismos de interesse. Para a fermentação foram utilizadas amostras frescas de fezes humanas homogeneizadas em solução de NaHCO_3 sob atmosfera de argônio com adição de inulina ou demais produtos. A produção de AGCCs foi quantificada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e a modulação microbiana por qPCR. A padronização da técnica de fermentação *in vitro* apresentou resultados satisfatórios quanto à sua estabilidade e reprodutibilidade em diferentes indivíduos. Na avaliação da atividade prebiótica dos produtos foi possível identificar que a banana nanica verde promoveu modulações positivas nos três AGCCs analisados enquanto o bagaço da laranja e casca de café modularam acetato e propionato. Adicionalmente, através do processo de fermentação foi possível identificar modulações microbianas

positivas na expressão de *Ruminococcus intestinalis* com a casca de café, *Lactobacillus gasseri* e *Akkermansia muciniphila* com o caroço de açaí e *Bifidobacterium adolescentis* com a farinha de banana nanica verde e casca de café, demonstrando que os protocolos adotados são suficientemente robustos para avaliar a atividade prebiótica de diversos produtos vegetais através da produção de AGCCs e da modulação microbiana.

Palavras-chave: fermentação *in vitro*, microbiota intestinal, prebióticos

Abstract: Recent changes in dietary patterns such as increased consumption of ultra-processed foods, rich in sugars, fats and low in dietary fiber, are associated with an increase in the incidence of Non-Communicable Diseases (NCDs) such as Inflammatory Bowel Disease. These conditions are often associated with dysbiosis which is characterized by changes in the intestinal microbiota in number and variety of bacterial species. The gut microbiota under normal conditions establishes a beneficial relationship with the organism, providing protection against pathogens and generating important metabolites for human health, such as the short-chain fatty acids (SCFAs) acetate, propionate and butyrate. These compounds, once absorbed, serve as energy substrate for colonocytes or can bind to specific receptors (GPR41 and GPR43). In this context, dietary fibers can be categorized as prebiotics, stimulating the proliferation or activity of these bacteria, and *in vitro* fermentation studies are shown to be viable options for evaluating these relationships. Thus, this work aimed to standardize an *in vitro* batch fermentation technique using human fecal samples and inulin, as a positive prebiotic product and using this technique to evaluate the prebiotic potential of *Musa* spp AAA flour (green dwarf banana) and three agricultural by-products: *Citrus aurantium* (orange) pomace, *Coffea arabica* (coffee) cascara and *Euterpe oleracea* (açai) seeds. Prebiotic activity was determined based on the production of SCFAs and modulation of microorganisms of interest. For fermentation, fresh samples of human feces were used and homogenized in a NaHCO₃ solution under an argon atmosphere with the addition of inulin or other products. The production of SCFAs was quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and microbial modulation by qPCR. The standardization of the *in vitro* fermentation technique showed satisfactory results regarding its stability and reproducibility in different individuals. It was possible to identify that the green dwarf banana promoted positive modulations in the three SCFAs analyzed, while the orange pomace and coffee pulp modulated acetate and propionate. Additionally, through the fermentation process it was possible to identify positive microbial modulation in expression of *Ruminococcus intestinalis* with coffee pulp, *Lactobacillus gasseri* and *Akkermansia muciniphila* with açai pulp and *Bifidobacterium adolescentis* with green banana flour and coffee pulp,

demonstrating that the tested protocols are sufficiently robust to evaluate the prebiotic activity of several plant products through the production of SCFAs and microbial modulation.

Keywords: *in vitro* fermentation; gut microbiota; prebiotics

Introdução

Cada povo, cultura e localidade compartilha a alimentação como uma das atividades centrais de seu desenvolvimento, justificativas e história. Desde os tempos mais remotos a humanidade se desenvolveu com base na busca de alimentos, cultivo de produtos alimentares e técnicas que propiciaram melhor aproveitamento dos recursos nutricionais disponíveis. Muito além de simplesmente ser um aspecto nutritivo, a alimentação foi e é influenciada pelo aspecto cultural de cada povo, tendo um mesmo ingrediente finalidades diferentes para povos diferentes ou até mesmo uma mesma preparação ganhar ou perder características por disponibilidades sazonais de ingredientes a depender da localidade. A título de exemplo toda a cosmologia chinesa que envolve a medicina tradicional chinesa dita a conduta sobre forma de preparar alimentos, em qual época consumi-los e quais sabores devem ser combinados, de modo similar, a medicina tradicional indiana, a Ayurveda, tem na alimentação o papel central de sua terapêutica.

Em outra via, a escassez de alimentos determina graves condições orgânicas, prejuízos ao desenvolvimento biológico e social. No caso da desnutrição infantil são observados prejuízos no desenvolvimento motor, cognitivo, assim como no desenvolvimento adequado das relações sociais, imprimindo prejuízos que podem perdurar por toda a vida [1]. O aspecto social da escassez de alimentos invariavelmente se associa a pobreza e a dificuldade de acesso a alimentos em quantidade e frequência necessárias, satisfatórias e com qualidade pode ser descrito como insegurança alimentar [2].

A Organização das Nações Unidas estabelece que a segurança alimentar se pauta em quatro pilares: a disponibilidade, o acesso, a utilização e a estabilidade. Isso significa que para estabelecer segurança alimentar, todas as pessoas, independentemente do tempo, devem ter condições físicas, econômicas e sociais de acesso suficiente, seguro e nutritivo ao alimento que atenda suas preferências e necessidades nutricionais para uma vida ativa e saudável [3]. No mesmo sentido, o guia alimentar brasileiro propõe que a alimentação é mais que a ingestão de nutrientes, mas também diz respeito aos alimentos, às combinações que são feitas com eles e às práticas culturais de

alimentação de cada localidade e que toda esta gama compõe os aspectos da saúde e bem-estar [4].

O estabelecimento da Organização das Nações Unidas ocorreu no contexto do pós-guerra e também após um período de discussões que dissertavam desde hegemonia global até áreas que englobam o bem-estar e os direitos humanos, entre elas, a agricultura e o acesso ao alimento [5]. Parte dos arsenais mecânicos e químicos da segunda guerra mundial foram direcionados aos campos com o intuito de alcançar novos patamares na produção de commodities agrícolas [6], e isto, associado à modificação de sementes e a aplicação de tecnologias advindas de distintas áreas, modificaram profundamente a cultura agrícola ao longo do último século [7]. Ademais, este processo se funde com a intensa industrialização de diversos países e outros processos mais recentes como a globalização. Este intenso processo modificou a forma como se produz, comercializa e distribui alimentos no mundo todo. O atual processo de produção de alimentos é responsável por um terço da degradação de biomas tropicais e emissão de gases de efeito estufa. Evidências apontam para a intensificação desse processo de maneira direta com a variação de preço das colheitas, especialmente tratando-se de cultivares inseridos no mercado internacional [8].

O processo de urbanização intensificado e o comércio entre países influenciam e modificam profundamente a forma de se alimentar. Desnutrição, deficiência de micronutrientes e menores taxas de obesidade são frequentemente associadas à menor renda *per capita* e países em desenvolvimento, entretanto, evidências recentes demonstram a dupla carga da desnutrição em que há concomitância de obesidade com sinais de deficiência de micronutrientes e atrasos no desenvolvimento infantil [9]. Este cenário é observado principalmente em regiões mais ricas de países pobres ou em desenvolvimento e regiões mais pobres de países ricos [10] onde frequentemente o cenário de obesidade está associado ao maior consumo de alimentos industrializados e ocorrência de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) como Diabetes, hipertensão e a própria obesidade [11].

Nesse sentido, as alterações dos padrões alimentares em regiões fortemente urbanizadas e industrializadas estão associadas ao consumo de alimentos densamente energéticos, ricos em gorduras, carboidratos refinados e pobres em vitaminas, minerais e principalmente fibras [12]. Esse padrão alimentar, denominado Dieta Ocidental, é marcado pela presença de alimentos industrializados nas refeições em que também se encontram grandes quantidades de sódio, açúcares refinados e gordura, e por vezes, é associado a um estilo de vida sedentário [13]. Este tipo de dieta, contendo pouco mais de 15 gramas de fibra/dia para um indivíduo adulto está abaixo dos valores recomendados para a população, de 20 a 35 g/dia, considerando-se diferenças de idade, sexo e biotipo [14]. Paradoxalmente este cenário está se modificando. Estima-se que a população dos Estados Unidos consuma até 30% de suas calorias em alimentos ricos em açúcares, altamente calóricos e pobres em nutrientes, neste contexto os indivíduos apresentam baixa biodisponibilidade de vitaminas A, C, D, E e minerais como cálcio e magnésio além de um quadro de obesidade associada à inflamação crônica de baixo grau [15]. Entretanto, este cenário tipicamente observado em países com maior concentração de renda agora se expande para países pobres e em desenvolvimento [16]. Neste cenário a população torna-se ainda mais vulnerável a este duplo fator patológico, a obesidade e a desnutrição, pois a pobreza expõe esta população à insegurança alimentar e os leva a consumir alimentos de baixa qualidade e altamente energéticos que supram as calorias diárias. Um cenário complexo que exige a atenção e responsabilidade de pesquisadores, educadores e profissionais de saúde, especialmente levando em conta a obesidade como um dos principais fatores de risco de outras DCNTs [17].

Segundo a OMS, os quadros associados às DCNTs são os maiores responsáveis pela causa de mortes no mundo, superando todas as outras causas somadas [18]. Desde o início do século XXI os números de mortes associadas às DCNTs aumentam em todo o mundo, estimando-se em torno de 38 milhões de mortes em 2012, número este que subiu para 41 milhões em 2021 e cuja projeção é de 52 milhões até 2030 [19]. As DCNTs compreendem um conjunto de condições que podem se estabelecer por anos no indivíduo e que embora possuam tratamento sintomático, não há uma cura estabelecida para

elas, acarretando tratamentos dispendiosos e por vezes cronologicamente extensos [20]. A doença cardiovascular é a DCNT que mais mata no mundo com a estimativa de 17 milhões de mortes ao ano, representando 32% de todas as mortes no mundo, sendo seguida do câncer (8,2 milhões), doenças respiratórias (4 milhões) e Diabetes Mellitus (1,5 milhões). Entre as principais causas desses quadros estão o sedentarismo, o tabagismo, o alcoolismo e a adoção de dietas inadequadas [18]. Em concordância com este cenário, o consumo de alimentos ultraprocessados, que já se encontra elevado em países industrializados e com alta concentração de renda, também está em ascensão em países mais pobres ou em desenvolvimento, na mesma taxa em que alimentos *in natura* são menos consumidos, promovendo maior incidência de DCNT [2, 21].

O Guia Alimentar Brasileiro de 2016 estabelece que os alimentos podem ser divididos em quatro categorias:

1) Alimentos *in natura* ou minimamente processados

São aqueles obtidos diretamente de plantas ou animais os quais podem ou não sofrer um processamento que envolve a limpeza, remoção de partes, secagem, moagem, fracionamento ou congelamento.

2) Óleos, Gorduras, Sal e Açúcar

Produtos extraídos de alimentos *in natura* ou da natureza via processamento como prensagem, moagem ou trituração, são adicionados em preparações com a finalidade de agregar sabor.

3) Alimentos Processados

São derivados de alimentos e reconhecidos como versões de alimentos originais fabricados pela indústria, com adição de sal, açúcar e demais substâncias que aumentam a palatabilidade e duração destes.

4) Alimentos Ultraprocessados (AUP)

São formulações industriais baseadas em óleos, gorduras, carboidratos, amido e proteínas extraídas diretamente de alimentos, produtos derivados extraídos de alimentos *in natura* (gordura hidrogenada, amido modificado) ou então sintetizados em laboratório com base em substâncias orgânicas e com a finalidade aditiva aos produtos com propriedades sensoriais. AUP podem ainda passar por técnicas de extrusão, cozimento ou fritura.

Nesse sentido, o consumo de AUP se mostra diretamente correlacionado não só com as DNCTs já relatadas, mas também com a maior incidência de outras doenças multifatoriais como a Doença Inflamatória Intestinal (DII). Em um estudo de coorte conduzido em vinte e um países durante nove anos foram avaliados os padrões alimentares de 116.037 participantes, nele foi constatado que o consumo de AUP está diretamente relacionado à ocorrência de DII, dessa forma, quanto maior a quantidade de AUP consumidos, maior é o risco de desenvolver a doença [22]. Ademais, é amplamente referida a influência que a Dieta Ocidental e o consumo de AUP tem sobre a microbiota intestinal como, por exemplo, a redução da presença de espécies pertencentes ao gênero das Bifidobactérias e outras alterações importantes como a redução da presença de bactérias do gênero *Bacterioidetes* com simultâneo aumento de espécies do gênero *Firmicutes* [23, 24].

O trato gastrointestinal é o maior portador de microrganismos simbiotes presente no ser humano. Ele é composto por bactérias, fungos, vírus e archae, que em conjunto englobam aproximadamente 10 trilhões de indivíduos, população que corresponde a dez vezes mais que o total de células do ser humano [24]. Estes microrganismos, em sua maioria bactérias [25], convivem harmoniosamente com o ser humano em uma relação simbiótica na qual o hospedeiro fornece o *habitat* enquanto os microrganismos fornecem proteção contra agentes patogênicos. Entre as bactérias que compõe a microbiota, 90% se distribuem entre os filos *Firmicutes* e *Bacterioidetes*, as demais espécies pertencem aos filos de *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, entre outros. Entre as *Firmicutes*, as classes *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes* são as mais comuns, enquanto que no filo *Bacterioidetes*, as *Bacterioides*, Flavobacterias e Sphingobacterias são as mais encontradas [26].

A composição da microbiota na espécie humana apresenta grande variabilidade interindividual, sendo influenciada pela via de parto (cesariana ou parto vaginal), amamentação, idade, padrões dietéticos e uso de medicamentos (2018, Senghol). Pessoas obesas, por exemplo, apresentam menor proporção de *Bacterioidetes* quando comparado a indivíduos eutróficos, e essa diferença diminui com a redução do peso [27]. É válido ressaltar que o filo dos

Bacterioidetes é composto por cerca de 20 gêneros enquanto os *Firmicutes* representam mais de 250 gêneros [28], indicando que a relação simbiótica da microbiota é muito mais complexa do que a simples proporção entre filos.

Como dito anteriormente, a complexa relação dos diferentes organismos entre si e com o hospedeiro é mediado por uma série de fatores, além de ser uma situação dinâmica do ponto de vista cronológico na vida do indivíduo. Por diversas razões a fluidez deste equilíbrio pode ser alterada levando à condição conhecida como disbiose. Via de regra, a disbiose compreende uma situação de baixa diversidade de microrganismos como *Bifidobacteria* e *Bacterioidetes*, por exemplo, aliado ao aumento nas taxas de *Firmicutes* e *Proteobacteria* [29]. Além disso, a complexa relação se dá também entre os microrganismos e o epitélio intestinal do hospedeiro como por exemplo, a *Akkermansia muciniphila* e sua capacidade de regular a produção de muco, a absorção de nutrientes e sua influência direta em parâmetros metabólicos como glicemia e lipídeos, além de contribuir para a integridade do epitélio intestinal [30].

A integridade da barreira epitelial é importante no que diz respeito à permeabilidade intestinal e seleção de componentes a serem absorvidos. A expressão desregulada de genes das famílias das ocludinas e claudinas, correlacionados com a integridade das junções ocludentes, interfere diretamente na permeabilidade intestinal, promovendo o maior influxo de íons para a luz intestinal, ocasionando quadros de diarreia, bem como aumento da absorção de diversos metabólitos microbianos incluindo suas membranas celulares [31]. Estes quadros são comumente vistos na DII onde o aumento da absorção de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana celular de bactérias Gram-Negativas, que pode ser reconhecido como antígeno pelo sistema imune do hospedeiro, gera uma resposta inflamatória com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α [32]. Ademais, a baixa diversidade microbiana e o aumento das taxas de bactérias patogênicas associado à disponibilidade de alguns componentes específicos da dieta fermentáveis por estes microrganismos leva à produção de metabólitos potencialmente danosos que reforçam este cenário pró-inflamatório além de estarem associados a diversas doenças crônicas [33].

Um dos exemplos de como compostos provenientes da dieta podem servir de substrato para substâncias deletérias está na trimetilaminia (TMA), um composto derivado da fermentação de aminoácidos provenientes da dieta baseada em carne vermelha, ovos, peixes e produtos lácteos. Em geral, a formação da TMA ocorre em pequenas quantidades e apenas se dá em altas taxas quando os aminoácidos precursores são ingeridos em grande quantidade ou não absorvidos corretamente (28). Uma vez absorvido a TMA é oxidada no fígado gerando N-óxido de trimetilamina (TMAO). A TMAO é considerada um importante mediador entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento diversas doenças cardiovasculares como infarto, aterosclerose, hipertensão e diabetes (29, 30). De certa forma, o aumento dos níveis séricos de TMAO é diretamente influenciado por uma microbiota desbalanceada associado ao aumento da permeabilidade intestinal. Uma das evidências que suporta essa hipótese é o aumento da proliferação de espécies patogênicas como *Candida* e bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*, além do aumento da adesão de bactérias na mucosa intestinal em pacientes com insuficiência cardíaca crônica [34, 35].

Um outro exemplo, o triptofano, composto também proveniente da dieta e encontrado em diversos cereais, ovos e produtos lácteos, quando alcança o cólon pode ser absorvido e seguir a via das quinureninas em células do epitélio intestinal, mas pode também ser convertido em 5-hidroxitriptamina (5-HTP/Serotonina) em células enterocromafins ou ainda ser fermentado pela microbiota intestinal e convertido em diversos compostos ligantes dos receptores aril-hidrocarbonetos (AhR). Neste grupo de compostos se encontram os indóis como o indol-3-aldeído, ácido 3-indolacético, ácido 3-indolpropiónico, indol-3-acetaldeído e ácido indolacrílico [36]. Os AhR's são receptores nucleares intimamente envolvidos na carcinogênese e podem apresentar papel ambíguo, anti ou pró-tumoral, tipo de resposta que depende particularmente do tipo celular em questão. Por exemplo, em macrófagos AhR's são fundamentais para a execução da atividade fagocitária, bem como na produção de óxido nítrico, supressão da produção de arginase, e diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias em detrimento de interleucina-10 (IL-10), uma interleucina anti-

inflamatória. Por outro lado, AhR favorecem a disfunção de linfócitos T CD8⁺ [37].

Outra classe de metabólitos bacterianos de interesse são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), produzidos a partir da fermentação de fibras solúveis provenientes da dieta por bactérias anaeróbicas. A produção de AGCCs pela microbiota humana constitui uma importante fonte energética, além de serem eficazes imunomoduladores, controlarem a expressão gênica e atuarem como agente antioxidante [38]. AGCCs são os principais produtos do metabolismo de bactérias anaeróbicas, dentre os quais se destacam o acetato, propionato e butirato, produzidos no TGI humano a uma taxa molar de 60:25:15, respectivamente [39]. A síntese a partir da fermentação de fibras gera AGCCs em grandes concentrações principalmente no cólon proximal (70-140 mM) seguido do cólon distal (20-70 mM) [40]. A presença ou deficiência de AGCCs está fortemente correlacionada a diversas doenças. Dentre as doenças que podem ser citadas se destacam a asma, alergia, doenças metabólicas, câncer e doenças autoimunes [41].

Os três principais AGCCs se distribuem de maneira muito heterogênea pelo organismo. O butirato é majoritariamente utilizado por colonócitos, enquanto o propionato e acetato são absorvidos e seguem para hepatócitos. Uma vez nos hepatócitos, o propionato é metabolizado para servir de substrato na via do ácido tricarboxílico e o acetato se mantém no fígado onde pode também ser metabolizado ou distribuído para circulação periférica [42]. A síntese dinâmica permite que butirato e propionato possam ser quebrados em duas cadeias menores de acetato, e este processo pode ser revertido em situações de grande consumo/produção de butirato por bactérias que deste necessitem como a *Faecalibacterium praunsnitzii* e *Roseburia* [43].

Os AGCCs atuam no organismo principalmente inibindo histonas deacetilases e por ligação em receptores acoplados à proteína G. A inibição das histonas deacetilases promove uma maior acetilação das histonas e, portanto uma maior transcrição gênica [44]. A ligação do acetato com receptores acoplados a proteína G em células imunes reduz consideravelmente a expressão das citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- α [45].

Adicionalmente, no trato gastrointestinal, o acetato promove aumento da perfusão sanguínea cólica e da motilidade ileal.

Os receptores GPR41 e GPR43 são receptores acoplados à proteína G de ligação específica com AGCCs [46] e a ativação promovida nos receptores GPR41 pelo propionato promove aumento da saciedade em humanos e murinos em consequência de maior liberação de leptina [47]. Ademais, em murinos o efeito anorexígeno se dá também através da indução de liberação do peptídeo intestinal YY associado a um estímulo da liberação de insulina [48]. Os AGCCs são metabolizados em CO₂ e corpos cetônicos, posteriormente utilizados no metabolismo energético, principalmente dos colonócitos, além de serem precursores na síntese de lipídios de membrana. Com relação ao metabolismo energético, o butirato representa o principal AGCC de atuação nessa via, além de também gerar respostas anti-inflamatórias [49]. A alta taxa de ingestão de gordura é capaz de induzir uma maior expressão de GPR-43, entretanto, a suplementação com frutooligossacarídeos a base de inulina e outros tipos de fibras controla a hiper-expressão de GPR43 e bloqueia o ganho de peso [50]. Adicionalmente AGCCs, especialmente acetato, atuam como bactericida liberando espécies reativas de oxigênio (EROS), entre outros efeitos protetores [51].

Neste sentido as fibras alimentares representam um potencial componente para uso em estratégias de saúde associada às respostas atribuídas aos AGCCs, principalmente correlacionada à prevenção de doenças crônicas e menor taxa de mortalidade, indicando que o consumo insuficiente de fibra alimentar é mais um integrante do quadro multifatorial que tem levado à grande incidência e prevalência de DCNTs [52]. A dieta tem sido considerada como o principal fator capaz de modular a microbiota intestinal ao longo da vida do indivíduo e o consumo de fibras alimentares ou de produtos que as contenham como uma importante estratégia na prevenção e controle de doenças crônicas [53], podendo assim serem classificadas como alimentos funcionais. Por definição *“um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que pode afetar benéficamente uma ou mais funções do organismo, além de possuir os efeitos nutricionais, de modo que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma*

doença” [54]. As fibras podem ser classificadas quanto a sua solubilidade na água e em relação ao seu peso molecular [55]. As insolúveis, de maior peso molecular, retêm água em sua matriz estrutural formando uma mistura de baixa viscosidade que contribui para o aumento da massa fecal beneficiando a motilidade intestinal [56]. As fibras dietéticas solúveis, de menor peso molecular, tendem a se diluir na água e por não serem hidrolisadas pelas enzimas digestivas servem de substrato para a microbiota intestinal que irá fermentá-las em diferentes segmentos do cólon produzindo vários metabólitos, dentre os quais os AGCCs. Além da formação destes metabólitos, as fibras solúveis também formam uma camada superficial ao longo da mucosa do intestino delgado retardando a absorção de lipídios e de mono e dissacarídeos, reduzindo os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol sérico e glicemia pós-prandial [57].

Por definição, os prebióticos são compostos incapazes de serem digeridos pelo organismo do hospedeiro, mas que podem ser utilizados pela microbiota favorecendo-a em seu crescimento e processos metabólicos [58]. Este conjunto de características conferem às fibras dietéticas atividade prebiótica.

De modo geral, fibras dietéticas estão presentes quase que exclusivamente em alimentos de origem vegetal e em maior concentração em grãos e cereais integrais e frutas, além de ocorrerem em outras partes não comumente utilizadas como cascas, sementes, caroços e bagaços [59]. Contraditoriamente, cerca de um terço de toda produção agrícola global é desperdiçada seja no processamento ou no consumo, gerando um total de 1,3 bilhões de toneladas de resíduos ao ano, especialmente contendo cascas, caroços bagaços e outros resíduos [60]. Em sua maioria essas perdas se dão durante o processamento agrícola, que envolve o plantio e a colheita, durante o transporte e armazenamento, distribuição, processamento e no consumo. Em especial as perdas por processamento industrial envolvem o descarte de produtos fora de padrões estéticos e partes como cascas, sementes, bagaços e folhas que não possuem destino comercial específico [61]. Estas partes geralmente descartadas podem, na verdade, serem aproveitadas enquanto subprodutos em uma segunda etapa de processamento onde lipídios, proteínas,

minerais, carboidratos, incluindo fibras dietéticas e demais compostos fitoquímicos poderiam ser recuperados, gerando um produto válido na produção de um composto funcional de grande valor agregado [62]. A diversidade de compostos presentes nos subprodutos da cadeia agrícola brasileira é grande. A partir da cultura de cereais e frutos (incluindo bagaço, e cascas) pode-se extrair hemicelulose, β -glucanas, pectinas e demais oligossacarídeos. De plantas oleaginosas extraem-se fitoesteróis e polifenóis, assim como é possível ainda obter óleos essenciais, ácidos orgânicos, carotenoides, compostos antioxidantes entre outros produtos com potencial utilização [63, 64].

É importante ressaltar que além do custo econômico envolvido na produção de alimentos, há de se considerar as terras ocupadas para esta finalidade, o uso de recursos hídricos e a demanda química e energética envolvida nos processos produtivos, assim como os danos associados ao desmatamento de florestas nativas para tal finalidade. Estima-se que 24% dos recursos de água, terras cultivadas e fertilização são gastos no processamento destes produtos, mas que posteriormente se tornará um resíduo [60]. No cenário internacional, a Comissão Europeia destaca que os resíduos possuem uma aplicação além da atualmente estabelecida, tornando-os por processo de reciclagem ou reutilização uma opção economicamente viável [65]. Existe assim uma tendência global para integrar o ciclo de produção, processamento e distribuição de recursos, colocando o Brasil como um expoente, devido sua alta produção agrícola [66].

Simultaneamente se observa um aumento da demanda da população por uma dieta equilibrada e que forneça além dos nutrientes essenciais, compostos que favoreçam e auxiliem na manutenção da saúde [45]. Partindo-se deste fato, a busca pelo melhor aproveitamento agrícola se mostra um caminho importante tanto ambiental como economicamente, onde subprodutos são uma promissora fonte de compostos com diversas atividades funcionais.

A atribuição de funcionalidade a um determinado produto ou subproduto considerado inerte do ponto de vista de atividade biológica, assim como sua

caracterização como agente prebiótico pode ser realizada de diferentes formas, incluindo a análise da atividade farmacológica desses produtos em modelos experimentais *in vivo* que mimetizem diferentes doenças, nas quais a microbiota intestinal exerce papel em sua etiologia, assim como pela avaliação da formação dos metabólitos decorrentes da fermentação microbiana. Outra possibilidade de atribuição de funcionalidade envolve a análise desses produtos em estudos *in vitro*, principalmente para se avaliar propriedades antioxidantes ou moduladoras da resposta imune. No entanto, considerando-se que os AGCCs têm sido apontados como os principais metabólitos da fermentação pela microbiota intestinal responsáveis pelos benefícios decorrentes do consumo de prebióticos, a análise da habilidade de diferentes produtos dietéticos em promover a formação destes AGCCs em modelos de fermentação *in vitro* mostra-se como uma estratégia inovadora e original para a identificação de produtos prebióticos, especialmente considerando-se subprodutos da cadeia agrícola. Em adição, estudos de fermentação *in vitro* permitem a quantificação da produção desses AGCCs e consequente seleção dos produtos mais eficazes, servindo de ponto de partida para a realização de estudos futuros em modelos experimentais *in vivo* pré-clínicos e, posteriormente clínicos, em especial na DII, mas também para outras Doenças Crônicas Não-Transmissíveis onde a microbiota intestinal possui papel fundamental. Da mesma forma, é importante salientar que métodos de fermentação *in vitro* permitem a análise da potencialidade dos produtos a partir de amostras de fezes humanas, diferente dos estudos realizados em experimentação animal, o que permite simular *in vitro* uma situação direta e específica que pode ocorrer com o consumo desses produtos por humanos. Finalmente, é necessário ainda apontar que a qualidade do processo fermentativo pelas bactérias da microbiota intestinal humana depende diretamente do tipo de dieta do indivíduo doador da amostra, sendo, portanto, importante que se estabeleçam critérios adequados para a seleção da fonte destas amostras, assim como é possível avaliar a qualidade do produto e sua habilidade de promover a produção de AGCCs em amostras de indivíduos com diferentes dietas.

Considerando-se a vasta produção agrícola brasileira, assim como a grande quantidade de resíduos da cadeia agrícola, muitos dos quais são ricas fontes de produtos com potencial aplicação na melhora da qualidade de vida, principalmente por agirem como agentes prebióticos, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a padronização de uma técnica de fermentação *in vitro* utilizando amostras da microbiota intestinal humana, como método de determinação de atividade prebiótica via a produção de AGCCs e modulação da microbiota intestinal, usando subprodutos da cadeia agrícola brasileira.

Neste sentido, a presente tese foi elaborada e escrita contendo três capítulos, sendo que no primeiro será apresentada e discutida a padronização inicial da técnica de fermentação *in vitro*. No segundo a utilização desta técnica na avaliação da atividade prebiótica de produtos agrícolas e no terceiro a avaliação da atividade prebiótica da farinha de banana nanica verde por meio da técnica de fermentação *in vitro* e do seu potencial anti-inflamatório por meio de outras técnicas exclusivamente *in vitro*.

Capítulo 1

Padronização da Fermentação *in Vitro*

1. Introdução

Estudos e pesquisas com o trato gastrointestinal se apresentam com alto grau de dificuldade, seja pela complexidade deste sistema, por sua ampla interação com outros órgãos ou até mesmo pelo caráter invasivo que as técnicas disponíveis atualmente exigem. Em adição, a íntima relação entre o trato gastrintestinal e a microbiota que o habita ampara um universo de processos que até pouco tempo eram desconhecidos ou negligenciados. Os avanços tecnológicos na área do sequenciamento e análise da expressão gênica permitiram a vasta identificação de diferentes espécies de bactérias através do reconhecimento de uma região altamente específica do DNA bacteriano, o 16S rRNA, permitindo assim, a análise da expressão de diversos microrganismos integrantes da microbiota em diferentes condições incluindo quadros de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e obesidade [67]. Entretanto, o lúmen intestinal é um ambiente rico em processos, compreendendo a absorção de substâncias, a secreção de enzimas, a interação microrganismo-hospedeiro, a interação microrganismo-microrganismo e a interação microrganismo-substâncias ali presentes [68]. Esta dinâmica faz com que estudos *in vitro* sejam modelos adequados para uma análise detalhada de interações específicas visto que permitem avaliar um amplo número processos de forma controlada, podendo se basear nas amostras da microbiota de diversas espécies e associadas aos mais diversos contextos. Além disso, o dinâmico desenvolvimento desta área do conhecimento permite que atualmente seja possível estudar processos bioquímicos em diferentes etapas e avaliar a influência das mais diversas variáveis [68, 69]. Mais especificamente, estes estudos podem avaliar a biotransformação de toxinas, a relação da microbiota de um indivíduo saudável ou doente ante a presença de um patógeno, bem como o impacto de um ou mais componentes da dieta sobre a microbiota [70].

Dentre as principais vantagens de estudos de fermentação *in vitro* há de se citar a reprodutibilidade e o grande número de variáveis a serem exploradas, além das baixíssimas restrições éticas. Por outro lado, não se pode observar a relação hospedeiro-microrganismo e microrganismo-microrganismo [71]. Existem dois grandes segmentos nos estudos de fermentação: modelos estáticos e modelos dinâmicos [68]. Em modelos estáticos, as fermentações são realizadas em um único frasco com amostras microbianas que podem vir da cavidade oral, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Em cada caso há uma variação metodológica que visa reproduzir parcialmente o meio em termos de presença de líquidos, enzimas, pH e condições anaeróbias. Em geral os frascos são mantidos a 37 °C com agitação constante em agitador termostático ou banho com agitação. Os tempos variam de algumas poucas horas até 72 horas de acordo com o segmento analisado e os objetivos do estudo. Estes modelos ainda podem ser definidos como do tipo Batch ou Contínuos. Embora este modelo apresente grandes limitações no que tange a reprodutibilidade de situações *in vivo*, como a absorção de substâncias e as variações no pH, são muito eficientes para descrever situações específicas, são baratos, rápidos e necessitam ser validados apenas para a finalidade de estudo que se propõe [72].

Por outro lado, modelos dinâmicos de fermentação *in vitro* reproduzem uma maior variedade de situações como absorção, peristaltismo, secreção de fluidos e enzimas, alterações no pH, esvaziamento gástrico, além de seguirem os tempos usuais de cada etapa. Modelos dinâmicos são mais adequados quando se pretende estudar a relação entre a liberação de substâncias, sua absorção e para se fazer comparações mais precisas com dados *in vivo*, podendo ainda serem divididos de acordo com a quantidade de compartimentalizações que o sistema se utiliza, sendo mono ou multicompartimental, o que refere diretamente no segmento gastrointestinal a ser estudado e na complexidade do estudo [71]. Embora modelos dinâmicos possam fornecer informações mais complexas a respeito da dinâmica dos processos digestivos e absorptivos, são modelos caros e de difícil reprodutibilidade [72].

Ademais, é amplamente referenciada a utilização de diversos tipos de carboidratos nos estudos de fermentação *in vitro*, independente do modelo adotado, visto que os carboidratos são o principal substrato energético das

bactérias, enquanto a taxa de fermentação dos mesmos está diretamente relacionada com o seu grau de oligomerização [73]. Por consequência, a fermentação dos diversos tipos de carboidratos, incluindo as fibras dietéticas, além de promover o crescimento bacteriano gera grandes quantidades de AGCCs [74].

No organismo do ser humano, AGCCs são compostos produzidos exclusivamente pelo metabolismo bacteriano e são cruciais na manutenção da ecologia da microbiota intestinal, bem como são mediadores da resposta inflamatória, sinalização endócrina e desenvolvimento do sistema imune pela ativação de receptores acoplados à proteína G e receptores do tipo Toll-like em diversos tipos celulares [75, 76]. Acetato, propionato e butirato são os principais AGCCs produzidos pela microbiota intestinal (71-73) e representam entre 90 e 95% dos AGCC produzidos, sendo que 60% é de acetato, 25% propionato, e 15% butirato [70].

É interessante ressaltar a diversidade das espécies produtoras de AGCCs, como as pertencentes ao filo *Bacterioidetes* e gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e os tipos de fibras fermentáveis por esses microrganismos. É a partir desta interação que as diferentes modulações são possíveis. Dentre as principais fibras, podemos citar o amido resistente, a pectina, a inulina, o arabinóxilano, os frutooligossacarídeos e os galactooligossacarídeos, encontrados naturalmente em diversos tipos de alimentos e até mesmos polímeros sintéticos como a polidextrose [73].

Dada a ampla referência em diferentes modelos experimentais na modulação da microbiota, aumento na produção de AGCCs e melhora em quadro inflamatórios e metabólicos, a inulina se mostra um bom componente a ser utilizado em estudos de fermentação *in vitro*, especialmente considerando-se o aumento na produção de butirato que pode ser usado como marcador no processo de fermentação, e sua grande disponibilidade comercial sob diversos graus de oligomerização e pureza [77, 78]. Neste sentido, o uso de um produto puro, com alto grau de evidências científicas se justifica ao longo do processo de padronização da técnica de fermentação *in vitro* especialmente tendo como parâmetros a produção de AGCCs.

A padronização do processo de fermentação *in vitro* envolveu uma série de experimentos que buscaram estabelecer um protocolo a ser seguido em etapas futuras, por exemplo, quantidade de fezes por tubo, quantidade de substrato a ser utilizada e tempo de processamento das amostras. Através dos parâmetros testados, buscamos compreender como o processo de fermentação *in vitro* e a consequente produção de AGCCs poderiam ser influenciados pela amostra de fezes, bem como pela utilização da inulina no processo. Esta etapa buscou ainda estabelecer quais são os valores médios de produção de AGCCs e qual o grau de variabilidade do processo nas diferentes situações.

2. Objetivo

Sendo assim, foi objetivo deste estudo a padronização de uma técnica de fermentação *in vitro* do tipo “batch”, elencando os possíveis fatores de influência, além de avaliar seu desempenho sob diferentes condições experimentais.

3. Metodologia

3.1 Seleção de Doadores

O processo inicial de padronização da fermentação *in vitro* e testes com produtos foi realizado com amostras de fezes humanas sendo de um único doador, indivíduo adulto, do sexo masculino, entre 27 e 30 anos de idade, saudável, sem histórico de doenças crônicas e sem uso de medicação, incluindo anti-inflamatórios e antibióticos ao menos seis meses antes da coleta do material além de outras três doadoras, adultas, sexo feminino, entre 23 e 26 anos de idade, saudáveis, sem históricos de doenças crônicas, tendo uma delas com referido uso de antibiótico. Aprovação da coleta de materiais biológicos emitida pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-Unesp (protocolo número: 71379417.2.0000.5411).

3.2 Protocolo de fermentação *in vitro*

Os estudos de fermentação *in vitro* foram realizados com base na técnica de fermentação *in vitro* do tipo “batch” de Comalada e colaboradores (2006) [79] com alterações. As amostras de fezes foram homogeneizadas no próprio tubo de coleta e processadas imediatamente após a coleta. Para cada amostra

fermentada foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 50 ml assepticamente 2 gramas de fezes, e as mesmas homogeneizadas em 10 ml de solução de NaHCO_3 (159 mM em pH 7,8 - proporção 1:5 p/v) sob atmosfera de argônio. Em seguida, foram adicionados os produtos a serem testados em suas respectivas concentrações (mg/ml - miligramas de produto por mililitro da solução NaHCO_3), a atmosfera foi novamente saturada com argônio e a tampa dos tubos vedada com filme plástico de parafina. O conteúdo foi homogeneizado por um minuto em vórtex, e mantidos a 37°C por 24 horas com agitação constante de 150 rpm e protegidos de qualquer fonte de luz. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

Todas as fermentações com as amostras de interesse foram acompanhadas da fermentação de um grupo, denominado controle, contendo apenas fezes e a solução de NaHCO_3 com a devida saturação da atmosfera com argônio, e sem a adição de qualquer substrato adicional. Também foram analisadas amostras de fezes não fermentadas em paralelo a cada processo fermentativo grupo este denominado de **Branco**.

3.3 Extração e análise de ácidos graxos de cadeia curta

Para cada AGCC avaliado foi feita uma curva padrão e o cálculo do coeficiente de determinação (R^2) e equação da reta. Essa equação foi utilizada, posteriormente, nos cálculos de quantificação dos AGCCs de cada amostra fermentada.

i. Extração de Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Em alíquotas de 1mL de cada uma das amostras de homogeneizados fecais fermentados foram adicionados 1 mL de ácido ortofosfórico 0,5%, submetidos a agitação em vórtex por 1 minuto; para amostras não fermentadas, 200 mg de fezes frescas foram eluídas em 2 mL de ácido ortofosfórico 0,5% e mantidos em vórtex por 1 minuto, partindo-se desta etapa todas as amostras seguiram o mesmo processo. Estes homogenatos foram transferidos para tubos tipo eppendorf e submetidos a centrifugação a 17950xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante retirado, sobre o qual foi adicionado acetato de etila na proporção

de 1:1 com agitação adicional por 1 minuto e centrifugado nas mesmas condições. Este segundo sobrenadante foi acondicionado em vials de 1,5 mL, aos quais foi adicionado o padrão interno analítico (ácido octanóico) em uma concentração final de 0,755 mg/mL, e posteriormente injetado em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa para análise dos AGCCs.

ii. Quantificação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Para a quantificação dos AGCCs foi utilizada a metodologia de Almeida-Jr et al, [80]. Para tanto foi realizada uma curva padrão utilizando os ácidos graxos a serem analisados: ácido acético (acetato), ácido propiônico (propionato) e ácido butírico (butirato) nas concentrações de 0,05 mg/ml, 0,155 mg/ml, 0,455 mg/ml, 0,755 mg/ml, 1,055 mg/ml, 1,355 mg/ml e 1,655 mg/ml. As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa (GC-MS Thermo Scientific, modelo FOCUS ISQ 230ST, com injetor automático Triplus DUO e biblioteca NIST 2008) com temperatura inicial de injeção de 50 °C durante 14 minutos com incremento de 5°C por minuto, utilizando coluna de média polaridade (TG-WAXMS). Os dados foram obtidos com base na integralização da área sob a curva dos picos referentes aos analitos de interesse, bem como do padrão interno (ácido octanóico) adicionado em cada amostra. Com base na curva padrão, os dados foram plotados utilizando o software GraphPad Prims 6 e os valores de cada analito calculados via regressão linear com base no valor integralizado do padrão interno. Os valores obtidos, expressos em mg/ml, são posteriormente convertidos em $\mu\text{Mol/g}$, referindo-se então à concentração de AGCC presentes nos fermentados ou nas fezes.

3.4 Variáveis de influência na fermentação *in vitro*

Foram feitas inúmeros ensaios de fermentação para se analisar a influência da quantidade de fezes utilizadas no processo, do tempo entre a coleta e o processamento das amostras (mantidas em temperatura ambiente), a influência da ingestão de fibras no dia precedente a doação das amostras de fezes e a homogeneidade do processo com amostras de diferentes dias, além da análise do perfil de produção de AGCCs ante diferentes concentrações de inulina e

sacarose. Testes iniciais utilizando tubos de 15 ml se demonstraram inviáveis para tal procedimento e, portanto, foi estabelecido a utilização de tubos de 50 ml.

i. Quantidades de fezes

Para avaliar a influência da quantidade de fezes utilizada em cada experimento, foi feita uma fermentação usando 1g e 2g de fezes, tanto no grupo controle quanto no grupo Inulina (Orafti®HP, Beneo™. DP≥23). A concentração de inulina a ser utilizada foi estabelecida com base em diferentes estudos de fermentação *in vitro* encontrados na literatura [49, 73, 81]. Os resultados demonstram uma única fermentação com amostras em triplicata.

ii. Tempo de processamento

Embora tenha sido adotado como padrão o processamento das amostras de fezes tão logo elas fossem coletadas, o tempo entre a coleta e o processamento foi levado em consideração projetando futuros estudos em que possa haver um espaço de tempo considerável entre a coleta e o processamento. Para tal, foram testados em triplicatas três diferentes grupos provenientes da mesma amostra com inulina 10 mg/ml sendo um deles processado imediatamente após a coleta, outro com um intervalo de duas horas e um terceiro com intervalo de quatro horas entre a coleta e o processamento, além dos grupos controle e Branco.

iii. Recordatório alimentar

Com a finalidade de avaliar o grau de influência do consumo de fibras alimentares provenientes da dieta sobre as amostras em cada processo de fermentação, foram realizadas onze fermentações em diferentes dias a partir das quais foi realizado o recordatório alimentar de 24 horas e calculado a quantidade de fibras alimentares totais ingeridas no referido dia. As fermentações foram realizadas com os grupos controle e inulina 30 mg/ml, com amostras em triplicata. Foi feita uma análise de correlação linear entre os valores de fibras

alimentares em gramas e a média das concentrações de ácido acético, propiônico e butírico obtidas nos diferentes dias, em que, quanto mais próximo o valor de R^2 seja de 1, maior é a influência das fibras sobre o valor final de AGCCs.

A quantidade total de fibras consumidas no dia anterior à doação das amostras foi aferida através de recordatório alimentar de 24 horas e calculado utilizando o software Dietbox em sua versão livre que utiliza como base de dados a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO), as tabelas criadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), United States Department of Agriculture (USDA), Sonia Tucunduva Phillipi (TUCUNDUVA) e a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TBCA).

iv. Perfil de fermentação com inulina e sacarose

Para avaliar a influência que a inulina pode exercer na produção de AGCCs e estabelecer a melhor concentração para estudos futuros foi realizado uma fermentação em triplicata com uma curva de concentração de inulina nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 mg/ml.

Em contraposição ao alto grau de polimerização da inulina, a sacarose (Açúcar de mesa refinado 99,5% de sacarose), foi testada nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/ml por também se tratar de um carboidrato puro, porém com menor grau de polimerização.

3.5 Reprodutibilidade do processo de fermentação *in vitro*

i. Perfil de variabilidade individual na Fermentação *in vitro*

A variabilidade da resposta no processo de fermentação considerando as amostras de um mesmo indivíduo foi avaliada através da realização do processo de fermentação em 33 dias diferentes, sob as mesmas condições e utilizando como substrato a inulina na concentração de 30 mg/ml sendo todas as amostras testadas em triplicata.

ii. Perfil de variabilidade entre diferentes indivíduos

Um estudo anexo para avaliar a estabilidade do processo de fermentação com amostras de diferentes indivíduos foi realizado através da análise comparativa dos diferentes dias de fermentação de quatro diferentes indivíduos com os seguintes números amostrais: Doador A – 5 dias, Doadora B – 2 dias e Doadoras C e D – 3 dias.

3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Software Graphpad Prims 6. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os dados paramétricos foram analisados pela ANOVA (análise de variância de uma via) seguida pelo teste de Dunnet. Nas comparações entre grupos de um mesmo doador foi utilizada análise de variância de duas vias seguido do teste de comparação múltipla de Sidak. São apresentadas diferenças estatisticamente significativas considerando um valor de $p \leq 0,05$

4. Resultados

4.1 Curva de quantificação com padrões isolados

A curva de concentração obtida com padrão isolado de acetato (Figura 1) possui um $R^2=0,9872$ sendo o menor coeficiente de determinação entre todos os ácidos graxos analisados. A equação da reta $y = 0,531126x + 0,009122$ foi utilizada para a quantificação de acetato de todas as amostras.

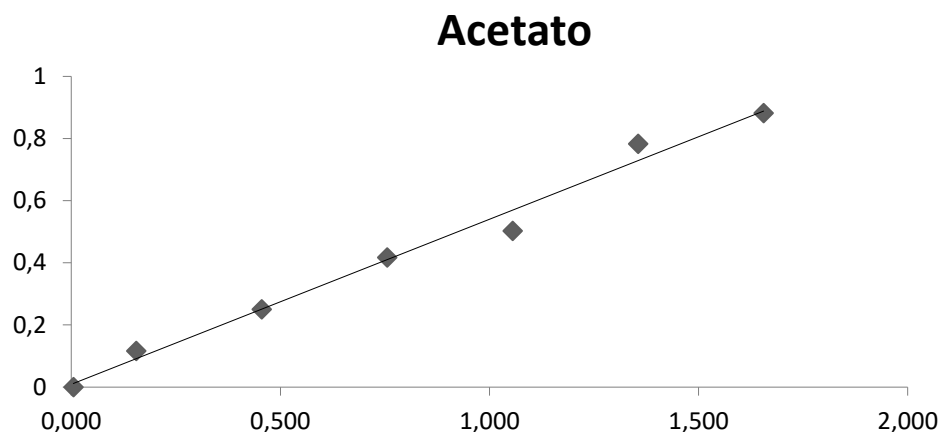


Figura 1: curva de concentração com padrão isolado de acetato.

A curva de concentração obtida com padrão isolado de propionato (Figura 2) possui um $R^2=0,9912$. A equação $y = 0,530136x - 0,036949$ foi utilizada para a quantificação de propionato de todas as amostras.

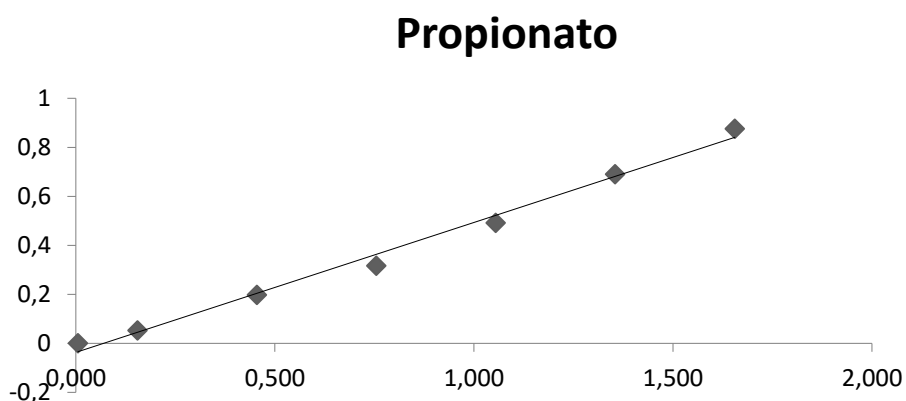


Figura 2: curva de concentração com padrão isolado de ácido propiônico.

Já a curva de concentração obtida com padrão isolado de butirato (Figura 3) possui um $R^2=0,9932$. A equação $y = 0,95539x - 0,038097$ foi utilizada para a quantificação de butirato de todas as amostras.

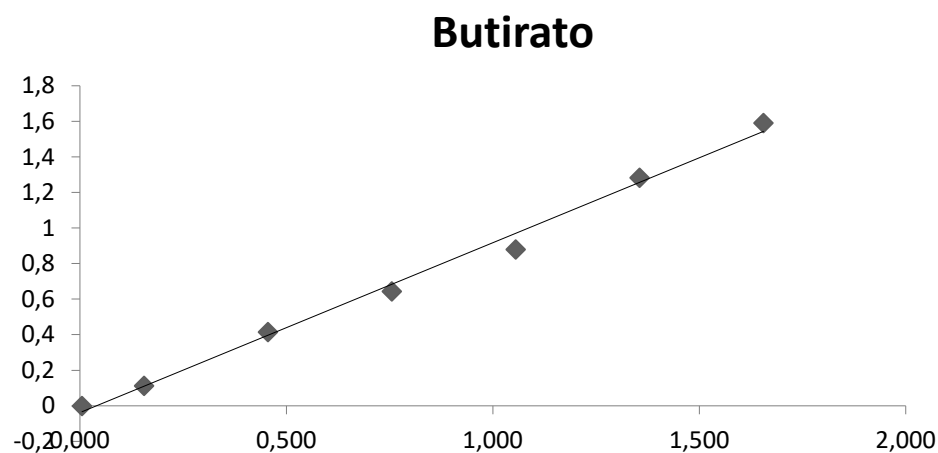


Figura 3: curva de concentração com padrão isolado de ácido butírico.

4.2 Quantidade de fezes

Na fermentação das fezes sem uso de nenhum substrato foi possível notar aumento mais pronunciado na produção de todos AGCCs proporcionado pelo processo de fermentação quando realizado com 2 gramas de fezes. Em comparação com o grupo controle que utilizou 1 grama de fezes, o grupo com 2 gramas gerou 88,74% a mais de acetato, 68,09% a mais de propionato e 72,82% a mais de butirato do que no ensaio com apenas 1 grama (Figura 4).

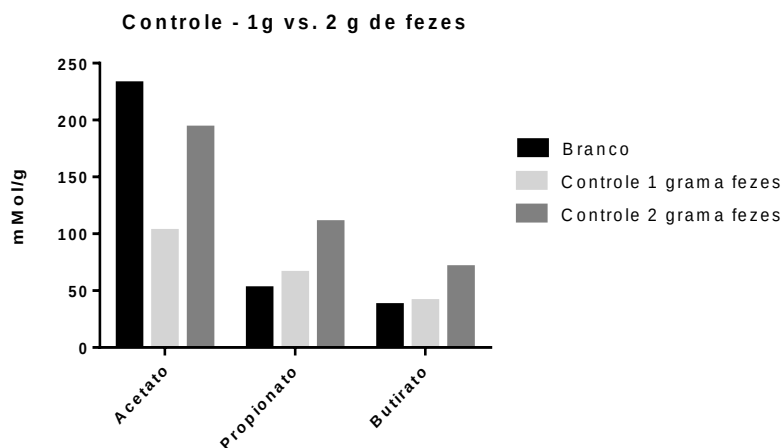


Figura 4: Concentrações de acetato, propiônico e butírico nos grupos Branco e Controle com 1 e 2 gramas de fezes

Quando se utilizou a inulina como substrato para as fermentações, notou-se que a produção de AGCCs foi superior a observada no grupo Branco e, de maneira semelhante ao apresentado no grupo controle, há tendência de aumento nas produções de acetato (17,6%), propionato (4,97%) e butirato (31,23%) nas fermentações com 2 gramas de fezes quando comparado com 1 grama (Figura 5).

Dado o perfil observado, foi estabelecida a quantidade de 2 gramas de fezes por fermentação por propiciar o melhor aproveitamento do substrato utilizado observado pela maior produção de AGCCs.

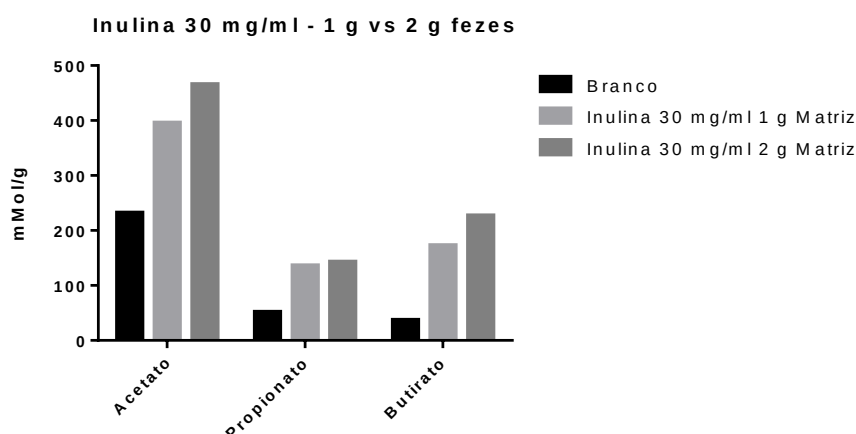


Figura 5: Concentrações de acetato, propiônico e butírico nos grupos Branco e Inulina 30 mg/ml com 1 e 2 gramas de fezes.

4.3 Efeito do tempo de processamento no perfil de fermentação

A Figura 6 demonstram as concentrações dos ácidos acético, propiônico, butírico nos diferentes tempos de processamento de amostra em fermentações com inulina a 10 mg/ml.

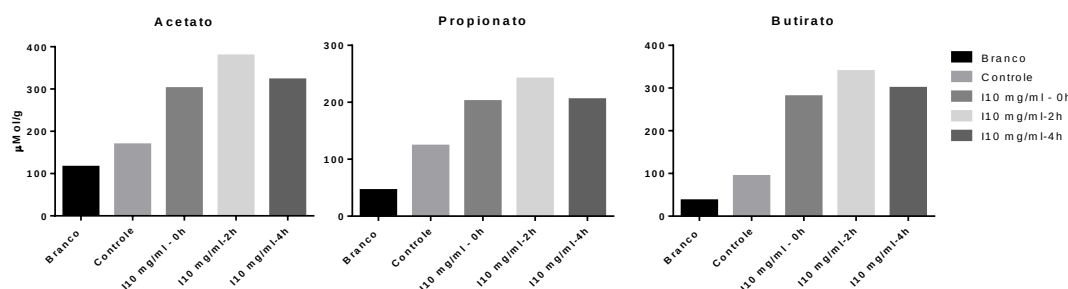


Figura 6: Concentrações de acetato, propiônico e butírico nos grupos branco, controle e Inulina 10 mg/ml em diferentes tempos de início de processamento.

Neste estudo foi possível observar que, diferentemente do experimento anterior, a concentração de acetato no grupo controle foi 46% maior do que a encontrada no grupo branco. Com relação ao grupo inulina 10 mg/ml notou-se que o processamento duas horas após a coleta apresentou concentração de acetato 25,62% maior do que a imediatamente processada, enquanto o processamento 4 horas após a coleta resultou em uma concentração 6,87% maior que o processamento imediato.

A concentração de propionato no grupo controle foi 172% maior que o grupo Branco. Aguardando-se duas horas para processar as amostras foi obtido 19,51% propionato a mais que o processamento imediato e 17,69% em relação ao processamento 4 horas após a coleta.

Se tratando do butirato, o grupo controle apresentou concentração 156% maior que o grupo Branco, enquanto o grupo Inulina 10 mg/ml-2 horas apresentou concentração 21,04 % maior que o processamento imediato e 13,10% maior que o processamento 4 horas após a coleta.

4.4 Correlação da ingestão de fibras sobre o perfil da fermentação

i. Fermentações controle

Foi observado que nas fermentações controle o valor de R obtido pela correlação linear foi de 0,19547 para acetato, 0,3241 para propionato e 0,3371 para butirato indicados na Figura 7, demonstrando que a quantidade de fibras ingeridas no dia anterior à fermentação, isoladamente, foi insuficiente para

determinar os níveis de AGCCs gerados no processo. A Tabela 1 detalha o teste de correlação linear

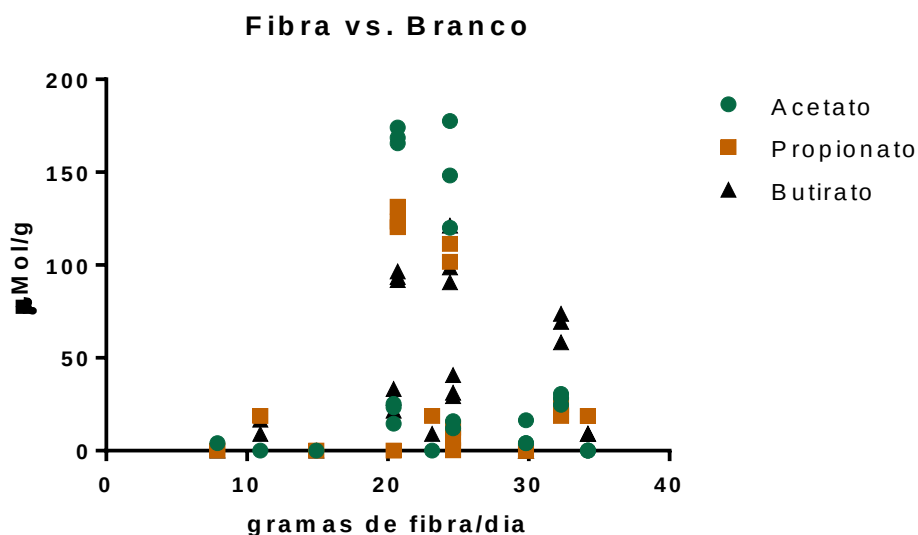


Figura 7: dispersão amostral da correlação entre o consumo de fibras alimentares e a produção de AGCCs no grupo controle.

Tabela 1: Correlação linear entre acetato, propionato e butirato e a quantidade de fibras consumidas na véspera da fermentação no processo fermentação no grupo controle.

Spearman r	Fibra/dia vs. Acetato	Fibra/dia vs. Propionato	Fibra/dia vs. Butirato
R	0,1954	0,3241	0,3371
95% confidence interval	-0,4743 to 0,7219	-0,3604 to 0,7818	-0,3476 to 0,7874
P (two-tailed)	0,5611	0,3276	0,3078
P value summary	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact
Significant? (alpha = 0.05)	No	No	No

ii. Fermentações com Inulina

Com a influência da inulina 30 mg/ml os valores de R foram inferiores quando comparado ao grupo branco, sendo de 0,027 para acetato, 0,3273 para

propionato e 0,1091 para butirato. A Figura 8 demonstra que a aplicação de um substrato sobre o processo de fermentação promoveu uma modulação capaz de atenuar os efeitos das características da amostra, além de também evidenciar que a quantidade de fibras isoladamente é incapaz de determinar quantidade de AGCCs a ser gerada no processo de fermentação *in vitro* juntamente com um substrato.

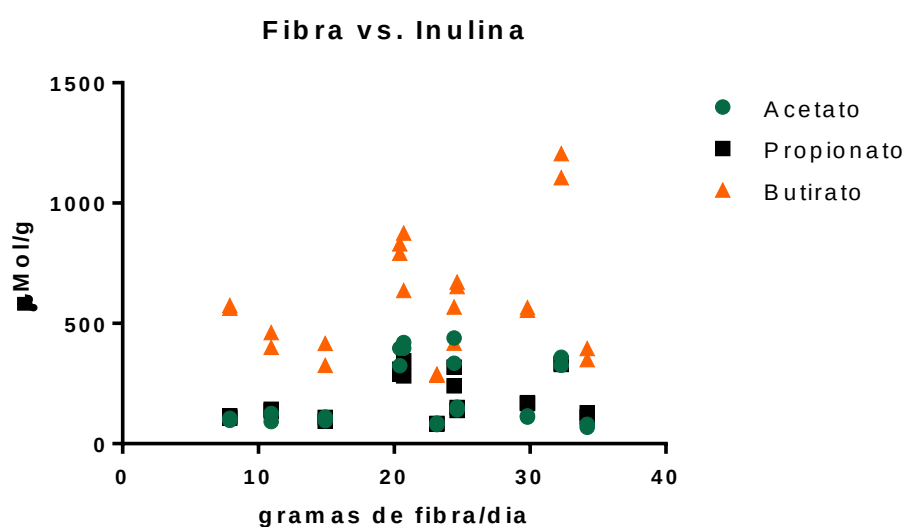


Figura 8: dispersão amostral da correlação entre o consumo de fibras alimentares e a produção de AGCCs utilizando 30 mg/ml de inulina.

A Tabela 2 detalha o teste de correlação linear obtido comparando-se a quantidade de fibra ingerida no dia anterior à fermentação com as concentrações de AGCCs gerados por adição de 30 mg/ml de inulina.

Tabela 2: Correlação linear entre acetato, propionato e butirato e a quantidade de fibras consumidas na véspera da fermentação no processo fermentação com inulina 30 mg/ml.

Spearman r	Fibra/dia vs. Acetato	Fibra/dia vs. Propionato	Fibra/dia vs. Butirato
R	0,02727	0,3273	0,1091
95% confidence interval	-0,5956 to 0,6297	-0,3573 to 0,7831	-0,5400 to 0,6768
P value			
P (two-tailed)	0,9462	0,3269	0,7545
P value summary	Ns	ns	ns

Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact
Significant? (alpha = 0.05)	No	No	No

4.5 Curva de concentração com substratos

i. Inulina

A Figura 9 apresenta o perfil de produção de acetato, propionato e butirato para as diferentes concentrações de inulina aplicadas.

As aplicações das diferentes concentrações de inulina apresentaram comportamento concentração-dependente onde tanto maior a concentração, maior a produção de acetato. Além disso, a diferença entre as concentrações de 100 e 300 mg/ml é de apenas 5,23%, denotando um platô na curva de resposta da inulina no processo de fermentação. Assim como observado com o acetato, o propionato também apresentou resposta concentração-dependente de maneira crescente, entretanto, o platô na resposta se deu na concentração de 30 mg/ml, dado que a diferença desta para 100 e 300 mg/ml são de apenas 6,51% e 1,46%, respectivamente.

Curiosamente, a curva concentração-resposta do butirato utilizando a inulina apresenta um comportamento crescente até a concentração de 30 mg/ml e a partir desta apresenta uma inflexão em seu perfil, tendo as concentrações superiores produção de butirato 58,16% e 78,88% respectivamente menores que a concentração de 30 mg/ml, que resultou na produção total de 536,29 mMol/g.

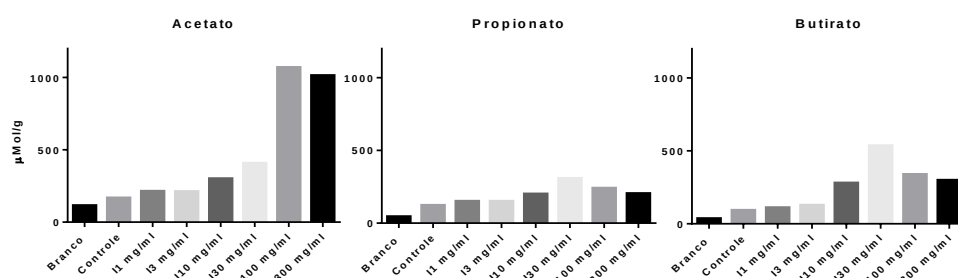


Figura 9: Concentrações de acetato, propiônico e butírico nos grupos Branco, controle e para as sucessivas concentrações de Inulina

Na avaliação do perfil de produção dos AGCCs utilizando 30 mg ou 100, notou-se uma alteração do perfil butirogênico para acetogênico com o aumento da disponibilidade de substrato, logo, foi estabelecida a concentração de 30 mg/ml como padrão para a realização de fermentações futuras devido a melhor produção de butirato e níveis equivalentes de propionato a concentrações superiores.

ii. Sacarose

A Figura 9 demonstra as diferentes produções de AGCC obtidos com a fermentação de sacarose (Sa) nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/ml.

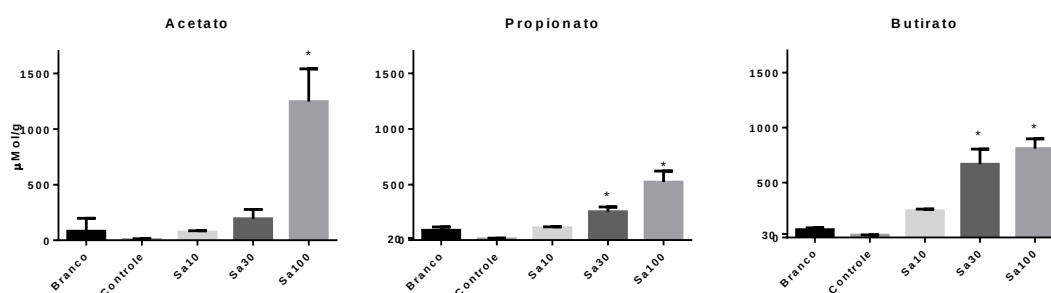


Figura 10: Concentrações de acetato, propionato e butirato obtidas na fermentação com a sacarose (Sa) nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/ml. * representa grupos diferente do grupo controle. $p < 0,05$.

De modo similar ao observado na fermentação da inulina, a fermentação com concentrações crescentes de sacarose apresentou produção de acetato com tendência concentração-dependente sendo a maior produção obtida com a concentração de 100 mg/ml.

Também para propionato a concentração de 100 mg/ml foi a mais eficiente em termos de produção (51% superior a concentração de 30 mg/ml). Diferentemente do observado com inulina, a maior produção de butirato foi com a concentração de 100 mg/ml, desta vez com menor diferença comparado à

concentração subsequente, sendo 100 e 30 mg/ml significativamente diferente do grupo controle.

A Figura 11 demonstra as produções comparativas dos três AGCCs analisados na fermentação com a sacarose a 30 e 100 mg/ml respectivamente.

Utilizando 30 mg/ml de sacarose não foram observadas diferenças significativas entre as produções de acetato e propionato, entretanto ambas foram significativamente inferiores a butirato. Distintivamente, ao se utilizar a concentração de 100 mg/ml a maior produção observada é a de acetato, diferindo significativamente apenas de propionato.

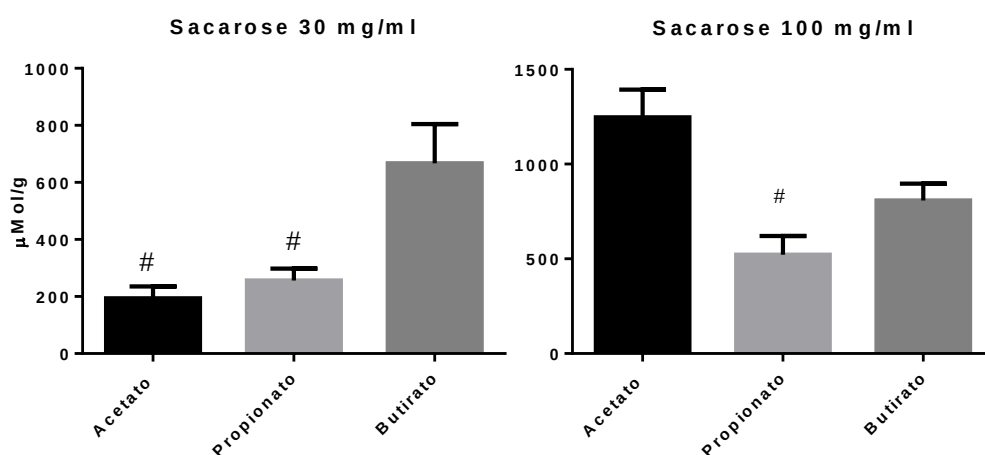


Figura 11: Concentrações de acetato, propionato e butirato obtidos na fermentação de sacarose 30 mg/ml. * representa grupos diferentes de butirato. $p < 0,05$.

4.6 Homogeneidade entre diferentes fermentações

i. Fermentações com Inulina 30 mg/ml

A Figura 12 demonstra os valores médios de acetato, propionato e butirato em fermentações realizadas com as amostras de um mesmo doador, coletadas e fermentadas em 33 dias diferentes. O valor médio de acetato foi de $177,7 \pm 27,29$ mMol/g, seguido de $166,9 \pm 15,50$ mMol/g de propionato enquanto o butirato apresentou média de $507,2 \pm 35,23$ mMol/g. É interessante ressaltar que entre os diferentes ácidos graxos, como referido pela literatura [82], a inulina apresenta uma tendência a gerar maior teor de butirato em relação aos

demais AGCCs analisados (285,45% e 203,87% a mais que os propionato e butirato, respectivamente).

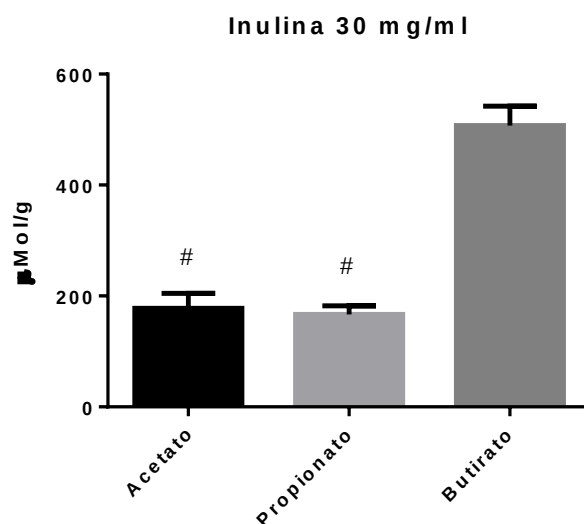


Figura 12: Comparação entre as diferentes concentrações de AGCC na fermentação com Inulina 30 mg/ml. Diferenças estatísticas considerando $p < 0,005$. # vs butirato.

ii. Influência da inulina na produção dos diferentes AGCCs

A Figura 13 demonstra os valores obtidos separadamente sobre a produção dos ácidos acético, propiônico e butírico dos grupos Branco, controle e Inulina 30 mg/ml.

É possível notar um aumento significativo na produção de acetato promovido pela inulina a 30 mg/ml no processo de fermentação em relação ao grupo branco e de 361,33% em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos branco e controle. De maneira semelhante, a produção de propionato promovida pela inulina a 30 mg/ml foi de 417,54% em relação ao grupo branco e de 656% em relação ao grupo controle, sendo a diferença de 67,39% entre branco e controle não significativa estatisticamente (Figura 13).

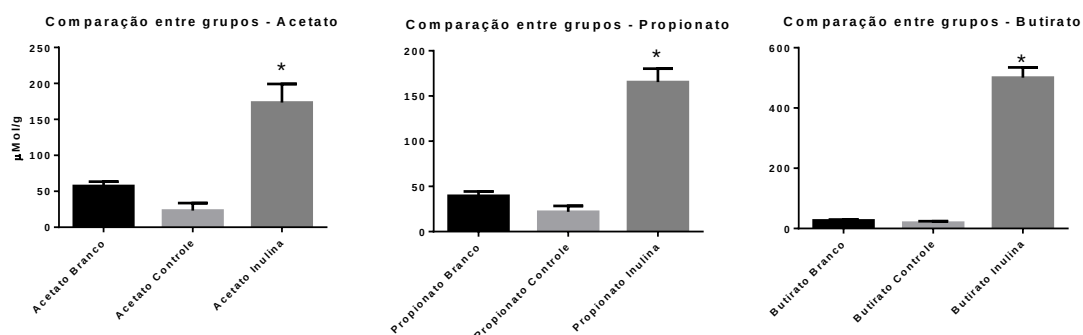


Figura 13: Comparação entre os perfis de acetato obtido nos grupos Branco, controle e Inulina 30 mg/ml. Diferenças estatísticas considerando-se $p < 0,005$. * $\neq$ grupo controle.

Dentre todos os AGCCs analisados, o butirato apresentou as maiores concentrações. A produção de butirato promovida pela inulina a 30 mg/ml foi de 2516,43% em relação ao grupo branco e de 1760,11% em relação ao grupo controle. A diferença entre os grupos branco e controle foi mais pronunciada que os anteriores sendo de 40,65%, ainda assim, estatisticamente não significativa.

Este conjunto de experimentos demonstrou um perfil de resposta à fermentação com inulina, estabelecendo assim, o comportamento padrão da fermentação *in vitro*.

4.7 Comparação entre diferentes doadores

A Figura 10 demonstra o perfil comparativo de acetato, propionato e butirato em amostras do grupo Branco e fermentadas com inulina 30 mg/ml de quatro doadores diferentes.

Através desta análise comparativa foi possível observar que a utilização da concentração de inulina a 30 mg/ml modula positivamente a produção de propionato apenas entre os doadores A e B, enquanto a produção de acetato foi modulada apenas no doador B e a de butirato foi positivamente modulada em todas as amostras testadas.

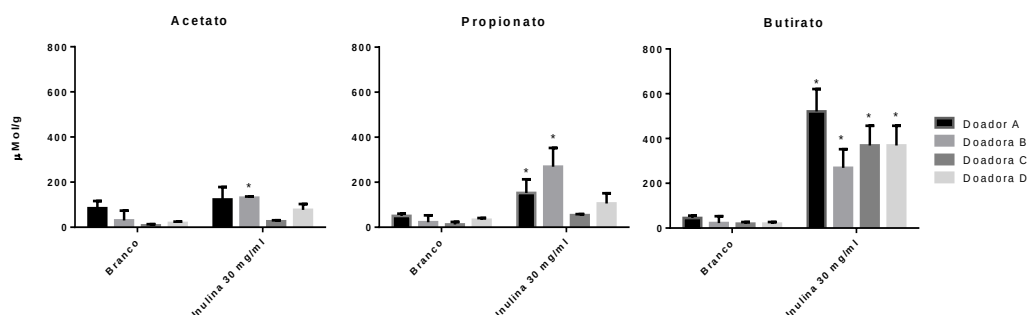


Figura 14: Perfil de produção de acetato, propionato e butirato de quatro doadores diferentes com inulina. * representa diferenças significativas de grupo Branco. $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A metodologia padronizada por Almeida-Júnior e cols. [80] para a análise dos AGCCs em amostras de fezes frescas e usada nesse estudo se demonstrou igualmente robusta para análise do perfil de AGCCs nas amostras fermentadas na etapa de extração e quantificação, tanto para a identificação dos ácidos graxos de cadeia curta como na análise em diferentes escalas, que variam de algumas dezenas de micromolares/grama até 1,2 mMol/g. Em termos de padronização e avaliação da estabilidade do método de fermentação *in vitro* realizadas com a amostra de um único doador, a maior proporção de acetato seguida de valores semelhantes de propionato e butirato obtidas no grupo Branco estão de acordo com a literatura [83], e a utilização de carboidratos (inulina ou sacarose) modificou o perfil destes AGCCs de maneira concentração-dependente e uniforme entre diferentes dias de fermentação.

Em se tratando das variáveis de influência no processo de fermentação a utilização de diferentes quantidades de fezes (1 e 2 gramas) por tubo com a adição de quantidade padronizada de inulina (30 mg/ml) demonstrou um perfil de produção de acetato e butirato maior com 2 gramas em comparação com 1 grama de fezes. Tendo em vista que foi utilizada a mesma quantidade de inulina para diferentes quantidades de fezes, supõe-se que a maior carga microbiana presente nos dois gramas de fezes em relação a um grama permita melhor aproveitamento do substrato disponível, no caso, a inulina.

A curva de concentração utilizando inulina e sacarose como substratos da fermentação demonstrou a sensibilidade da técnica em termos de responder à diferentes quantidades de um produto para as mesmas condições de disponibilidade de microrganismos e meio (solução de bicarbonato de sódio). A curva de concentração dos substratos fermentáveis para entender o comportamento da fermentação em diferentes disponibilidades de substratos foi inicialmente estabelecida utilizando a inulina, um oligossacarídeo de alto peso molecular composto basicamente de fibras solúveis [82]. A utilização de inulina em concentrações mais baixas como 1 e 3 mg/ml não promoveu alterações expressivas na produção dos três AGCCs, entretanto, ao comparar o perfil dos três AGCCs utilizando 10, 30 e 100 mg/ml de inulina como substrato, notou-se aumento concentração-dependente dos três AGCCs. Adicionalmente, bactérias específicas tal qual *F. praunsnitzii* em situações de alta disponibilidade de butirato podem fazer a conversão deste AGCC em acetato [80], com o aumento da concentração de inulina de 30 mg/ml para 100 mg/ml foi observado diminuição dos níveis de butirato comparado com os níveis de acetato, esta alteração do perfil butirogênico para acetogênico pode ser explicada por esta via utilizada pela *F. praunsnitzii* se for considerado que o aumento da concentração de inulina na fermentação promove aumento da produção e butirato e este é convertido em acetato posteriormente.

Além disso, o protocolo proposto analisou os metabólitos bacterianos após 24 horas de processo, sendo importante ressaltar que o processo é dinâmico ao longo do tempo e envolveu a utilização do substrato disponível por diferentes espécies de bactérias em momentos distintos do processo, sendo que os produtos bacterianos de um microrganismo em um dado momento, podem ser utilizados por outra espécie subsequentemente [84].

Por outro lado, as fermentações com concentrações crescentes de sacarose, um dissacarídeo, apresentou perfil concentração-dependente nos três AGCCs analisados para as duas concentrações testadas, 30 e 100 mg/ml, diferentemente do perfil encontrado com a inulina onde foi observada inflexão da curva na concentração de 30 para 100 mg/ml. Comparando os AGCCs, o aumento da concentração de sacarose leva a mudança do perfil de metabólitos, assim como com a inulina, no entanto de forma mais específica para a produção

de acetato, quando comparado com 30 mg/ml, onde a maior produção é de butirato. De mesmo modo, através da metodologia aplicada não foi possível afirmar se a maior produção de acetato observado com a fermentação de 100 mg/ml de sacarose foi de fato a acetato ou se houve a conversão de butirato em acetato. A sacarose é um dissacarídeo composto de glicose e frutose, com grau de oligomerização muito menor que o da inulina. Embora a inulina seja fracionada em polímeros de frutose menores por ação de enzimas bacterianas, o processo se dá em um número maior de etapas. Liu e colaboradores (2022) demonstraram através de estudos *in vitro* com inulina e a microbiota intestinal a geração dos ácidos acético, fórmico e propionato além de modular as vias do metabolismo da β -alanina, propanoato, arginina, prolina, glutatona e promover aumento das concentrações de L-fucose, D-galactose, L-ornitina, D-frutose e D-eritrose [85]. Adicionalmente, o perfil de fermentação *in vitro* da inulina demonstra uma variação ao longo do tempo, com tendência inicial a maior produção de acetato e propionato até atingir uma estabilização e então favorecer maiores concentrações de butirato [86].

Ao se observar apenas a produção de AGCCs constatou-se que a inulina e a sacarose beneficiaram a produção de AGCCs em perfis semelhantes quando usadas nas concentrações de 30 e 100 mg/ml. Em outros estudos *in vitro* foi demonstrado de maneira semelhante aumento progressivo da produção de acetato, propionato, butirato e lactato de 0 até 48 horas de fermentação com manutenção do perfil após esse período, utilizando-se inulina e sacarose a 1% do volume total e apresentando concentrações similares para os dois substratos [87]. Embora a geração dos AGCCs analisados na fermentação de inulina e sacarose foram semelhantes em proporção, é possível que cada produto modularia a proliferação de diferentes microrganismos, visto que a análise exclusiva dos AGCCs não é capaz de elucidar os possíveis metabólitos intermediários do processo bem como os diferentes microrganismos envolvidos no processo. De fato, em um estudo de fermentação *in vitro* com fezes humanas, a inulina promoveu a proliferação de bactérias do gênero *Roseburia*, *Blautia* e *Bifidobacterium*, e mais especificamente *Ruminococcus broomi*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium longum* [73]. Igualmente, a inulina em amostras de fezes de suínos promoveu a proliferação de bactérias do gênero

Bifidobacterium, e *Roseburia* além de *Fecaelibacterium* e *Enterococcus* e diminuição de bactérias do gênero *Shigella* [86].

Em um estudo com camundongos obesos Tomioka e colaboradores (2022) observaram a ação bloqueadora da L-arabnose sobre a sacarase e que a administração conjunta com sacarose promove aumento significativo de *Bifidobacteria acidifaciens* e a associação promove aumento significativamente superior de acetato, efeito atribuído a geração de acetil-coA e acetil fosfato advindos da glicólise [88]. Em contrapartida à proliferação de bactérias do gênero das bifidobactérias promovida pela sacarose, um estudo com camundongos realizado por Kawano e colaboradores (2022) demonstrou que uma dieta rica em gorduras ou rica em mono e dissacarídeos favoreceu a proliferação de bactérias patogênicas da família *Erysipelotrichaceae* e também de *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, produtoras de AGCCs, além da supressão de *Fecaelibacterium rodentium*, sugerindo que embora dissacarídeos promovam aumento na produção de AGCCs, podem beneficiar microrganismos patogênicos [89].

Outro aspecto avaliado foi a reprodutibilidade do método, visto que se baseia em amostras de fezes de doadores que sofrem variações na sua constituição bioquímica e microbiológica ao longo dos dias e período de vida. O presente estudo baseou sua padronização nas amostras de um doador, além de um estudo adicional com amostra de mais três doadores, sendo todos de mesmo grupo etário e na ausência de doenças inflamatórias, autoimunes e apenas uma delas referindo uso de medicamentos. Considerando o primeiro doador, foi observado que tanto em uma única fermentação utilizando inulina 30 mg/ml quanto ao se realizar as fermentações em 33 dias diferentes, os perfis de produção, as diferenças relativas entre os AGCCs e as escalas nas produções se mantiveram, indicando a estabilidade da técnica. Na comparação entre os diferentes doadores, o caráter butirogênico da inulina foi confirmado ao modular positivamente a produção de butirato em todas as amostras testadas independente do doador, utilizando-se 30 mg/ml em comparação com as amostras não fermentadas.

Ademais, a variabilidade das amostras de fezes foi verificada através do consumo diário de fibras nos dias precedentes à fermentação sem obter uma correlação razoável entre a quantidade de fibras consumidas e os valores de AGCCs obtidos, denotando que o consumo de fibra alimentar às vésperas do estudo não representa isoladamente um bom preditor do desempenho do ensaio de fermentação *in vitro*. A dieta é um dos fatores de maior capacidade de modulação da microbiota, tanto pela frequência de estímulos (refeições) quanto por se fazer presente ao longo de toda a vida. Em 2014, David e colaboradores demonstraram que com apenas cinco dias consecutivos de alteração na dieta já se pode observar alterações em perfis de microrganismos e metabólitos, quando foi comparada uma dieta estritamente vegetariana com uma baseada em produtos animais [90]. Isto se torna especialmente importante levando em conta que a microbiota intestinal se beneficia de carboidratos, fibras, proteínas e até mesmo lipídios provenientes da dieta ao longo de semanas ou meses, além da modulação ser observada apenas para algumas espécies ou gêneros [91].

Ainda com relação a variabilidade de doadores para estudos de fermentação *in vitro*, Aguirre e colaboradores (2014) demonstrou que realizar a coleta e homogeneização de amostras de três diferentes doadores não apresenta diferenças em relação à produção de AGCCs e modulação microbiana quando comparado com a fermentação de um único indivíduo, com a vantagem que a homogeneização de amostras de diferentes doadores tende a minimizar os efeitos de uma microbiota debilitada ou com expressões específicas de gêneros específicos característicos da variabilidade individual [92].

6. Conclusão

Através dos protocolos adotados foi possível padronizar a técnica de fermentação *in vitro* do tipo “batch” de forma robusta e apropriada para avaliar a modulação da produção de AGCCs por meio do uso de diferentes carboidratos, sendo uma metodologia com reprodutibilidade mesmo quando se utilizou amostras de diferentes indivíduos, com de diferentes dias de fermentação e produção dependente da concentração utilizada.

7. Referências

1. Galler, J.R., et al., *Neurodevelopmental effects of childhood malnutrition: A neuroimaging perspective*. Neuroimage, 2021. **231**: p. 117828.
2. Monteiro, C.A., et al., *Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system*. Obes Rev, 2013. **14 Suppl 2**: p. 21-8.
3. FAO, *DECLARATION OF THE WORLD SUMMIT ON FOOD SECURITY*, W.S.o.F. Security, Editor. 2009.
4. Ministério da Saúde, S.d.A.à.S., *Guia alimentar para a população brasileira*, S.d.A.à.S. Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica., Editor. 2014, Ministério da Saúde: Brasília.
5. Vidar, M., *Soil and agriculture governance and food security*. Soil Security, 2022. **6**: p. 100027.
6. Johnstone, P. and C. McLeish, *World wars and sociotechnical change in energy, food, and transport: A deep transitions perspective*. Technological Forecasting and Social Change, 2022. **174**: p. 121206.
7. Liu, S., et al., *Toward a "Green Revolution" for Soybean*. Mol Plant, 2020. **13**(5): p. 688-697.
8. Berman, N., et al., *Crop prices and deforestation in the tropics*. Journal of Environmental Economics and Management, 2023. **119**: p. 102819.
9. Popkin, B.M., C. Corvalan, and L.M. Grummer-Strawn, *Dynamics of the double burden of malnutrition and the changing nutrition reality*. Lancet, 2020. **395**(10217): p. 65-74.
10. Seferidi, P., et al., *Global inequalities in the double burden of malnutrition and associations with globalisation: a multilevel analysis of Demographic and Health Surveys from 55 low-income and middle-income countries, 1992-2018*. Lancet Glob Health, 2022. **10**(4): p. e482-e490.
11. Abay, K.A., H. Ibrahim, and C. Breisinger, *Food policies and obesity in low- and middle-income countries*. World Development, 2022. **151**: p. 105775.
12. Gustat, J.S., S.R.; Elkasabany, A. Berenson GS, *Relation of selfrated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance syndrome in young adults: Te Bogalusa Heart Study*. . Journal of clinical epidemiology, 2002. **55**(10): p. 997-1006.
13. Kramer, H., *Kidney Disease and the Westernization and Industrialization of Food*. Am J Kidney Dis, 2017. **70**(1): p. 111-121.
14. Association, A.D., *Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber*. J Am Diet Assoc, 2008. **108**(1716-1731).
15. Bradley, M., et al., *Obesity and malnutrition in children and adults: A clinical review*. Obesity Pillars, 2023. **8**: p. 100087.
16. Chong, B., et al., *Trends and predictions of malnutrition and obesity in 204 countries and territories: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019*. EclinicalMedicine, 2023. **57**: p. 101850.
17. Tanumihardjo, S.A., et al., *Poverty, obesity, and malnutrition: an international perspective recognizing the paradox*. J Am Diet Assoc, 2007. **107**(11): p. 1966-72.
18. WHO. *Noncommunicable diseases*. 2023 [cited 2023; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.
19. Organization, W.H., *GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases*. 2014.
20. Thakur, J.S., R. Paika, and S. Singh, *Burden of noncommunicable diseases and implementation challenges of National NCD Programmes in India*. Medical Journal Armed Forces India, 2020. **76**(3): p. 261-267.
21. Rauber, F., et al., *Ultra-Processed Food Consumption and Chronic Non-Communicable Diseases-Related Dietary Nutrient Profile in the UK (2008(-)2014)*. Nutrients, 2018. **10**(5).

22. Narula, N., et al., *Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: prospective cohort study*. BMJ, 2021. **374**: p. n1554.
23. Martinez Leo, E.E. and M.R. Segura Campos, *Effect of ultra-processed diet on gut microbiota and thus its role in neurodegenerative diseases*. Nutrition, 2020. **71**: p. 110609.
24. Sonnenburg, E.D., et al., *Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1241-52.
25. Manimozhiyan Arumugam, J.R., Eric Pelletier, Denis Le Paslier,, et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2013. **437**: p. 174–180.
26. Human Microbiome Project, C., *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 207-14.
27. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
28. Seeley, M.B.R.J., *Obesity and gut flora*. NATURE, 2006. **444**(7): p. 21-28.
29. Chen, K., et al., *Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide Contributes to Cardiac Dysfunction in Western Diet-Induced Obese Mice*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 139.
30. Karamzin, A.M., et al., *Akkermansia muciniphila and host interaction within the intestinal tract*. Anaerobe, 2021. **72**: p. 102472.
31. Martini, E., et al., *Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **4**(1): p. 33-46.
32. Kronsten, V.T., et al., *Gut-derived systemic inflammation as a driver of depression in chronic liver disease*. J Hepatol, 2022. **76**(3): p. 665-680.
33. Zhang, Y., et al., *TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure*. Transl Res, 2021. **228**: p. 109-125.
34. Pasini, E., et al., *Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure*. JACC Heart Fail, 2016. **4**(3): p. 220-7.
35. Sandek, A., et al., *Altered intestinal function in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(16): p. 1561-9.
36. Agus, A., J. Planchais, and H. Sokol, *Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(6): p. 716-724.
37. Dean, J.W. and L. Zhou, *Cell-intrinsic view of the aryl hydrocarbon receptor in tumor immunity*. Trends Immunol, 2022. **43**(3): p. 245-258.
38. Hara, T., et al., *Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(9): p. 1292-300.
39. H. Tazoe, Y.O., I. Kaji, I. Tanaka, S. I. Karaki, A. Kuwahara, *Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions*. Journal of Physiology and Pharmacology, 2008. **59**(2): p. 251-262.
40. Julia M. W. Wong, R.d.S., Azadeh Emam, Cyril W. C. Kendall, David J. A. Jenkins, *Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids*. J Clin Gastroenterol 2006. **40**(3).
41. Bartoszek, A., et al., *Free Fatty Acid Receptors as new potential therapeutic target in inflammatory bowel diseases*. Pharmacol Res, 2020. **152**: p. 104604.
42. E. N. Bergman, J.E.W., *Metabolims of volatile fatty acid by liver and portal-drained viscera in sheep*. American Journal of Phisiology, 1971. **22**(2).
43. Duncan, S.H., et al., *Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria*. Br J Nutr, 2004. **91**(6): p. 915-23.
44. Soliman, M.L. and T.A. Rosenberger, *Acetate supplementation increases brain histone acetylation and inhibits histone deacetylase activity and expression*. Mol Cell Biochem, 2011. **352**(1-2): p. 173-80.

45. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology*. Cell Res, 2011. **21**(2): p. 223-44.
46. Li, D., et al., *Diet-gut microbiota-epigenetics in metabolic diseases: From mechanisms to therapeutics*. Biomed Pharmacother, 2022. **153**: p. 113290.
47. Xiong, Y., et al., *Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(4): p. 1045-50.
48. Roelofsen, H., M.G. Priebe, and R.J. Vonk, *The interaction of short-chain fatty acids with adipose tissue: relevance for prevention of type 2 diabetes*. Benef Microbes, 2010. **1**(4): p. 433-7.
49. George T. Macfarlane, S.M., *Fermentation in the Human Large Intestine Its Physiologic Consequences and the Potential Contribution of Prebiotics*. J Clin Gastroenterol, 2011. **4**(3).
50. Evelyne M Dewulf, et al., *Evaluation of the relationship between GPR43 and adiposity in human*. Nutrition & Metabolism, 2013. **10**(11).
51. Maslowski, K.M. and C.R. Mackay, *Diet, gut microbiota and immune responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 5-9.
52. Vijay-Kumar, M., et al., *Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5*. Science, 2010. **328**(5975): p. 228-31.
53. Fontana, L. and L. Partridge, *Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans*. Cell, 2015. **161**(1): p. 106-118.
54. Roberfroid, M., *Functional Food and Concept and its application to prebiotic*. Digest Liver Dis, 2002. **34**(2).
55. Westenbrink, S., K. Brunt, and J.W. van der Kamp, *Dietary fibre: challenges in production and use of food composition data*. Food Chem, 2013. **140**(3): p. 562-7.
56. Anderson, J.W., et al., *Health benefits of dietary fiber*. Nutr Rev, 2009. **67**(4): p. 188-205.
57. Fuller, S., et al., *New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review*. Plant Foods Hum Nutr, 2016. **71**(1): p. 1-12.
58. Maya Pineiro, et al., *FAO Technical Meeting on Prebiotics*. J Clin Gastroenterol 2008. **42**(3).
59. Johnson, I.T., *Fiber*. 2020: p. 515-529.
60. FAO, *Global food losses and food waste*. 2011.
61. COELHO, M.A.Z., et al., *APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: PRODUÇÃO DE ENZIMAS A PARTIR DA CASCA DE COCO VERDE*. B.CEPPA, 2001. **19**(11): p. 33-42.
62. Estatística, I.N.d., *Estatísticas Agrícolas*, I.N.d. Estatística, Editor. 2013.
63. Reis, I.A.O., et al., *Characterization of flour obtained from waste of cassava minimally processed*. SCIENTIA PLENA, 2011. **7**(12).
64. Galanakis, C.M., *Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications*. Trends in Food Science & Technology, 2012. **26**(2): p. 68-87.
65. Pintado, M.E. and J.A. Teixeira, *Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado*. Boletim de Biotecnologia, 2015.
66. IBGE, *LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA*. 2019.
67. Bischoff, S.C., *'Gut health': a new objective in medicine?* BMC Medicine, 2011. **9**:24.
68. Payne, A.N., et al., *Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling*. Trends Biotechnol, 2012. **30**(1): p. 17-25.
69. G.T. Macfarlane, S.M., G.R. Gibson, *Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon*. Microb Ecol 1998. **35**: p. 180-187.

70. Wang, M., et al., *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 2019. **88**: p. 1-9.
71. Kang, J., et al., *Fermentation models of dietary fibre in vitro and in vivo - A review*. *Food Hydrocolloids*, 2022. **131**: p. 107685.
72. Ji, H., et al., *In vitro* gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022. **62**(19): p. 5349-5371.
73. Reichardt, N., et al., *Specific substrate-driven changes in human faecal microbiota composition contrast with functional redundancy in short-chain fatty acid production*. *ISME J*, 2018. **12**(2): p. 610-622.
74. Tan, J., et al., *The role of short-chain fatty acids in health and disease*. *Adv Immunol*, 2014. **121**: p. 91-119.
75. Mandalika, D.K., S. Patel, and S. Seshadri, *The Combinatorial Effect of Acetate and Propionate on High-Fat Diet Induced Diabetic Inflammation or Metaflammation and T Cell Polarization*. *Inflammation*, 2021. **44**(1): p. 68-79.
76. Gurry, T. and L. Scapozza, *Exploiting the gut microbiota's fermentation capabilities towards disease prevention*. *J Pharm Biomed Anal*, 2020. **189**: p. 113469.
77. Tawfick, M.M., et al., *Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics*. *Int J Biol Macromol*, 2022. **208**: p. 948-961.
78. Zou, J., et al., *Inulin Fermentable Fiber Ameliorates Type I Diabetes via IL22 and Short-Chain Fatty Acids in Experimental Models*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021. **12**(3): p. 983-1000.
79. Comalada, M., et al., *The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006. **132**(8): p. 487-97.
80. Almeida-Junior, L.D., et al., *Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp.* AAA) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation*. *Journal of Functional Foods*, 2017. **38**: p. 497-504.
81. Tsitko, I., et al., *A Small In Vitro Fermentation Model for Screening the Gut Microbiota Effects of Different Fiber Preparations*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(8).
82. Uerlings, J., et al., *Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells*. *Journal of Functional Foods*, 2020. **67**: p. 103855.
83. den Besten, G., et al., *The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(9): p. 2325-40.
84. Flint, H.J., et al., *Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut*. *Gut Microbes* 2012. **3**:4: p. 289-306.
85. Liu, C., et al., *Combination of microbiome and metabolome to analyze the cross-synergism mechanism of inulin and gut microbiota in vitro and vivo*. *Food Bioscience*, 2022. **49**: p. 101915.
86. Chen, N., et al., *Dynamic changes of inulin utilization associated with longitudinal development of gut microbiota*. *Int J Biol Macromol*, 2023. **229**: p. 952-963.
87. Holgado, F., et al., *Assessment of the prebiotic potential of globe artichoke by-product through in vitro fermentation by human faecal microbiota*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2022. **28**: p. 100328.
88. Tomioka, S., et al., *Cooperative action of gut-microbiota-accessible carbohydrates improves host metabolic function*. *Cell Rep*, 2022. **40**(3): p. 111087.
89. Kawano, Y., et al., *Microbiota imbalance induced by dietary sugar disrupts immune-mediated protection from metabolic syndrome*. *Cell*, 2022. **185**(19): p. 3501-3519 e20.
90. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 559-63.

91. Senghor, B., et al., *Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance*. Human Microbiome Journal, 2018. **7-8**: p. 1-9.
92. Aguirre, M., et al., *To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies*. J Microbiol Methods, 2014. **107**: p. 1-7.

Capítulo 2

Caracterização da fermentação *in vitro* na identificação de atividade prebiótica de subprodutos agrícolas

1. Introdução

Cerca de um terço de toda produção de alimentos no mundo é desperdiçada ao longo da produção, processamento e consumo [1]. No que se refere às perdas durante o processamento e consumo, uma parcela considerável ocorre no descarte de partes dos alimentos como cascas, caroços, sementes e raízes. Ao mesmo tempo, estas partes que são ricas em compostos têm sido utilizadas, em sua maioria, na alimentação animal ou ainda descartadas, neste aspecto caracterizando um subaproveitamento das mesmas e gerando impactos ambientais negativos devido à má gestão destes compostos orgânicos [2]. Estes compostos apresentam grande potencial em aplicações onde possam vir a ter alto valor agregado e novas finalidades como no setor estético, farmacêutico e alimentício [3]. Um exemplo é a utilização de fibras alimentícias presente nesses subprodutos em substituição a açúcares adotados atualmente pela indústria de alimentos, tendência adotada por diversos países e, por consequência, cobrada da indústria na busca por formulações com menor teor de açúcares e danos à saúde [4]. Além disso, fibras solúveis são o principal componente da dieta capazes de modular a microbiota intestinal além de estarem associadas com a prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis [5]. Tais fatos despontam subprodutos vegetais como potenciais fontes de compostos bioativos, não só pelas fibras, mas também pela presença de fitoesteróis, ácidos orgânicos, polifenóis e compostos antioxidantes, passíveis de serem utilizados pela microbiota intestinal, caracterizando uma funcionalidade prebiótica, ou até mesmo pelo indivíduo que o consome, atribuindo atividade funcional [6]. Além de atender demandas regulatórias de produtos alimentícios industrializados, a rica complexidade de compostos bioativos nos subprodutos representa uma fonte de moléculas que podem ser exploradas no desenvolvimento de nutracêuticos e suplementos coadjuvantes no tratamento das mais diversas condições crônicas de saúde, dada sua ampla gama de moléculas e

consequentemente distintos alvos terapêuticos, aumentando mecanismos de resposta [7].

Estimativas apontam que o mercado de prebióticos movimentou U\$ 2,9 bilhões no ano de 2015, tendo uma projeção de que estas cifras alcancem 10,5 bilhões em 2025 [8]. Considerando-se o potencial comercial, ambiental e terapêutico dos subprodutos, estudos na prospecção e confirmação destas atividades se fazem emergentes. Assim sendo, este estudo envolveu a análise de três subprodutos da cadeia agrícola brasileira: a cascara de *Coffea* arábica (café) o caroço de *Euterpe oleraceae* (açaí) e o bagaço de *Citrus sinensis* (laranja). Nestes produtos foram caracterizados perfis bioquímicos, atividades antioxidante e potencial modulatório na produção de AGCCs e microbiota com base na técnica de fermentação *in vitro*.

2. Objetivo

Considerando as perspectivas futuras na gestão de resíduos, a importância das matérias-primas vegetais como fonte de compostos bioativos, potencialmente prebióticos e o desenvolvimento tecnológico como modo de aproveitamento de recursos, este capítulo tem por objetivo determinar a capacidade prebiótica de subprodutos alimentares a cascara de *Coffea arabica*, o caroço de *Euterpe oleraceae* e o bagaço de *Citrus sinensis* por meio da produção de AGCCs e modulação da microbiota.

3. Metodologia

3.1 Preparo de Amostras

i. Caro de Açaí

O caroço do açaí (*Euterpe oleracea*) foi fornecido pela empresa Verum Ingredients do Brasil e as amostras foram lavadas e secas em estufa a 50°C por 48 horas. O processo resultou na perda de 36,7% da massa inicial, em seguida, as fibras do mesocarpo foram removidas manualmente e os caroços submetidos a trituração em moinho de facas.

ii. Bagaço de Laranja

O bagaço de laranja (*Citrus sinensis*) também foi fornecido pela empresa Verum Ingredients do Brasil. As amostras foram recebidas já desidratadas e seccionadas e as mesmas foram submetidas ao processo de trituração em moinho de facas nas mesmas condições anteriores.

iii. Fração solúvel do Bagaço de laranja

A fração solúvel do bagaço de laranja (*Citrus sinensis*) foi fornecido pela empresa Verum Ingredients do Brasil. As amostras foram obtidas pelo processamento do bagaço de laranja secos e triturados em moinho de facas. Esta farinha foi submetida a refluxo utilizando água como solvente durante 40 minutos, em seguida degradadas por pectinases e, por fim, liofilizadas obtendo um pó de alta solubilidade.

iv. Casca de café

Da maneira semelhante aos produtos anteriores, a casca de café (*Coffea arabica*) foi fornecida pela empresa Verum Ingredients do Brasil. As amostras se encontravam previamente desidratadas e foram submetidas ao processo de secagem em estufa por 48 horas a 50° C. Em seguida foram trituradas em moinho de facas. O processo de secagem resultou na perda de 9,26% da massa inicial do produto.

v. Inulina

A fibra alimentar solúvel inulina foi cedido pela empresa Beneo (Inulina Orafiti® HP). Trata-se de um produto puro (99%) com grau de polimerização ≥ 23 , segundo o fornecedor. A inulina foi incluída neste estudo como marcador positivo da atividade microbiana e produção de AGCCs durante o processo de fermentação *in vitro*, devido seu já conhecido potencial prebiótico, especialmente na atividade butirogênica.

3.2 Composição química dos subprodutos

i. Análise Bromatológica

A quantificação de calorias totais, carboidratos, fibras alimentares, gordura bruta, proteína, umidade e cinzas foi realizada em laboratório externo da empresa Eurofins Scientific a partir das amostras secas e trituradas em moinho de facas seguindo os métodos CFR – Atwater, CRF 21- calc., AOAC 991.43, AOAC 954.02, AOAC 990.03 e 992.15, AOAC 925.09 e AOAC 942.05, respectivamente.

i. Determinação das Fibras Alimentares nos Subprodutos

A análise do perfil de distribuição das fibras alimentares dos diferentes produtos foi avaliada com a utilização de kit comercial “Integrated Total Dietary Fiber Assay Kit” (Megazyme) com modificações dos métodos AOAC 2009.01/AOAC 2011.25 desenvolvidos por McCleary e colaboradores (2015) [9].

ii. Quantificação de Polifenóis

Os polifenóis totais presentes nos produtos testados foram quantificados através de métodos espectrofotométrico pela reação com Folin Ciocalteau (FCR) e carbonato de cálcio.

A solução de Folin Ciocalteau foi preparada adicionando 5 ml do reagente (FCR) em tubo de ensaio (20 mL) com 20 mL de água ultra pura e agitação em vórtex por 1 minuto.

A solução de carbonato de cálcio foi preparada utilizando-se 20 g do mesmo em béquer de 250 ml adicionado de 80 mL de água ultra pura sob agitação constante e aquecimento de 70 a 80 °C durante 15 minutos. Posteriormente, transferido para balão de 100 mL e com volume ajustado para a capacidade do balão com água ultra pura.

A quantificação se dá por equivalentes de ácido gálico. A solução estoque de ácido gálico foi preparada diluindo-se 10,0 mg da substância em 10 ml de água ultra pura e agitada em agitador automático por 30 segundos e ultra-som por 5 minutos. A solução foi preparada e armazenada em frasco âmbar. A partir desta, foi preparada solução trabalho a uma concentração de 100 µg/ml. Uma curva de calibração foi realizada com a solução de trabalho nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ng/mL.

Para a análise dos produtos de interesse, foram macerados 2g das amostras secas e trituradas em 50 mL de metanol 70% em ambiente refrigerado (0 - 4°C) durante 72 horas. Os extratos foram filtrados e rotaevaporados em balão volumétrico de 250 mL. O material seco resultante foi ressuspensionado em 50 mL de água ultra pura e armazenado em frasco âmbar, com posterior agitação vigorosa em frasco âmbar antes das análises.

A reação foi realizada transferindo 500 µL de cada extrato para balão volumétrico com seguida agitação por 30 segundos. Foram acrescentados de 100 µL da solução de carbonato de cálcio e 500 µL da solução Folin Ciocalteu. A solução final foi agitada manualmente por 10 segundos e posta em repouso por 30 minutos. Ao final do período, foi homogeneizada e sua absorbância aferida em espectrofotômetro BioTek PowerWave HT com absorbância de 700 nm .

A solução branco foi preparada de mesma maneira utilizando-se 500 µL da solução Folin ciocalteu e 1 mL da solução de carbonato de cálcio diluídos em 10 mL de água ultra pura, com posterior repouso de 30 minutos, agitação e aferição da absorbância em comprimento de onda de 700 nm.

Os polifenóis totais detectados nas amostras foram determinados, utilizando-se a curva de calibração através da seguinte fórmula:

$$(\%)TeorPolifenóis(\%) = \frac{(Aa \times MP(g) \times 6000 \times PP)}{Ap \times TE(g)}$$

Onde:

Aa = Absorbância da Amostra;

Ap = Absorbância da Padrão;

MP = Tomada de Ensaio do Padrão;

PP = Pureza do Padrão. (Ex: Se a pureza do padrão for 99,0% o valor de PP será 0,99);

TE = Tomada de Ensaio em (g).

iii. Avaliação da Atividade Antioxidante (DPPH)

- Preparação de Extratos

Partindo-se das amostras vegetais pulverizadas, foram realizados extratos hidroalcoólicos por maceração a frio do caroço de açaí, e casca de café, conforme descrito abaixo. O processo se dá em três etapas descritas a seguir:

Primeira etapa: Foram macerados 40 gramas de matéria vegetal em 120 mL de metanol 70% (proporção 1:3) durante três dias a 4°C.

Segunda etapa: os macerados foram filtrados em papel próprio para o procedimento e armazenados em béqueres de 400 mL. As partes retidas foram novamente submetidas ao processo de maceração sob as mesmas condições. Esta etapa é executada três vezes, a primeira com intervalo de 3 dias de maceração e as duas seguintes com intervalos de 2 dias. O filtrado de cada etapa é acondicionado no mesmo béquer que a primeira.

Terceira etapa: Os filtrados foram submetidos ao processo de concentração por rotaevaporação com temperatura de banho a 50°C e vácuo de 300mmHg, ao final as amostras foram acondicionadas em frasco âmbar e o volume final foi ajustado para 50 mL.

Em seguida 200µL de cada extrato foi submetido ao processo de secagem em recipiente de alumínio para avaliação do peso de resíduos sólidos e, portanto, concentração de cada amostras. Cada amostra foi pesada em 10 réplicas.

- **Ensaio DPPH**

O método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•). Para tal, foi inicialmente preparada em balão volumétrico de 10mL solução padrão com a concentração de 0,1mM.

Solução padrão: O agente sequestrador de radicais utilizado como padrão foi o ácido gálico e o solvente metanol 70%. Em tubos eppendorf de 1,5mL foram realizadas diluições seriadas nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 15 µM (equivalentes à 0, 0.170, 0.340, 0.680, 1.02, 1.36, 1.70 e 2.55µg/ml).

Solução de amostras: Da mesma maneira, com base na concentração de cada extrato, foi realizado uma solução para cada amostra em balão volumétrico de 10ml em metanol 70% de concentração final igual a 1mg/ml, à partir das

mesmas, realizadas diluições seriadas nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µg/mL.

Solução DPPH: em balão volumétrico de 25mL vedado à entrada de luz, foi feita solução de DPPH na concentração de 100 µM (ou 40 µg/mL).

Análise: As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 517nm, tendo como controle positivo padrões de ácido gálico (0-15 µM/mL em metanol 70%). Em 100 µL das amostras-testes em suas diferentes concentrações, adicionou-se 200 µL da solução de DPPH (100 µM, 40 µg/mL). As medidas das absorbâncias das misturas reacionais foram feitas após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz. Utilizou-se como controle a mistura de metanol 70% (100 µL) com DPPH (200 µL). Os testes foram realizados em triplicata. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância no tempo de 30 min para cada concentração testada, é determinada a atividades sequestradoras de radicais livres (ou como percentuais de DPPH• remanescentes - % DPPH_{REM}), conforme a equação:

$$ASRL = [(A_C - A_{\text{amostra ou padrão}})/A_C] \times 100$$

A_C = Média da absorbância do DPPH + Metanol 70%

$A_{\text{amostra ou padrão}}$ = Média da absorbância da amostra analisada

ASRL = atividade sequestrante de radicais livres

3.3 Avaliação da atividade prebiótica pela produção de AGCCs

Os desempenhos da casca de café, caroço do açaí, bagaço de laranja e da fração solúvel de bagaço de laranja, testados em 5 fermentações, e as amostras foram feitas em triplicata. As amostras foram fermentadas com os produtos em diferentes concentrações seguindo os protocolos estabelecidos no primeiro capítulo. Após a fermentação foram reservadas alíquotas para a análise das bactérias de interesse por expressão gênica.

3.4 Avaliação da atividade prebiótica pela Expressão gênica - qPCR

A atividade prebiótica do ponto de vista da modulação microbiana foi analisada pela expressão gênica de filos e espécies de bactérias amplamente descritas na literatura pela sua atividade benéfica ao ser humano ou então enquanto patogênica. O DNA bacteriano foi extraído das amostras de interesse utilizando kit de extração e purificação e seguindo o protocolo do fabricante (PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit - Invitrogen). A reação de qPCR foi feita utilizando-se concentrações padronizadas de DNA para todas as amostras em adição dos primers para cada microrganismo de interesse além da sonda de fluorescência. As transcrições e leituras de fluorescência foram feitas em *StepOnePlus™*, Para a análise dos dados foi utilizada a metodologia do ΔC_t -corrigido pela eficiência [10] utilizando o primer universal como referência.

Análise estatística

A comparação entre grupos foi realizada através da análise de variância de uma via seguida de teste de Dunnett nas comparações em relação ao grupo controle e teste de Tukey na comparação entre múltiplos grupos. São apresentadas diferenças estatisticamente significativas considerando um valor de $p < 0.05$

4. Resultados

4.1 Caracterização de Subprodutos e substratos

i. Análise bromatológica e Fibras Alimentares

A análise bromatológica do bagaço de laranja, da casca de café e do caroço de açaí é apresentada na Tabela 1.

Dentre os produtos analisados o caroço de açaí apresenta a maior concentração de fibra alimentar (79%) seguido do bagaço de laranja (72.7%), assim como de carboidratos (81.21% caroço de açaí e 80,82% bagaço de laranja). Por sua vez, a casca de café é o subproduto testado com maior teor de proteína (7,88%).

Tabela 1: Análise bromatológica do bagaço de laranja, casca de café e caroço de açaí.

	Bagaço de laranja	Casca de café	Caroço de açaí
Caloria Total	360 kcal/100g	358 Kcal/100g	360 Kcal/100g
Carboidratos	80,82 %	76,64 %	81,21 %
Fibra Alimentar	72,7 %	30,7 %	79,9 %
Gordura Bruta	2,35 %	2,23 %	2,00 %
Proteína	4 %	7,88 %	4,38 %
Nitrogênio	0,64 %	1,26 %	0,70 %
Proteína do factor	6,25 %	6,25	6,25
Umidade	10,4 %	6,7 %	11,6 %
Cinzas	2,43 %	6,55 %	0,81 %

ii. Determinação de Fibras Alimentares

A distinção entre os diferentes tipos de fibras alimentares encontradas nos subprodutos é descrita na tabela 2.

Tabela 2: Determinação das fibras alimentares dos subprodutos segundo o peso molecular.

	Subprodutos		
	Bagaço de Laranja	Casca de café	Caroço de açaí
Fibras insolúveis (%)	64,9	20,0	71,2
Fibras solúveis alto peso molecular	14,0	5,9	0,3
Fibras solúveis baixo peso molecular	0,7	1,9	0,5
TDF - Fibras Totais (%)	79,6	27,8	72,0

No caroço de açaí é possível observar uma predominância de fibras de alto peso molecular bem como baixa porcentagem de fibras solúveis (0,8% entre alto e baixo peso molecular). Em oposição, o bagaço de laranja foi o composto analisado com maior teor de fibra solúveis de alto peso molecular (14%), enquanto a casca de café apresenta a maior quantidade de fibras solúveis de baixo peso molecular (1,9%).

iii. Polifenóis

Após a análise de polifenóis totais, o caroço de açaí foi o subproduto com a maior concentração, 7.1%. Os demais produtos não apresentam grandes variações entre si. A Tabela 3 mostra os dados de polifenóis totais presente nos produtos.

Tabela 3: Porcentagem de polifenóis no bagaço de laranja, casca de café e caroço de açaí.

Produto	Porcentagem de Polifenóis (%)
Bagaço de Laranja	0,31
Casca de café	0,44
Caroço de Açaí	7,1

iv. Atividade antioxidante

A Tabela 4 indica as concentrações necessárias para reduzir 50% da atividade antioxidante do DPPH (EC₅₀) bem como o grau da atividade antioxidante.

Tabela 4: EC₅₀ e classificação da atividade antioxidante do bagaço de laranja, casca de café e caroço de açaí.

Produto	EC ₅₀	Tipo de Atividade Antioxidante
Caroço de Açaí	59,08 µg/ml	Forte
Casca de Café	57.277,77 µg/mL	Fraca
Bagaço de Laranja	1.087,37 µg/mL	Fraca

Dentre os produtos testados, o extrato do caroço de açaí foi classificado como de atividade antioxidante alta. Os demais produtos apresentaram atividade antioxidante fraca, em especial a casca de café que necessitou alta concentração para reduzir 50% do DPPH (57,27 mg/ml).

4.2 Avaliação da atividade prebiótica pela produção de AGCCs

A atividade prebiótica dos produtos testados foi inferida indiretamente com base nas concentrações de acetato, propionato e butirato gerado ao longo do processo de fermentação *in vitro*. A análise comparativa com o grupo controle evidencia a produção dos AGCCs além do estado basal permitido pela amostra.

i. Bagaço de laranja e Fração solúvel da laranja

A produção de acetato promovida pelo bagaço de laranja (La) e pela fração solúvel do bagaço de laranja se deram de maneira concentração dependente (Figura 1). Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre o grupo Inulina 30 mg/ml, La 100 mg/ml, Fração solúvel 30 mg/ml e Fração solúvel 100 mg/ml em relação ao grupo controle. La 100 mg/ml, Fração solúvel 30 mg/ml e Fração solúvel 100 mg/ml apresentaram valores significativamente superiores em relação a Inulina 30 mg/ml.

O perfil de produção de propionato também segue uma tendência concentração dependente. Assim como observado no acetato, La 100 mg/ml, Fração solúvel 30 mg/ml e Fração solúvel 100 mg/ml apresentaram valores significativamente superiores em relação a inulina 30 mg/ml.

Os maiores valores de butirato foram observados nos grupos Inulina 30 mg/ml e La 100 mg/ml (557,7 e 546,81 $\mu\text{Mol/g}$) e, curiosamente, seguido do grupo Fração solúvel 30 mg/ml sendo maior inclusive que a concentração de 100 mg/ml. La 100 mg/ml, Fração solúvel 30mg/ml se assemelharam significativamente a Inulina 30 mg/ml.

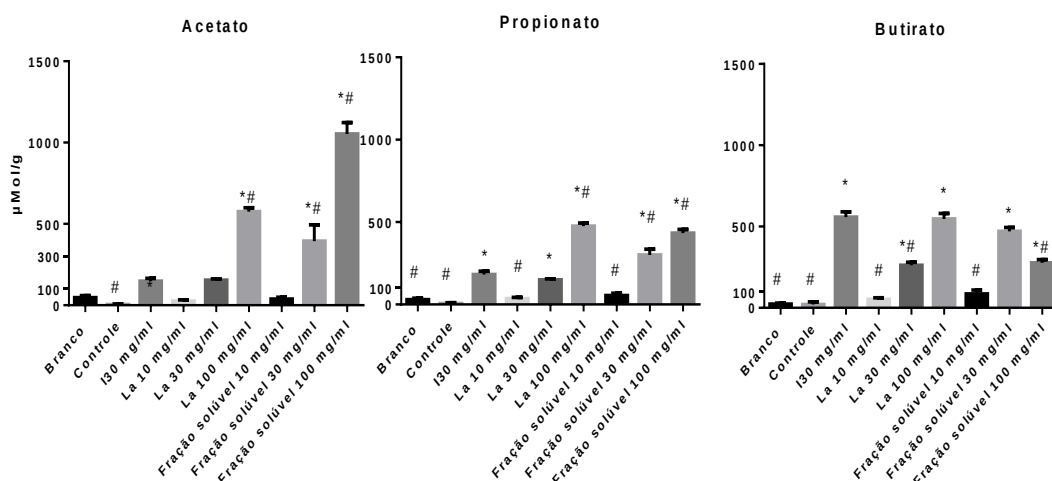


Figura 1: Concentrações de acetato, propiônico e butírico com bagaço de laranja (La), produto derivado do bagaço de laranja (VER0021) e Inulina (I) nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml. * - diferente do grupo controle; # - Diferente do grupo I30mg.

A Figura 2 demonstra comparativamente as produções de acetato, propionato e butirato nas concentrações de 30 e 100 mg/ml obtidas nas mesmas fermentações com o bagaço de laranja apresentadas na Figura 15.

Com o bagaço de laranja notou-se um aumento significativo dos níveis de butirato em relação aos demais ácidos graxos na concentração de 30 mg/ml. Aumentando-se a concentração do bagaço de laranja para 100 mg/ml as proporções entre os três AGCCs também se alteram. Os níveis de acetato se encontram muito próximos ao de butirato e não há diferença significativa entre acetato, propionato e butirato.

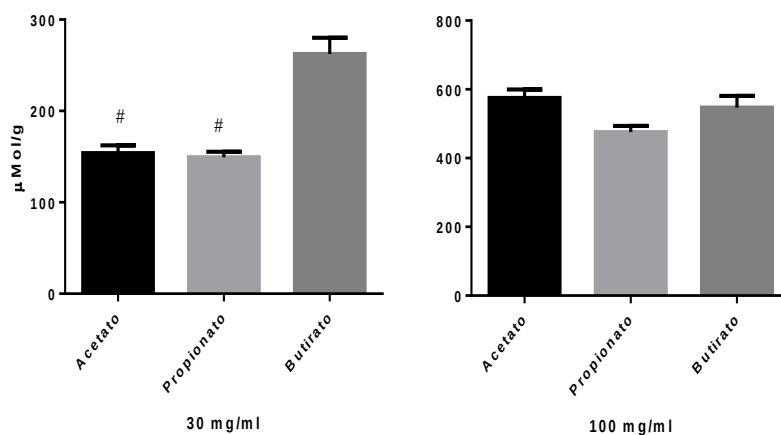


Figura 2: Concentrações de ácido acético, propiônico e butírico com o bagaço de laranja (La) nas concentrações 30 e 100 mg/ml. # - Diferente de butirato.

A Figura 3 demonstra comparativamente as produções de acetato, propionato e butirato nas concentrações de 30 e 100 mg/ml obtidas nas mesmas fermentações com a fração Solúvel apresentadas na Figura 15.

A fração solúvel apresentou um perfil de AGCCs semelhantes entre si para a concentração de 30 mg/ml, visto que mesmo com algumas oscilações entre os valores, não houve diferença estatisticamente significativa. Entretanto, para a concentração de 100 mg/ml o perfil foi significativamente alterado, com um aumento significativo das concentrações de acetato, sendo superior aos demais.

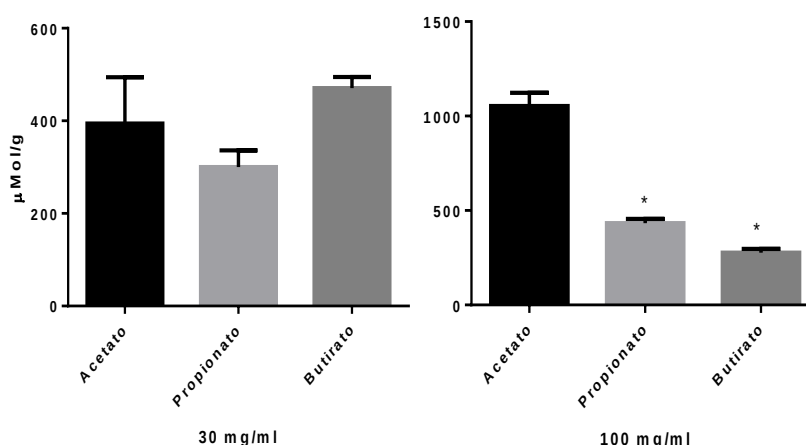


Figura 3: Concentrações de ácido acético, propiônico e butírico com a fração solúvel do bagaço de laranja nas concentrações 30 e 100 mg/ml. * - diferente de acetato.

ii. Casca de café

A Figura 4 demonstra os perfis dos AGCCs analisados nas diferentes concentrações de casca de café (CA), além da inulina, grupo branco e controle. Para o acetato foi observada diferenças significativas em relação ao grupo controle e Inulina 30 mg/ml apenas para o grupo CA 100 mg/ml. Em relação ao propionato, o grupo Inulina 30 mg/ml e CA 100 mg/ml foram significativamente superior ao grupo controle, enquanto todos foram diferentes do grupo Inulina 30 mg/ml, com exceção do grupo CA 30 mg/ml, que não apresentou diferenças significativas. Perfil semelhante é observado quando se compara os perfis dos diferentes grupos na produção de butirato, nota-se que apenas os grupos Inulina 30 mg/ml e CA 100 mg/ml são significativamente diferentes do grupo controle. Por outro lado, quando a comparação é feita em relação ao grupo Inulina 30 mg/ml os demais AGCC são significativamente inferiores, com exceção do grupo CA 100 mg/ml, que se assemelha.

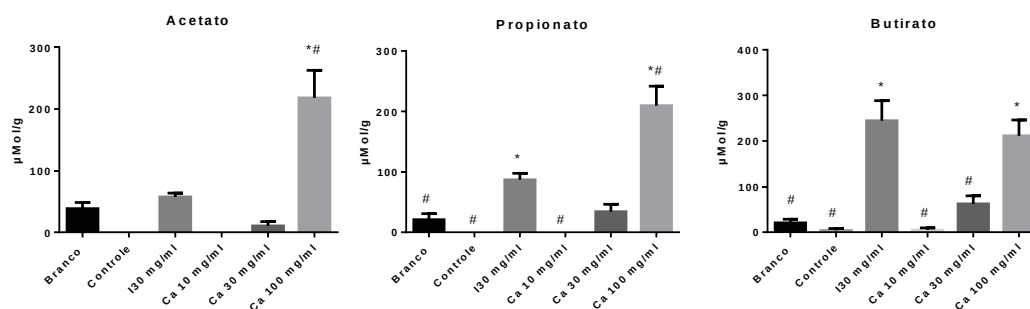


Figura 4: Concentrações de acetato, propiônico e butírico com casca de café (Ca) e Inulina (I) nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml. * - diferente do grupo controle; # - Diferente do grupo I30mg/ml.

A Figura 5 demonstra comparativamente as produções de acetato, propionato e butirato nas concentrações de 30 e 100 mg/ml obtidas nas mesmas fermentações com a casca de café apresentadas na Figura 4.

Pode-se notar que para a concentração de 30 mg/ml o nível de butirato é significativamente superior aos demais metabólitos. Há uma tendência para menores níveis de acetato embora ele não se diferencie significativamente dos demais. Na sua maior concentração, a casca de café exibe um concentrações semelhantes de AGCC.

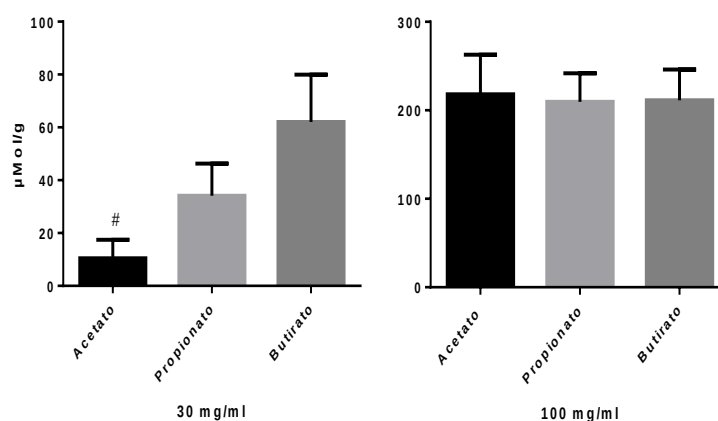


Figura 5: Concentrações de ácido acético, propiônico, butírico com casca de café (Ca) nas concentrações 30 e 100 mg/ml. * - diferente de acetato; # - Diferente de Butirato.

iii. Carço de Açaí

De maneira geral, notou-se que o caroço de açaí não alterou significativamente os níveis de nenhum dos AGCCs em nenhuma das concentrações testadas, em relação ao grupo Inulina 30 mg/mg, bem como em relação ao grupo controle. Especificamente em relação ao acetato o grupo Branco se assemelha ao grupo Inulina 30mg/ml, nos demais casos este último é significativamente superior aos demais. Levando em consideração que as fibras solúveis são o principal substrato bacteriano para a produção de AGCCs, a baixa presença destas no caroço de açaí pode justificar a produção irrelevante independente da concentração utilizada (Figura 6).

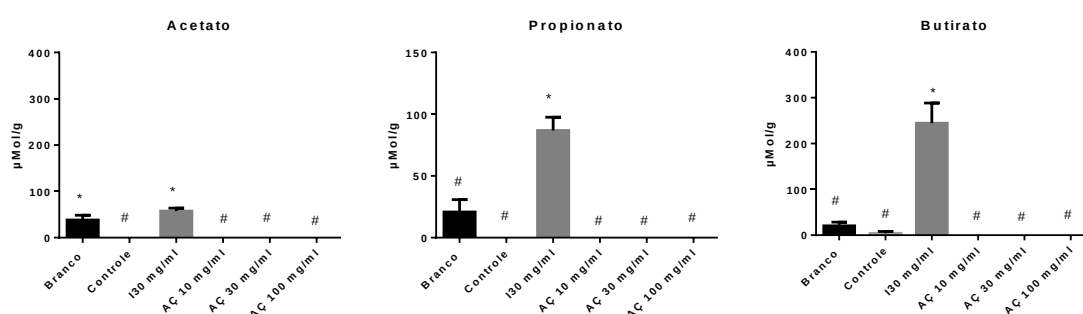


Figura 6: Concentrações de acetato, propiônico e butírico com o caroço de açaí (Aç) e Inulina (I) nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml. * - diferente do grupo controle; # - Diferente do grupo I30mg/ml.

4.3 Avaliação da atividade prebiótica pela modulação da microbiota

As figuras apresentadas a seguir demonstram a quantificação relativa dos microrganismos analisados nos grupos branco, controle, inulina 30 mg/ml, bagaço de laranja, a fração solúvel do bagaço de laranja, a casca de café e o caroço do açaí nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/ml.

i. Bagaço de Laranja e Fração solúvel do bagaço de laranja

A fermentação do bagaço de laranja não promoveu aumento significativo da quantificação relativa em nenhuma das espécies de interesse em nenhuma das três concentrações testadas, mas na concentração de 100 mg/ml promoveu redução significativa da quantificação relativa da *Roseburia faecis* (Figura 7).

A fração solúvel da laranja na concentração de 10 mg/ml aumentou significativamente a quantidade relativa de *Fecalibacterium Prausnitzii* em relação ao grupo controle. Na concentração de 30 mg/ml os aumentos significativos foram observados nas espécies *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium longum*. A maior concentração testada não influenciou positivamente nenhuma das espécies testadas, todavia, reduziu significativamente a quantificação relativa de *Lactobacillus gasseri* em relação ao grupo controle (Figura 7).

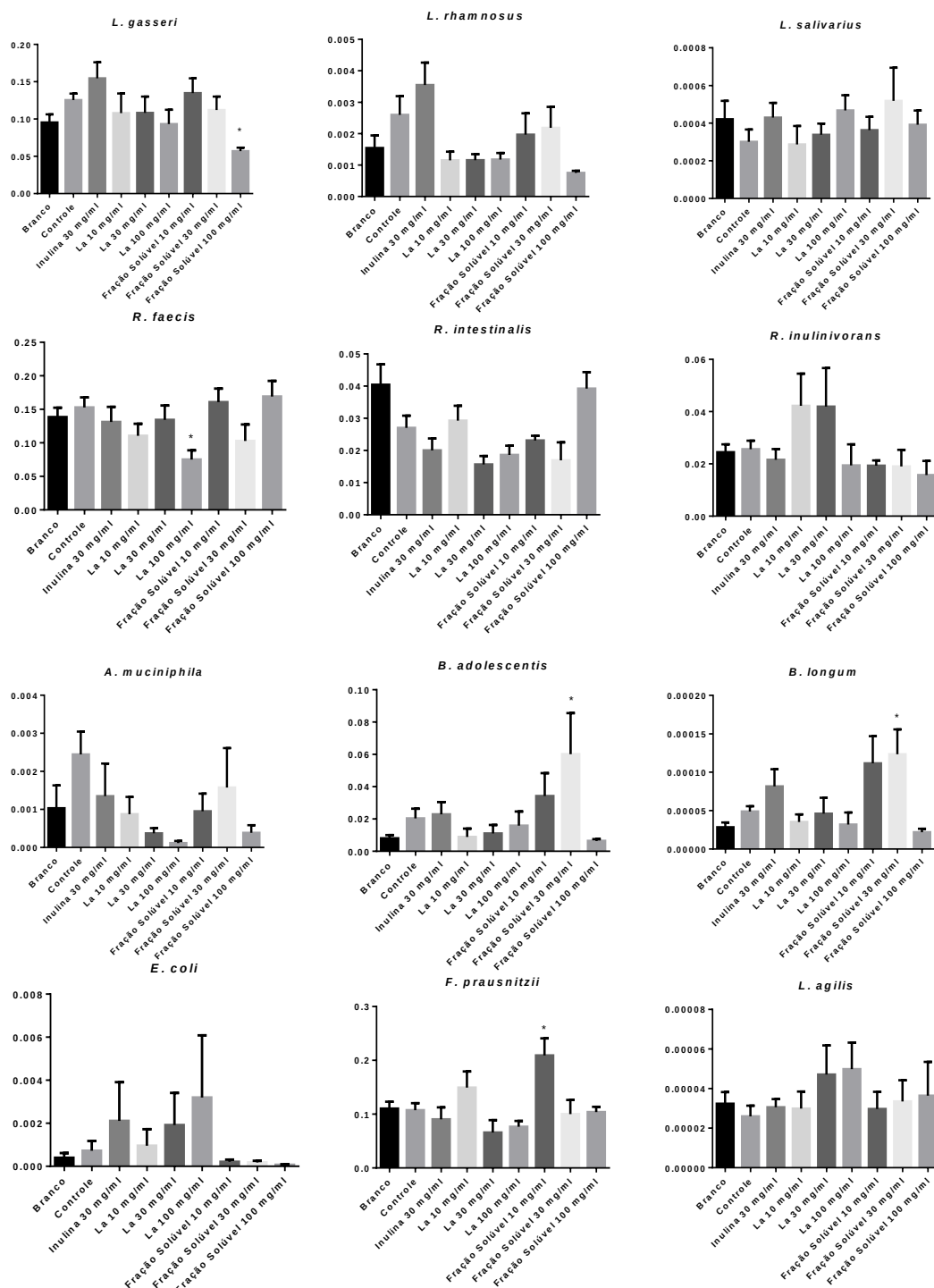


Figura 7: Quantificação relativa das bactérias de interesse após a fermentação com Inulina (I), o bagaço de laranja (La) e a fração solúvel do bagaço de laranja concentrações de 10 mg/ml, 30mg/ml e 100mg/ml. * representa diferenças significativas em relação ao grupo controle.

ii. Casca de café

A fermentação *in vitro* da casca de café contribuiu significativamente para o aumento da quantidade relativa de *Bifidobacterium adolescentis* e *Roseburia intestinalis* na concentração de 100 mg/ml (Figura 8). As demais espécies analisadas não sofreram alterações independentemente da concentração de casca de café utilizada. Entretanto, nesta sequência de fermentações o grupo branco também apresentou quantidade relativa de *Roseburia intestinalis* superior ao grupo controle, bem como quantidades inferiores de *Akkermansia* *Muciniphila* também em relação ao grupo controle (Figura 8).

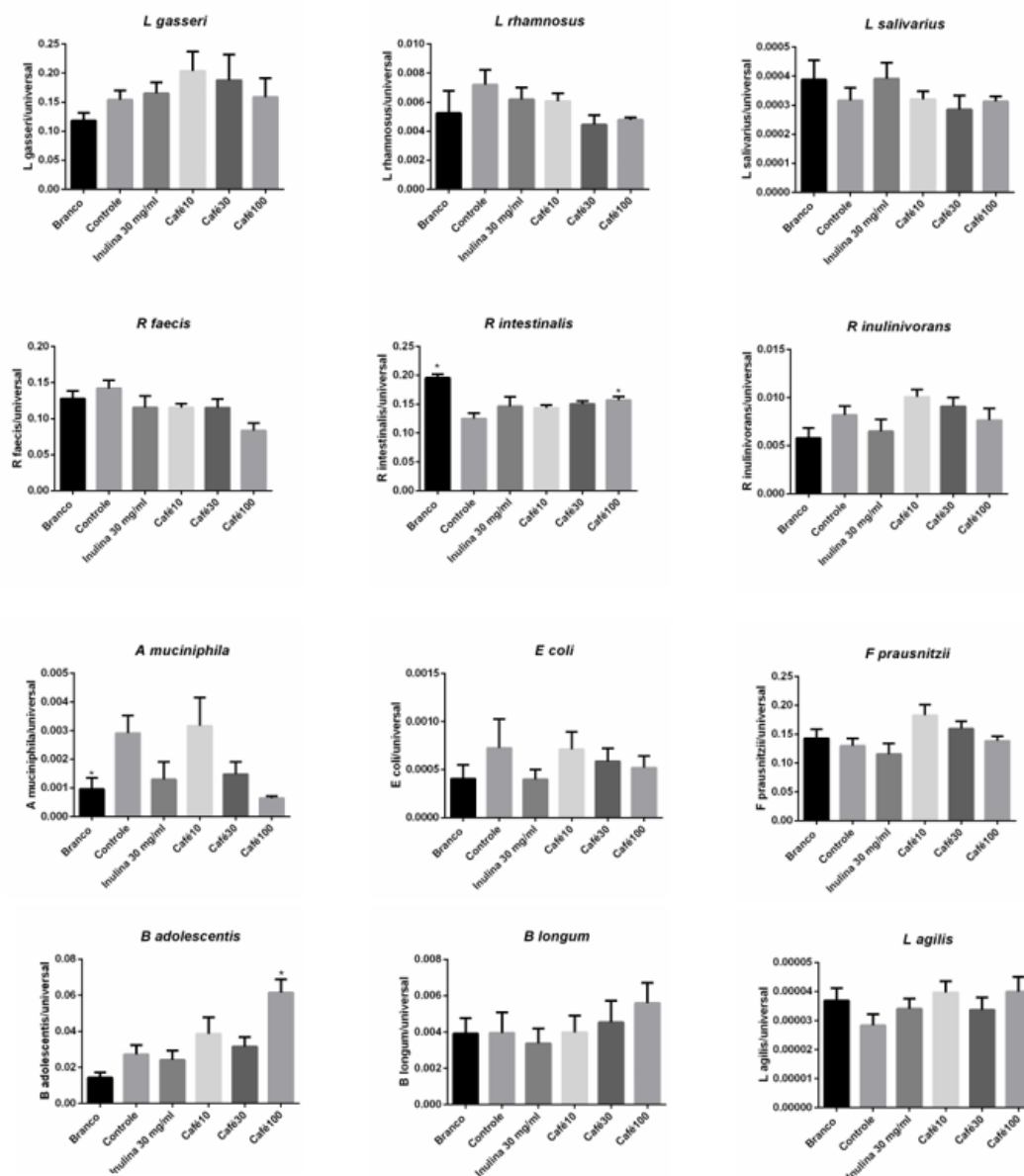


Figura 8: Quantificação relativa das bactérias de interesse após a fermentação com Inulina (I) e a casca de café nas concentrações de 10 mg/ml, 30mg/ml e 100mg/ml. * representa diferenças significativas em relação ao grupo controle.

iii. Carço de Açaí

Embora o carço de açaí não tenha modulado significativamente a produção de AGCCs, o mesmo induziu um aumento significativo da quantidade relativa de *Akkermansia muciniphila* e *Lactobacillus gasseri* na concentração de 30 mg/ml, outras concentrações não modificaram a expressão dos demais microrganismos de interesse. Ainda assim, a expressão de *Roseburia*

intestinalis foi aumentada significativamente no grupo Branco em relação ao grupo controle (Figura 9).

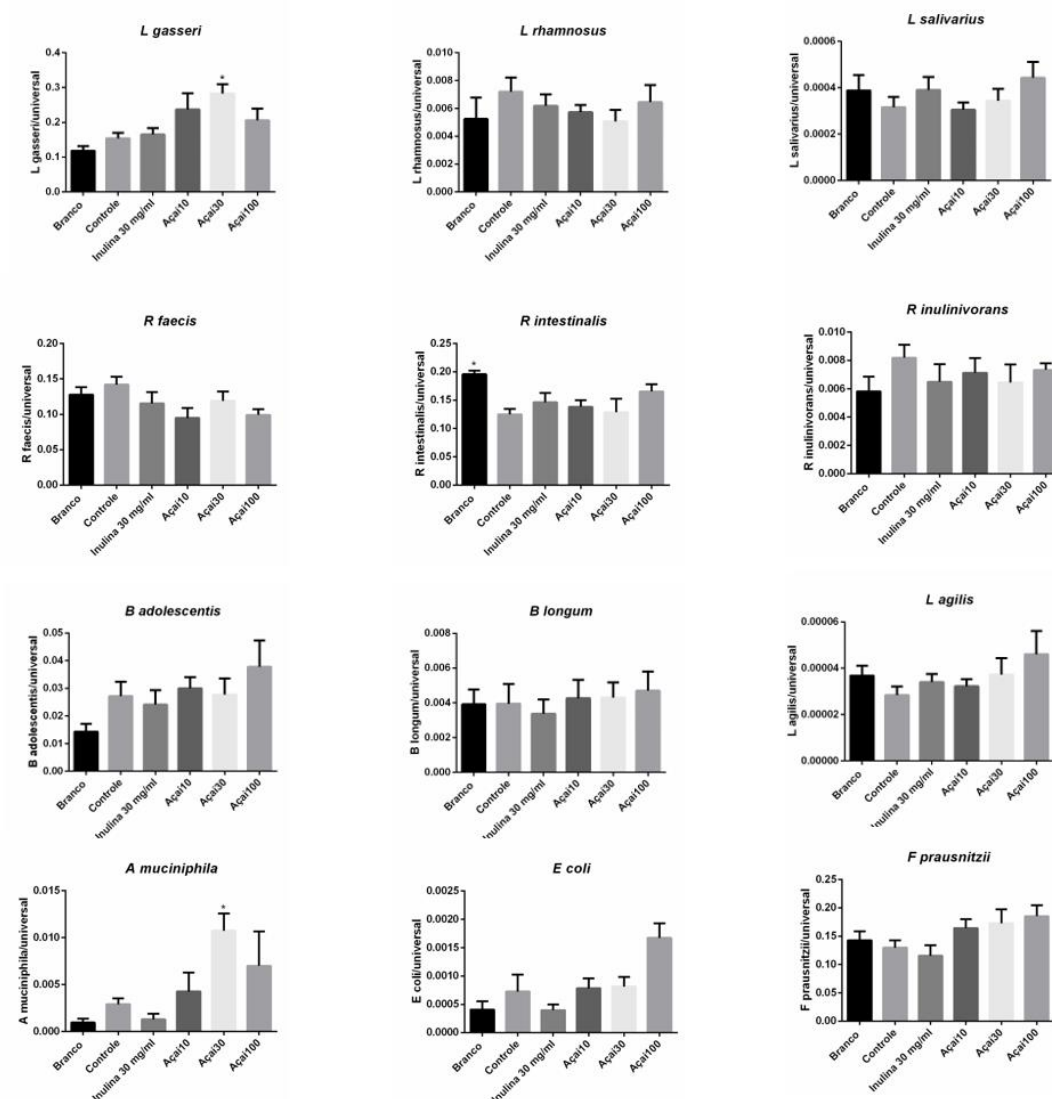


Figura 15: Quantificação relativa das bactérias de interesse após a fermentação com Inulina (I) e o caroço de açaí nas concentrações de 10 mg/ml, 30mg/ml e 100mg/ml. * representa diferenças significativas em relação ao grupo controle.

V. Avaliação Geral dos Subprodutos

A Figura 10 representa os principais ganhos em AGCCs e modulação de microbiota obtidos em cada produto nas diferentes.

Bagaço de Laranja	Fração Solúvel do Bagaço de Laranja	Casca do Café	Caroço de Açaí
			
Fibras solúveis de alto peso molecular	Altamente solúvel	Fibras solúveis de alto e baixo peso molecular	Alto teor de polifenóis ↓ Forte atividade antioxidante
10 mg/ml	↑ <i>F. Praunzitzii</i> ↓ <i>R. faecis</i>		
30 mg/ml	↑ Acetato e Propionato ↑ <i>B. Adolescentis</i> ↑ <i>B. longum</i>		↑ <i>L. Gasseri</i> ↑ <i>A. muciniphila</i>
100 mg/ml	↑ Acetato e Propionato ↓ <i>R. faecis</i>	↑ Acetato e Propionato ↑ <i>R. Intestinalis</i> ↑ <i>B. adolescentis</i>	

Imagens disponíveis em:
<https://www.animalgourmet.com/2019/02/19/cascara-de-cafe/>
https://toptropicals.com/catalog/uid/euterpe_oleracea.htm
<https://www.pngwing.com/pt/free-png-zindo/download>
<https://hmggroup.com/our-stories/orange-fiber/>

Figura 10: Descrição das principais características e efeitos observados na fermentação dos produtos nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/ml.

A caracterização bromatológica do bagaço de laranja determinou a presença de fibras solúveis de alto peso molecular e o mesmo promoveu aumento significativo em relação a inulina de acetato e propionato a 100 mg/ml além da diminuição de *R. faecis*, enquanto a fração solúvel do bagaço de laranja promoveu aumento da proliferação de *F. Praunzitzii* com 10 mg/ml, *B. adolescentis* e *B. longum* com 30 mg/ml e diminuição de *L. gasseri* com 100 mg/ml. A fração solúvel também foi capaz de aumentar significativamente em relação a inulina as produções de acetato e propionato com 30 e 100 mg/ml.

A casca de café aumentou significativamente em relação a inulina as produções de acetato e propionato bem como promoveu aumento de *R.*

intestinalis e *B. adolescentis* com 100 mg/ml, enquanto o caroço de açaí promoveu aumento de *L. gasseri* e *A. muciniphila* a 30 mg/ml além de apresentar forte atividade antioxidante e alta concentração de polifenóis.

5. Discussão

Uma vez estabelecido o protocolo de fermentação *in vitro*, experimentos foram delineados na caracterização da possível atividade prebiótica de cada um dos produtos em comparação com inulina a 30 mg/ml como um marcador positivo do processo de fermentação. Em paralelo, a caracterização bioquímica destes produtos forneceram dados que ajudaram a traçar as vias que explicam os resultados sobre a produção de AGCCs e microbiota obtidos com cada um deles.

O principal efeito em comum entre os produtos testados que modularam a produção de AGCCs foi a alteração nas proporções entre os ácidos graxos conforme o aumento da concentração, de 30 para 100 mg/ml, onde com 30 mg/ml observou-se maior quantidade de butirato, com 100 mg/ml houve predominância de acetato ou valores equivalentes entre os três AGCCs.

No bagaço de laranja, o aumento da concentração modificou a proporção de AGCC produzidos, tendo uma maior produção de butirato em relação ao demais com 30 mg/ml. Entretanto, a mesma concentração com a fração solúvel promoveu aumento da produção de acetato. Esta alteração na atividade, também observada com a inulina pode ser explicada não só por um aumento direto da produção de acetato e em alguns casos propionato, mas também pela conversão de butirato e etanol em acetato, metano e hidrogênio em uma reação onde um mol de butirato pode ser convertido em até dois mols de acetato [11].

O bagaço de laranja que possui em sua maioria fibras insolúveis, após a hidrólise enzimática e remoção da fração sólida, gerou um produto com maior solubilidade, uma vez que se espera que o tratamento enzimático remova parte das fibras insolúveis e aumente a concentração de fibras solúveis de alto e/ou baixo peso molecular. De fato, o tratamento enzimático conferiu à fração solúvel eficiência na menor concentração e promoção de proliferação de *Bifidobacteria adolescentis*, *Bifidobacteria longum* e *Fecaelibacteriun praunznitzii*. Foi

demonstrado que a diminuição do grau de oligomerização (DP), onde tanto maior este grau, mais complexa é a cadeia de carboidrato, de um produto pode beneficiar bactérias do gênero das *Bifidobacterium*, um exemplo é a fermentação de oligofrutose (DP 2-8) que promove maior proliferação destes gêneros em comparação com a inulina de cadeia média e longa (DP $\geq$ 10 e DP $\geq$ 23, respectivamente) [13]. Também foi demonstrado que *Bacterioidetes* codificam enzimas capazes de degradar o eixo e a cadeia ramificada de pectinas associado a um relativo decréscimo de *Firmicutes* [12] sendo ainda a produção de butirato favorecida por um pH inicial mais alto e a proliferação de uma espécie intimamente dependente de uma segunda espécie, assim como a *Eubacterium hallii* é beneficiada pela produção de 1-2-propanediol e lactato proveniente da metabolização de ramnose pela *Blautia faecis* [13].

A casca do café, subproduto com menor teor de fibras insolúveis dentre os avaliados também favoreceu a proliferação de *B. adolescentis* e de *Roseburia intestinalis*. Assim como elucidado anteriormente, a presença das fibras solúveis, especialmente as de alto peso molecular favorecem a produção de butirato, este podendo ser convertido em acetato e propionato quando em grande disponibilidade. Além das fibras, já é relatado que na casca do café são encontrados compostos fenólicos e derivados do ácido cafeico como o ácido clorogênico, o ácido 5-cafeoilquínico e melanoidinas, compostos de alto peso molecular formados no café pela reação de Maillard durante a sua secagem e que são compostos capazes de se ligarem com polifenóis [14, 15]. Perez-Burillo e colaboradores (2020) demonstraram a presença de ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido 3,5-dihidrobencóico agregados em macromoléculas de melanoidinas extraídas do café e que estas podem ser utilizadas pela microbiota intestinal na produção de AGCC e proliferação de *Bifidobacteria* e *Fecaelibacterium* [16].

A grande quantidade de fibras insolúveis e a praticamente ausência de fibras solúveis no caroço do açaí pode ser o elemento essencial que explica a ausência de produção de AGCCs, visto que as fibras alimentares e carboidratos de baixo grau de oligomerização contribuem para sua produção. Entretanto, a proliferação de *Akkermansia muciniphila* e *Lactobacillus gasseri* nitidamente advém de um processo não dependente da presença de fibras. O caroço de açaí possui grande

quantidade de polifenóis da classe das pirocianidinas como a catequina e a epicatequina, que além de ajudar a explicar a forte atividade antioxidante [17], podem ser fermentados pela microbiota intestinal ajudando na proliferação de gêneros específicos, especialmente se dentre estes houver flavonoides glicosilados, que podem ser clivados tornando o glicosídeo disponível para a microbiota e a parcela agliconica biodisponível para o hospedeiro [18]. Nesta hipótese ainda deve ser levado em consideração a complexa rede metabólica entre microrganismos na qual o metabólito de uma espécie pode ser essencial para a proliferação de uma outra. Sendo assim, não se pode estabelecer que a quantidade de polifenóis beneficiou diretamente a *A. muciniphila* e *L. gasseri*, podendo outras espécies não analisadas estarem envolvidas nesta cadeia. Também é demonstrado que a administração de flavonoides pode contribuir para o aumento da abundância de *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* e reduzir as concentrações plasmáticas de proteína C-reativa [19].

6. Conclusão

O presente capítulo apresentou o perfil prebiótico dos produtos testados via produção de metabólitos e proliferação bacteriana, exposto através das concentrações de AGCCs e abundância de microrganismos, demonstrando a viabilidade da aplicação da técnica em compostos complexos.

Foi observado que o aumento da abundância relativa microbiana promovida pelo caroço de *Euterpe oleracea* ocorreu por mecanismos que independem da produção de AGCCs fato que evidencia a complementariedade das técnicas. Ainda, demonstra que caracterizações acessórias como bromatologia e fitoquímica podem ser pontos chave no entendimento das diferentes vias de atuação prebiótica de um produto independentemente da presença de fibras solúveis fermentáveis.

Adicionalmente, a técnica de fermentação *in vitro* foi capaz de evidenciar a atividade prebiótica da casca de café pela modulação positiva de microrganismos bem como do bagaço de laranja, pelo aumento da produção de AGCCs bem como o ganho de eficiência com as frações solúveis da laranja onde se observa aumento da produção de AGCC e modulação de microrganismos com 30 e 100 mg/ml.

7. Referências

1. Hirschfelder, G., M.A. Patrick Pollmer, and B.A. Nadine Schuller, *Western food cultures and traditions*. 2020: p. 19-39.
2. Andrade, R.M.S., et al., *Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion*. Food Res Int, 2020. **137**: p. 109354.
3. Caldeira, C., et al., *Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis*. Resour Conserv Recycl, 2019. **149**: p. 479-488.
4. Henningsson, S., et al., *The value of resource efficiency in the food industry: a waste minimisation project in East Anglia, UK*. Journal of Cleaner Production, 2004. **12**(505–512).
5. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology*. Cell Res, 2011. **21**(2): p. 223-44.
6. Chassaing, B. and A.T. Gewirtz, *Gut Microbiome and Metabolism*. 2018: p. 775-793.
7. Li, Y., et al., *Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract*. Food Chemistry 2006. **96** (254–260).
8. Mano, M.C.R., et al., *Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(1): p. 17-37.
9. McCleary, B.V., N. Sloane, and A. Draga, *Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates in vivo digestion*. Starch - Stärke, 2015. **67**(9-10): p. 860-883.
10. Ramirez-Farias, C., et al., *Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii*. Br J Nutr, 2009. **101**(4): p. 541-50.
11. Junicke, H., M.C. van Loosdrecht, and R. Kleerebezem, *Kinetic and thermodynamic control of butyrate conversion in non-defined methanogenic communities*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. **100**(2): p. 915-25.
12. Wu, D.-T., et al., *Effects of molecular weight and degree of branching on microbial fermentation characteristics of okra pectic-polysaccharide and its selective impact on gut microbial composition*. Food Hydrocolloids, 2022. **132**: p. 107897.
13. Reichardt, N., et al., *Specific substrate-driven changes in human faecal microbiota composition contrast with functional redundancy in short-chain fatty acid production*. ISME J, 2018. **12**(2): p. 610-622.
14. Hao Zhang, H.Z., Antonio Dario Troise, and Vincenzo Fogliano, *Melanoidins from Coffee, Cocoa, and Bread Are Able to Scavenge α -Dicarbonyl Compounds under Simulated Physiological Conditions*. J. Agric. Food Chem. , 2017. **67**(10921): p. 10929.
15. Jiménez-Zamora, A., S. Pastoriza, and J.A. Rufián-Henares, *Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **61**(1): p. 12-18.
16. Perez-Burillo, S., et al., *Bioactivity of food melanoidins is mediated by gut microbiota*. Food Chem, 2020. **316**: p. 126309.
17. Martins, G.R., et al., *Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açai seed (Euterpe oleracea Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins*. Lwt, 2020. **132**: p. 109830.
18. Cardona, F., et al., *Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(8): p. 1415-22.
19. Tzounis, X., et al., *Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(1): p. 62-72.

Capítulo 3

Atividade prebiótica e anti-inflamatória da farinha de banana nanica verde (*Musa sp AAA*)

1. Introdução

A atual tendência populacional na busca por um estilo de vida mais saudável e mais consciente dos processos que envolvem saúde e doenças tem estimulado as pessoas a procurarem por alternativas preventivas, mais acessíveis e com menores efeitos colaterais que os tratamentos farmacológicos [1]. O consumo de frutas, vegetais, grãos integrais e castanhas tem se mostrado como uma ferramenta disponível para a manutenção da saúde e prevenção de doenças crônicas e câncer [2], além de serem componentes da dieta. Neste sentido, estes componentes da dieta são muitas vezes classificados como alimentos funcionais por serem *“alimentos que contém ingredientes com funções para a saúde e oficialmente aprovados para reivindicar seus efeitos fisiológicos no corpo humano”* [3] e, adicionalmente, manter as características de um alimento tradicional em estar presente na dieta cotidiana, não incluindo nesta categoria pílulas, comprimidos e suplementos [4].

A banana, um fruto consumido mundialmente, rico em ferro, sódio, potássio, vitaminas (ácido ascórbico, niacina, tiamina e ácido fólico), triptofano, compostos bioativos como flavonóides, compostos fenólicos e ainda fibras alimentares desponta como um potencial alimento funcional de grande acessibilidade [5, 6]. Os frutos verdes da banana são ricos em amido resistente, uma fibra alimentar não digerida pelo organismo humano que, chegando ao cólon, é fermentada pela microbiota intestinal promovendo modulação da mesma e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) [7, 8], conferindo a este produto atividade prebiótica e portanto importante papel na prevenção de doenças inflamatórias intestinais [9].

Em se tratando de metabólitos bacterianos, é amplamente descrita a influência que os AGCCs têm sobre a modulação de processos inflamatórios, regulação da ecologia microbiana e maturação do sistema imune [10-12]. Entretanto, outros metabólitos bacterianos são igualmente importantes no que

diz respeito às funções orgânicas, tais como os metabólitos derivados do triptofano como a melatonina e alguns compostos indólicos que fazem parte na resposta antioxidante em quase todas as células do organismo[13]. Mais especificamente alguns compostos indólicos são responsáveis pela ativação da atividade fagocitária em macrófagos [14], enquanto que a melatonina é um potente antioxidante e um dos principais hormônios reguladores do ciclo circadiano [15]. É necessário levar em consideração a ampla gama de metabólitos passíveis de serem gerados pela microbiota dependendo dos substratos disponíveis, como carboidratos, proteínas, polifenóis entre outros, bem como a capacidade de cada um destes metabólitos de atuar de maneira benéfica ou deletéria de acordo com a sua natureza [16].

Além da referida influência sobre a microbiota intestinal e seus consequentes benefícios, ainda deve-se considerar que a prévia descrição de atividade anti-inflamatória exercida pela banana, a qual é capaz de apresentar efeito protetor sobre hepatócitos e células renais em condições de estresse oxidativo e inflamatório induzido por metais [17] e ainda atividade anti-inflamatória cutânea em estudos *in vitro* e *in sílico* no tratamento de acne [18], efeitos estes muitas vezes associados aos compostos secundários (polifenóis, carotenoides e flavonoides) encontrados nos diferentes tipos de bananas [19, 20]. Em nosso grupo de pesquisa a farinha da banana nanica verde (*Musa sp AAA*) tem sido amplamente estudada na prevenção e tratamento da Doença Inflamatória Intestinal, apresentando resultados satisfatórios quanto sua atividade anti-inflamatória intestinal [9, 21].

2. Objetivo

Avaliar o potencial prebiótico e anti-inflamatório da farinha de *Musa spp AAA* em modelos de experimentação *in vitro*

3. Metodologia

3.1 Preparo de amostras

Os frutos de banana nanica verde (*Musa spp AAA*) foram obtidos no município de Botucatu, lavados, secos, cortados em pedaços menores e submetidos a secagem a 50°C por 48 horas. As amostras foram pesadas

novamente após o processo de secagem para inferência das perdas em massa e então trituradas em moinho de facas obtendo a farinha da banana nanica verde .

3.2 Caracterização bioquímica e atividade antioxidante

A Caraterização bioquímica da farinha de banana nanica verde se baseou na quantificação das fibras alimentares e de seus subtipos e de polifenóis totais, enquanto a avaliação da atividade antioxidante foi feita através do ensaio DPPH. Todas as análises foram feitas seguindo metodologia apresentada no Capítulo II

3.3 Avaliação da atividade prebiótica pela produção de AGCCs e modulação da microbiota intestinal

A atividade prebiótica da farinha de banana nanica verde foi avaliada por meio da fermentação *in vitro* do produto nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/ml junto com os grupos Branco e controle. Após a fermentação foi avaliada as concentrações de acetato, propionato e butirato seguindo a metodologia descrita no Capítulo I.

De mesmo modo, a modulação da microbiota intestinal foi avaliada pela técnica de qPCR e os dados analisados pelo método do ΔC_t -corrigido pela eficiência assim como apresentado no Capítulo II.

3.4 Outros Metabólitos bacterianos da fermentação *in vitro*

Para a análise de metabólitos bacterianos o fermentado foi acondicionado em vial de vidro com volume total de 20mL e lacrado hermeticamente com tampa de alumínio e septo de borracha para inserção de uma seringa para captura da atmosfera dentro do tubo. As análises foram realizadas injetando as amostras em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa (GC-MS Thermo Scientific, modelo FOCUS ISQ 230ST, com injetor automático triplus DUO – em modo HeadSpace – e biblioteca NIST 2008) com temperatura inicial de injeção de 100°C durante 40 minutos com incremento de 5°C por minuto, utilizando coluna de média polaridade (TG-WAXMS).

3.5 Estudos *in vitro* complementares – Cultivo celular

Os estudos de atividades funcionais complementares foram realizados em linhagens de células do epitélio intestinal tratadas e eventualmente com a estimulação inflamatória por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou uma mistura de diferentes estímulos inflamatórios denominada coquetel inflamatório contendo: LPS 1 μ /ml; TNF- α 20 ng/ml; IL- β 1 ng/ml e IFN- γ 10 ng/ml com base em adaptações no estudo realizado por Discroll e colaboradores (2019) [22]. O coquetel foi utilizado exclusivamente nas células NCM356D por se tratar de colonócitos com características não tumorais e com o objetivo de que um estresse maior provocasse uma resposta inflamatória equivalente a observada em células tumorais apenas com o LPS. O extrato da farinha de banana nanica verde foi feito através da diluição em meio de cultivo DMEM Advanced (Dubelcco's Modified Eagle Medium – Sigma Aldrich) e dimetilsulfóxido (DMSO 0,05%) a uma concentração de 5 mg/mL. A solução final foi mantida em banho a 37 °C por uma hora, agitada e filtrada em filtro de 0,22 μ m em ambiente estéril.

Foram utilizadas as linhagens celulares NCM 356-D, (colonócito humano derivado da mucosa colônica obtido da ressecção marginal de adenocarcinoma de cólon de indivíduo adulto) e células CMT-93 (células tumorais murinas de carcinoma polipóide). As células foram cultivadas em modelo monocamadas usando meio DMEM Advanced suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS), 100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C em 5% de CO₂ com renovação do meio de cultivo a cada dois dias e subcultivadas a cada semana em uma proporção de divisão de 1 a 10 por tripsinização (0,25% tripsina-EDTA). Para a realização dos estudos as células foram plaqueadas a uma densidade de 100 x 10⁴ células/cm².

i. Citotoxicidade – MTT

A viabilidade celular foi examinada usando o CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTT) da Promega (Madison, WI, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O ensaio foi realizado adicionando a solução reagente diretamente aos poços de cultura, incubando por 1-4 h e, em seguida, registrando a absorbância em 490 nm em um leitor de placas de 96 poços

(DYNEX Technologies, Inc., Chantilly, VA, EUA). Os resultados são analisados com base na comparação percentual da absorbância obtida no grupo controle.

ii. RT-qPCR

O RNA total das células foi isolado utilizando o coprecipitante GlycoBlue™ (Invitrogen™) seguindo o protocolo do fabricante. Todas as amostras de RNA foram quantificadas com Espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EUA) e 2 µg de RNA foram transcritos reversamente usando oligo(dT) e primers (Promega, Southampton, Reino Unido). Amplificação, PCR quantitativo em tempo real e detecção foram realizadas em placas de 48 poços em sistema Eco™ Real-Time PCR (Illumina, CA, EUA) com 20 ng de cDNA com primers específicos em sua temperatura alinhamento. Foi utilizado o gene GAPDH como gene normalizador.. A quantificação relativa do mRNA foi calculada usando o métodos $\Delta\Delta Ct$.

iii. Western blot

Amostras de células de cada grupo foram tripsinizadas e homogeneizadas em PBS suplementado com 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS), 0,1% de desoxicolato de sódio, 1% de Triton X-100 e inibidores de protease e fosfatase (aprotinina e leupeptina) (Sigma-Aldrich). Em seguida, 100 µg de proteína foram fervidos a 95°C em tampão de amostra 4× Laemmli (BioRad) e diluídas em gel de eletroforese dodecil sulfato-poliacrilamida (SDSPAGE, 10% de poliacrilamida sob condições redutoras) e eletrotransferido para uma membrana de PVDF (GE Healthcare Life Ciências). As membranas foram bloqueadas com BSA a 3% e sondadas com anti-occludina e anti-ZO-1 (Transduction Laboratories, BD Biosciences) em Diluição 1:100, 4°C durante a noite, seguida de 1 hora de incubação com anticorpo de coelho anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) e finalmente detectado com reagente de quimiluminescência Plus Lightning™ (PerkinElmer Espanha SL). O controle da carga e transferência de proteínas foi conduzido pela detecção dos níveis de β -actina. A quantificação de bandas foi realizada por análise de densidade usando o software ImageJ (Free Software Foundation Inc).

iv. ELISA

Interleucina 6 (IL-6) e int feron alfa (TNF- ) foram quantificados partindo-se do sobrenadantes dos meios de cultivo, este foram coletados e mantidos em refrigeração a – 20  C até a análise. A quantificação foi executada com o kit de ELISA (Peprotech EC LTD.) seguindo instruções do fabricante.

v. Ensaio de ranhura *in vitro* - Wound Healing Assay

O ensaio de ranhura *in vitro* consiste em plaquear as células em poços de 1,89 cm² na concentração de 130x10⁴ células e cultivá-las até que a confluência atinja 80-90% da superfície do poço, então uma ranhura é feita no centro da placa de modo que as bordas sejam uniformes. Registros fotográficos foram feitos imediatamente após a ranhura (0 horas), 6, 12 e 24 horas. Foram feitas triplicatas de cada amostra, separadas em grupos controle, LPS 100  g/ml, extrato da farinha de banana nanica verde 0,5 mg/ml (BV) e extrato da farinha de banana nanica verde 0,5 mg/ml+LPS 100  g/ml. Com base nos registros fotográficos as áreas das ranhuras foram calculadas utilizando o Software Image J.

3.6 Análise Estatística

A comparação entre grupos foi realizada através da análise de variância de uma via seguida de teste de Dunnet nas comparações em relação ao grupo controle e teste de Tukey na comparação entre múltiplos grupos. São apresentadas diferenças estatisticamente significativas considerando um valor de p<0.05

4. Resultados

4.1 Caracterização Bioquímica e Atividade Antioxidante

A Tabela 1 descreve as quantidades de fibras alimentares e suas classificações, bem como os polifenóis presentes na farinha da banana nanica verde. Foi identificado predominância de fibras insolúveis (68,42%), seguido fibras de alto peso molecular (6,37%) e baixos teores de polifenóis (0,24%).

Tabela 1: Caracterização das fibras alimentares e de polifenóis totais presentes na farinha de banana nanica verde.

Farinha da Banana Nanica Verde	
Fibras insolúveis (%)	68,42
Fibras solúveis alto peso molecular	6,37
Fibras solúveis baixo peso molecular	2,3
TDF - Fibras Totais (%)	77,09
Polifenóis (%)	0,24

4.2 Avaliação da atividade Prebiótica pela produção de ácidos graxos de cadeia curta

Após a fermentação com a farinha de banana nanica verde na concentração de 100 mg/ml houve um aumento significativo em relação ao grupo controle na produção de acetato, propionato e butirato (Figura 1). Adicionalmente, a concentração de 100 mg/ml foi diferente significativamente também da Inulina (30 mg/ml). A inulina (30 mg/ml) por sua vez, aumentou apenas o butirato quando comparado ao controle (Figura 25).

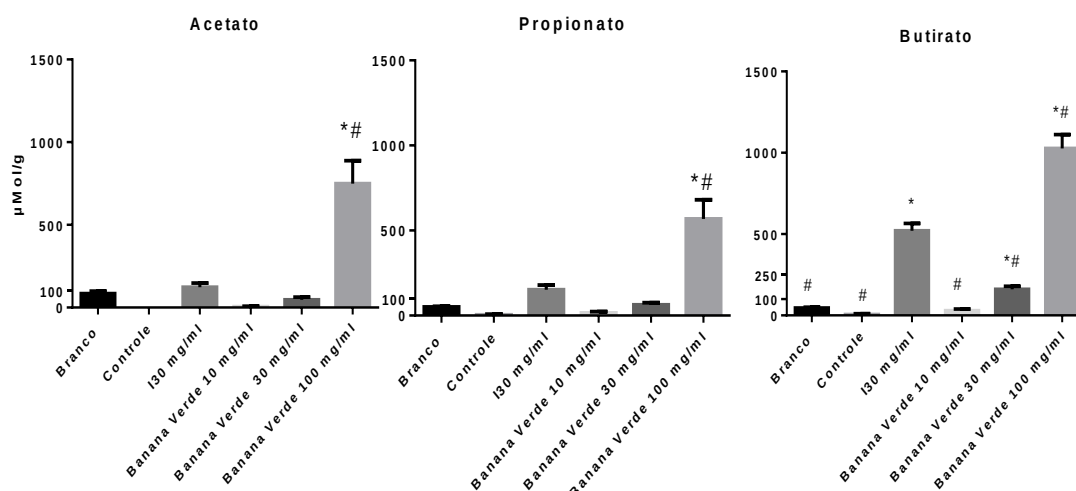


Figura 1: Concentrações de acetato, propiônico e butírico com farinha de banana nanica verde e Inulina (I) nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml. * - diferente do grupo controle; # - Diferente do grupo I30mg/ml; p<0,05 em análise de variância e com

A Figura 2 demonstra comparativamente as produções de acetato, propionato e butirato nas concentrações de 30 e 100 mg/ml obtidas nas mesmas fermentações com a farinha de banana nanica verde apresentadas na Figura 1

É possível notar que na menor delas há um destaque para a produção de butirato e que os demais ácidos não se diferem significativamente entre si. Contudo, para a concentração de 100 mg/ml há um destaque conjunto na produção de acetato e butírico, com maior tendência em butirato. A produção de propionato se situa intermediária, significativamente menor que a de butirato e igual ao acetato.

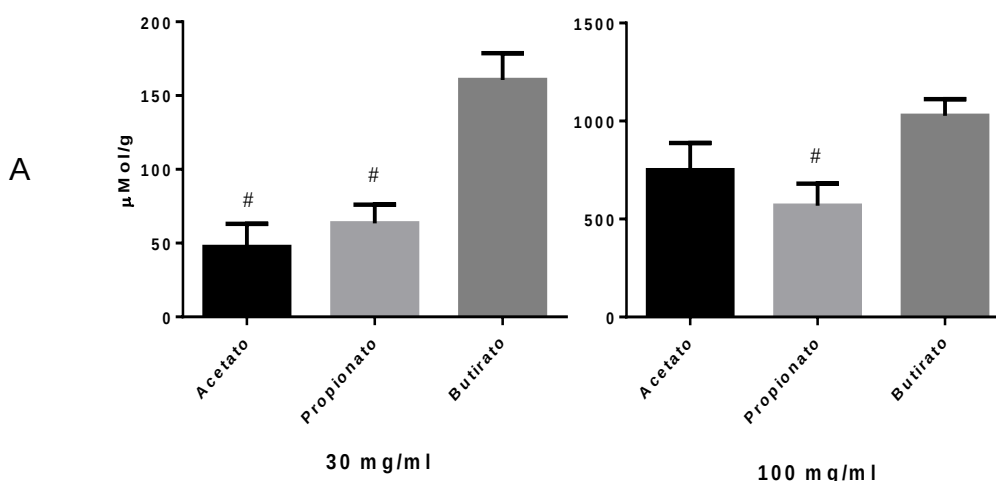


Figura 2: Concentrações de ácido acético, propiônico, butírico e valérico com farinha de banana nanica verde nas concentrações 30 e 100 mg/ml. # representa diferenças significativas vs. Butirato.

concentração de 30 mg/mL de farinha de banana nanica verde favoreceu maior produção de butirato e produções equivalentes de acetato e propionato, enquanto com 100 mg/mL não houve diferenças significativas entre acetato e butirato, além de uma produção significativamente menor de propionato.

4.3 Avaliação da atividade Prebiótica pela modulação da microbiota intestinal

A farinha de banana nanica verde na concentração de 100 mg/mL apresentou modulação positiva e significativa na quantificação relativa de *Bifidobacterium adolescentis* quando comparada ao grupo controle (Figura 3). Para as demais espécies analisadas a farinha de banana nanica verde não foi capaz de promover aumento significativo em relação ao controle. Entretanto, embora não seja estatisticamente significativo, a farinha nas três concentrações testadas reduziu a quantificação relativa de *Escherichia coli* para um valor muito próximo a zero (Figuras 3).

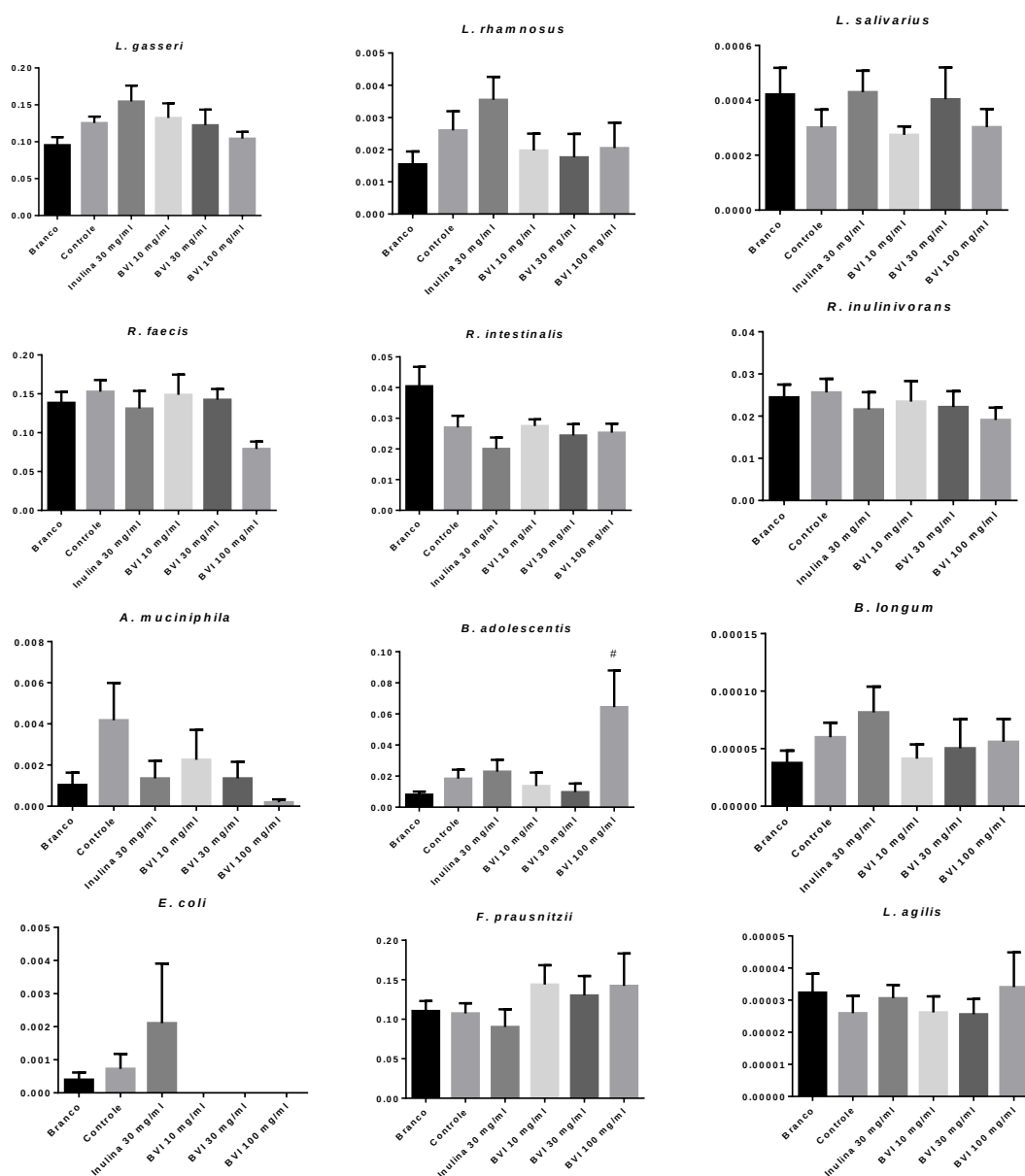


Figura 3: Quantificação relativa das bactérias de avaliadas após a fermentação com Inulina e a farinha integral de banana nanica verde (BVI) nas concentrações de 10 mg/ml, 30mg/ml e 100mg/ml. * representa diferenças significativas em relação ao grupo controle.

4.4 Mapeamento de outros metabólitos bacterianos

As figuras a seguir mostram os cromatogramas e espectrometrias de massa dos compostos voláteis identificados na fermentação da farinha de banana nanica verde na concentração de 30 mg/ml. Para esta análise o fermentado foi transferido para um tubo de vidro hermeticamente lacrado e mantido à 150 °C durante 15 segundos, foi coletado 1 ml da atmosfera do tudo e a mesma foi injetada em cromatógrafo gasoso para análise dos compostos voláteis.

i. Metabólitos derivados do Triptofano

- Indol

Na Figura 4 é possível identificar no tempo de 21 minutos e 10 segundos o pico de um composto identificado como 7-metil-indol. O 7-metil-indol (indol) é um produto bacteriano derivado da fermentação de triptofano. Na fermentação de Inulina 30 mg/ml o mesmo composto não é identificado.

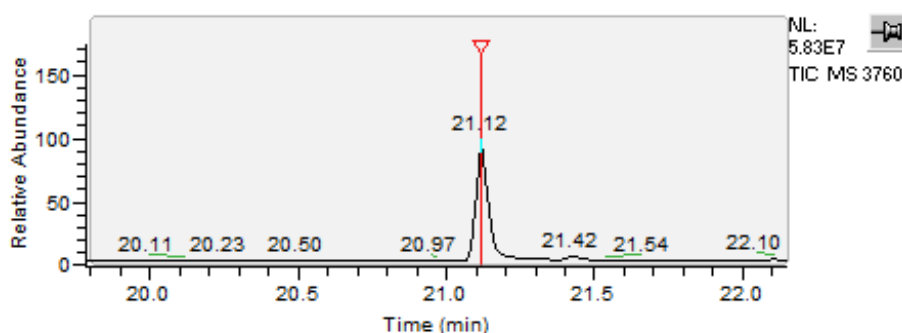


Figura 4: Cromatograma da amostra da atmosfera de fermentado de farinha de banana nanica verde 30 mg/ml. Destaque para o pico em 21,12 minutos.

As Figuras 5 e 6 demonstram a estrutura química e as espectrometrias de massa obtida com o pico identificado no cromatograma da amostra e na base de dados da biblioteca NIST, respectivamente. A grande semelhança entre os espectros de massa, especialmente considerando a maior projeção mas massas

de 131 e 130, seguidos de 103 e 77 confirmam o composto identificado como 7-metil-indol.

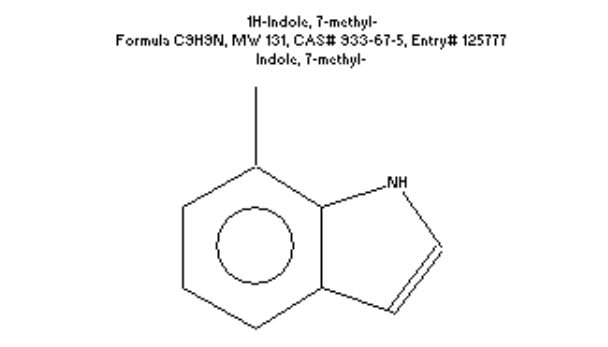


Figura 5: Estrutura química do 7-metil-indol obtido na biblioteca NITS e correlacionado com a composto identificado em 21,12 minutos no fermentado de farinha de banana nanica verde 30 mg/ml.

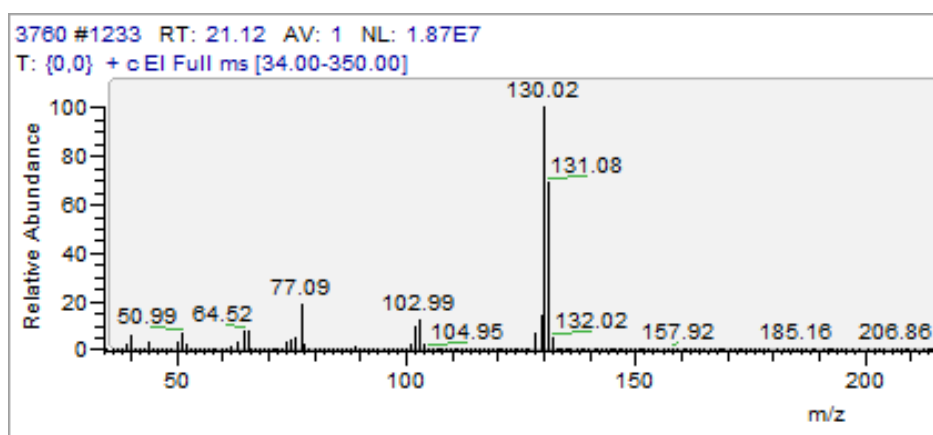


Figura 6: Espectrometria de massa obtida no pico de 21,12 minutos na fermentação da farinha de banana nanica verde 30 mg/ml.

Na Figura 6 é demonstrado o perfil espectrométrico do 7-metil-indol. As maiores abundâncias encontradas nas massas 77, 103, 130 e 131 coincidentes com a biblioteca NIST indicam que o composto identificado em 21,12 minutos se trata do 7-metil-indol.

- **p-Cresol**

O composto 4-metil-fenol (p-cresol), foi identificado no tempo aproximado de 12 minutos e 30 segundos. Assim como o 3-metil-indol, o p-cresol é um produto bacteriano derivado da fermentação do triptofano e o mesmo não foi identificado na fermentação de inulina 30 mg/ml analisada sob as mesmas condições.

As Figuras 7 e 8 indicam a estrutura química e as espectrometrias de massa do pico identificado em 12 minutos e 35 segundos e o composto p-cresol na biblioteca NIST, respectivamente. Observa-se também neste caso uma maior predominância na massa de 107 para ambas as espectrometrias, além das massas 77,03 e 79 (± 1), indicando perfil semelhante entre a o composto identificado e o 4-metil-fenol.

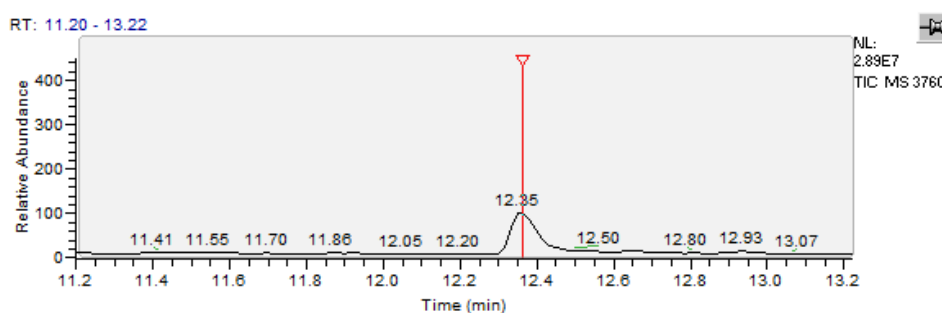


Figura 7: Cromatograma da amostra da atmosfera de fermentado de farinha de banana nanica verde 30 mg/ml. Destaque para o pico em 12,35 minutos.

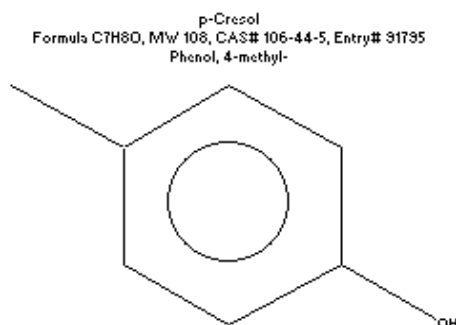


Figura 8: Estrutura química do p-Cresol obtido na biblioteca NITS e correlacionado com a composto identificado em 12,35 minutos.

Na Figura 7 é demonstrado o perfil espectrométrico do 4-metil-fenol. As maiores abundâncias encontradas nas massas 77, 79, 107 e 108 coincidentes com a biblioteca NIST confirmam a presença do p-cresol nas amostras fermentadas de banana nanica verde.

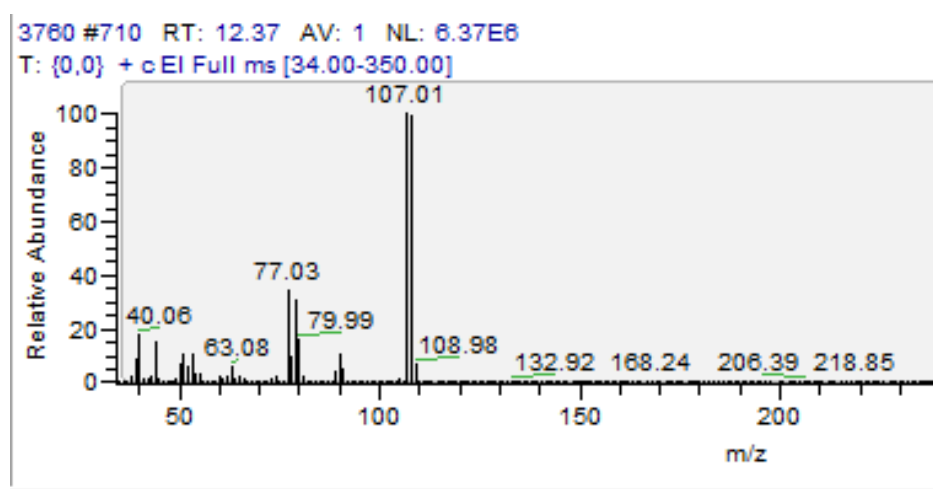


Figura 9: Espectrometria de massa obtida do composto identificado em 12,35 minutos na fermentação da farinha de banana nanica verde 30 mg/ml.

3.2.1. Potencial anti-inflamatório do extrato da farinha de banana nanica verde

Os resultados a seguir mostram uma série de estudos *in vitro* que demonstram a atividade biológica do extrato da farinha de banana nanica verde em cultivo celular com foco especificamente na análise da proliferação celular e mediadores inflamatórios. Estes dados são frutos do trabalho realizado em parceria no Laboratório de Farmacologia, coordenador pelo Prof. Dr. Julio Gálvez da Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada – Espanha

i. Estudo em células CMT-93 - ELISA

A Figura 10 expõe os valores obtidos na quantificação de IL-6 e TNF- α no sobrenadante de células CMT-93 estimuladas com LPS e tratadas com extrato da farinha de banana nanica verde. O extrato da farinha de banana nanica verde foi capaz de reduzir a produção de ambas as citocinas para valores

significativamente abaixo do grupo controle, denotando potencial anti-inflamatório.

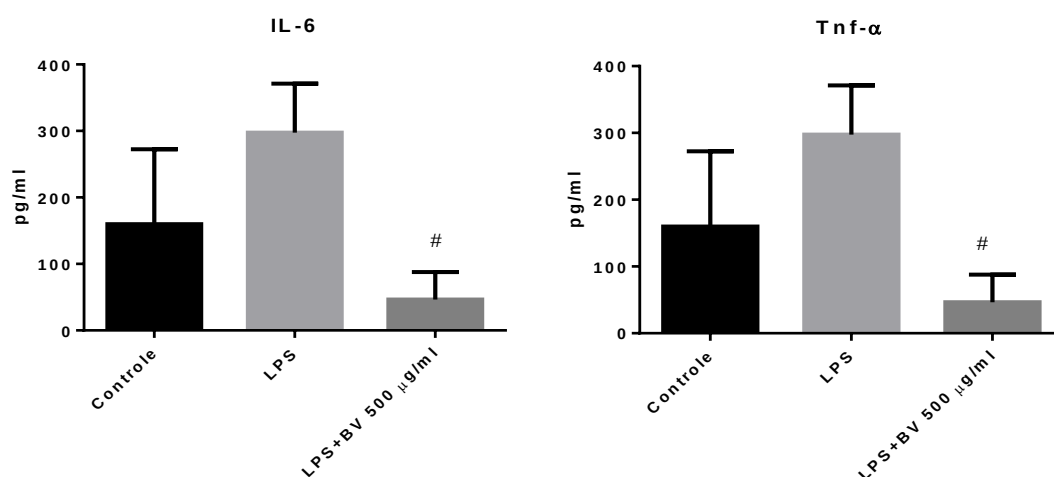


Figura 10: quantificação dos níveis de IL-6 e TNF- α no sobrenadante de células CMT-93 estimuladas com LPS, extrato de farinha de banana nanica verde (BV).

ii. Estudo em células NCM356D – Citotoxicidade, Expressão proteica e gênica e teste de regeneração celular.

Após o teste de citotoxicidade nas diversas concentrações testadas mostra que o extrato da farinha de banana nanica verde não apresentou toxicidade relevante. A porcentagem da citotoxicidade das diferentes concentrações do extrato de banana e do meio de cultivo com adição de DMSO é apresentado na Figura 11.

Considerando que não houve citotoxicidade de importância, o que seria um fator de exclusão para os estudos em cultivo celular, o extrato da farinha de banana nanica verde foi utilizado nos estudos a seguir.

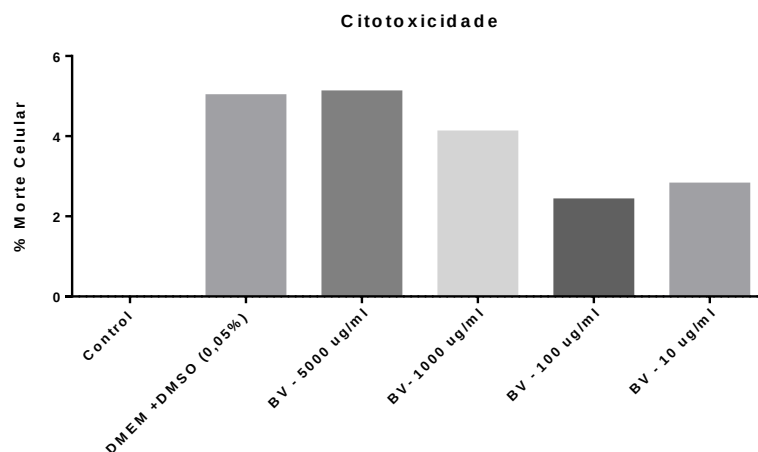


Figura 1116: Porcentagem de morte celular em teste de citotoxicidade (MTT) com extrato de farinha de banana nanica verde em diferentes concentrações além do meio de cultivo adicionado de DMSO 0.05%

- **Integridade de membrana – Western blot**

Pode-se observar que o tratamento com a farinha de banana nanica verde reduziu significativamente a quantidade de ocludina nas membranas das células NCM-356D em comparação ao grupo controle e Zo-1 em relação ao grupo controle e o grupo tratado apenas com o coquete inflamatório como demonstrado na Figura 12.

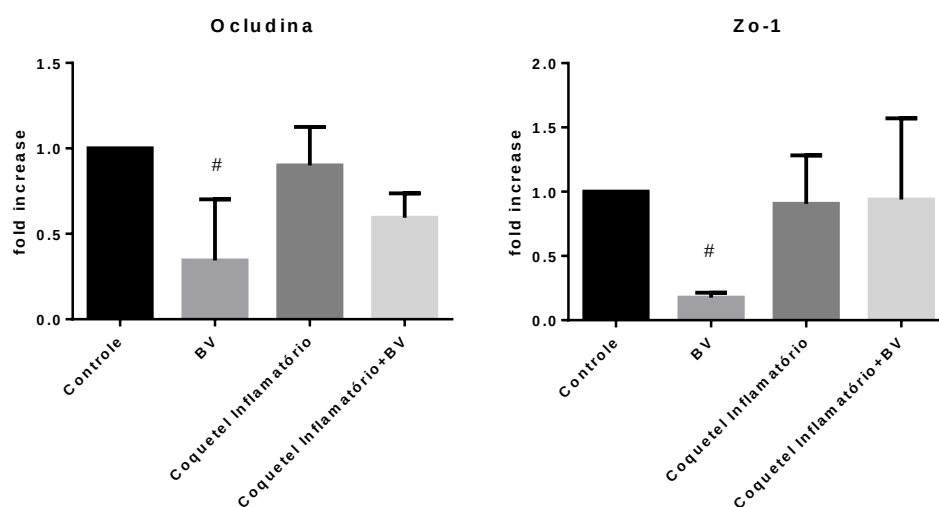


Figura 12: expressões proteicas de ocludina e Zo-1 em membranas de células NCM356D estimuladas com coquetel inflamatório e extrato de farinha de banana nanica verde (BV) 500 µg/ml # representa diferenças. Significativas em relação ao grupo controle. P<0.05

• Inflamação e integridade de membrana – Expressão gênica

A Figura 13 demonstra as amplificações relativas dos genes de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Cox-2, Claudina, Ocludina, iNOS, Wnt-5a, e CAPS-9 nos tratamentos com extrato da farinha de banana nanica verde (BV) a 500 µg/ml e também com o coquetel inflamatório. É possível notar que na presença do coquetel inflamatório, o extrato da farinha de banana nanica verde reduz significativamente a expressão de IL-4, IL-8, IL-10 e Cox-2 em relação ao grupo controle.

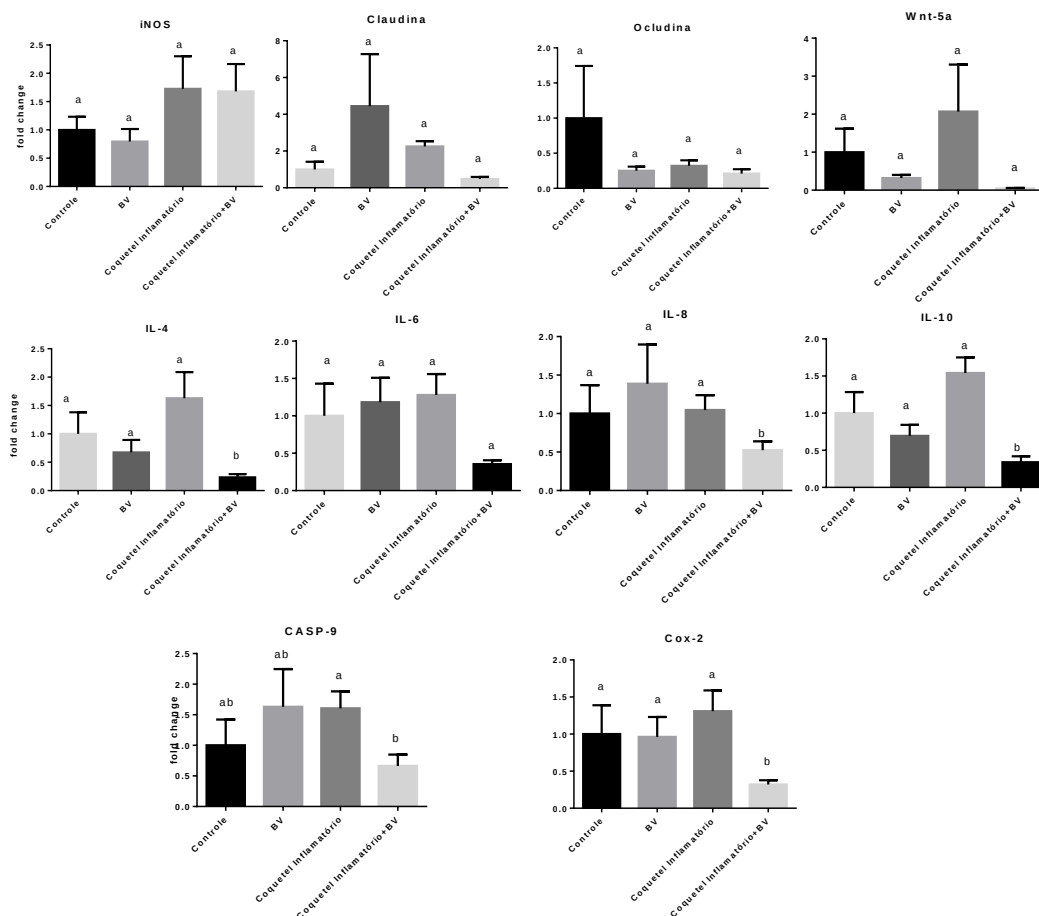


Figura 13: expressões gênicas de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e Cox-2 de células NCM356D estimuladas com coquetel inflamatório, extrato de farinha de banana nanica verde (BV) 500 µg/ml

• Regeneração celular – Wound Healing Assay

A Figura 14 demonstra a porcentagem de fechamento da ranhura realizada na placa de cultivo celular com os diferentes tratamentos (LPS 100 µg/ml e extrato de farinha de banana nanica verde 500 µg/ml) ao longo de 24 horas, representando o processo de regeneração celular, onde a porcentagem de área avaliada em cada grupo ao longo do tempo em relação ao tempo 0. Foi observado que em 12 horas a farinha de banana nanica verde promoveu fechamento da ranhura mais rápido em relação ao grupo controle enquanto o mesmo não é observado nos grupos estimulados com LPS e LPS+Extrato de farinha de banana nanica verde (BV).

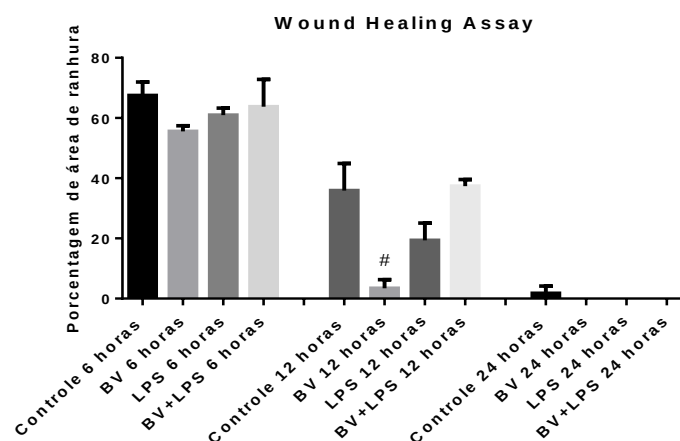


Figura 14: Porcentagem de fechamento de ranhura representando a regeneração celular utilizando o extrato da farinha de banana nanica verde (BV) 500 µg/ml.

A Figura 15 apresenta fotos obtidas das placas de cultivo onde foram feitas as ranhuras seguidas dos tratamentos nas quais é possível observar o fechamento da ranhura ao longo do tempo e quantificar a área da ranhura.

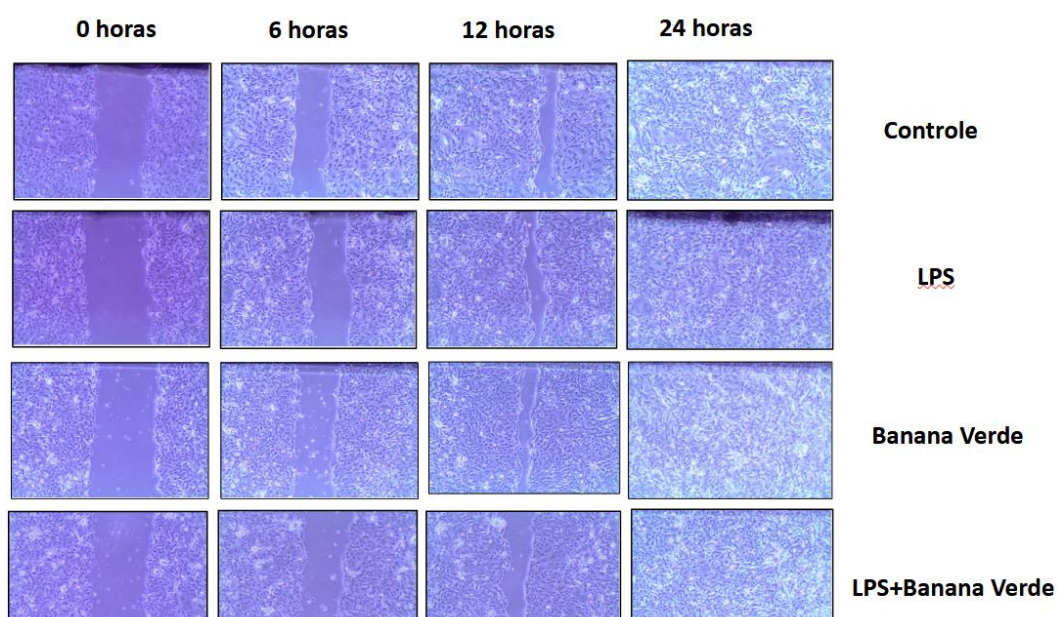


Figura 15: Fotos obtidas por microscopia óptica do teste de ranhura realizado com células NCMD 356-D ao longo dos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas com os diferentes estímulos.

4. Discussão

A utilização da farinha da banana nanica verde na concentração de 100 mg/ml nos ensaios de fermentação *in vitro* induziu um aumento da produção de acetato e butirato em escalas semelhantes, sendo capaz de modular positivamente a produção de butirato na técnica de fermentação *in vitro* de modo significativamente superior a inulina. Klostermann e colaboradores (2023) também demonstraram através de estudo de fermentação *in vitro* que a utilização de amido resistente como substrato modula favoravelmente a produção de butirato e favorece maior abundância de Bifidobacterias [23], em consonância com o observado na modulação positiva de *Bifidobacterium adolescentis* com 100 mg/ml de farinha de banana nanica verde.

Ao propor metodologias que avaliem metabolitos bacterianos além dos AGCCs deve-se considerar a gigantesca quantidade de espécies de microorganismos habitando o trato gastrointestinal de mamíferos, entre eles o ser humano, e que a interação dessas espécies com os produtos ingeridos é complexa, não se limitando apenas ao contexto do que pode ser caracterizado como bom ou ruim [24]. Deve-se ressaltar que o uso do termo modulação deve expressar a complexidade de interações que podem resultar em efeitos benéficos ao hospedeiro, proliferação de espécies de interesse e produção de moléculas com favoráveis repercussões biológicas [25]. Como elucidado por Senghol e colaboradores (2018), a microbiota intestinal pode ser modulada por tipo de dieta, componentes da dieta, grupamento étnico e socioeconômico entre outros fatores [26]. Ao analisar os compostos voláteis da fermentação de banana nanica verde foi observado a presença de duas moléculas que por si só podem ser caracterizadas como antagônicas em suas repercussões biológicas: o p-cresol e o 3-metil-indol, ambas moléculas derivadas da fermentação de aminoácidos. O 3-metil-indol encontrado em nosso organismo é derivado exclusivamente do metabolismo bacteriano, tendo como substrato o triptofano e atuando como agonista concentração-dependente de receptores aril-hidrocarbonetos e influenciando diretamente a proliferação da barreira intestinal, desenvolvimento de linfócitos, diferenciação e migração de células T, adesão de eosinófilos [27] e produção de IL-22, além de estar positivamente correlacionado

à proteção contra infecção por *Candida albicans* [28]. Se atribui a este composto e outros compostos de sua classe (derivados da quinurenina ou ligantes do receptor aril-hidrocarboneto) um papel fundamental na resposta imune intestinal [29]. Em adição, a regulação positiva do 3-metil-indol está associada, assim como a regulação dos AGCCs, à maior abundância de bactérias do gênero *Suterella* e *Bacterioidetes*, as quais têm associação com parâmetros de saúde eutrófico e não inflamatórios [28].

Antagonicamente, há o p-cresol, um produto bacteriano derivado do metabolismo da L-arginina produzido por *Clostridium difficile* [30], que apresenta atividade genotóxica em colonócitos e que pode ser convertido em sulfato de p-cresil, composto secundário notadamente aumentado em pacientes com colite ulcerativa [31, 32]. O consumo de probióticos contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* leva ao decréscimo de p-cresol urinário reforçando o cenário antagônico em relação a outros metabólitos bacterianos como os AGCCs. No desfecho bioquímico da rica complexidade entre microrganismos pode ser incluído fatores como pH, trânsito intestinal e disponibilidade de substrato, em que grandes concentrações de fibras diminuem a fermentação bacteriana de aminoácidos do mesmo modo que um trânsito intestinal lento pode aumentá-la e determinar quais metabólitos serão produzidos [33].

A degradação de produtos da dieta pela microbiota com subsequente geração de metabólitos, assim como a presença de compostos ativos na própria matéria-prima vegetal compõem um panorama que mostra que produtos da dieta podem agir biologicamente tanto do ponto de vista direto, via ação de seus constituintes, como de forma indireta, via metabolização pelas bactérias que compõem a microbiota intestinal do hospedeiro.

A aplicação do extrato de farinha de banana nanica verde diretamente em células CMT-93 reduziu consideravelmente a expressão de IL-6 e TNF- α , denotando atividade anti-inflamatória direta sobre os colonócitos independente da ação de microrganismos. Em geral, citocinas são expressas em maiores quantidade por macrófagos, células T, linfócitos e monócitos e em menor quantidade, por células epiteliais como é o caso das células CTM-93 e NCM356-D [34, 35]. Atualmente, os principais estudos fitoquímicos sobre a banana nanica

verde focam seus resultados na casca que contém compostos fenólicos como catequinas (3952 mg/kg) e rutina (129 mg/kg) além de miricetina (1152 mg/kg) e ácido ferúlico (6 g/kg) [36]. Diferentemente do esperado, as expressões proteicas de ocludina e Zo-1 encontraram-se diminuídas no tratamento com a farinha de banana nanica verde, resultados que necessitam de mais estudos para serem explicados. Assim como observado por Quaglio e colaboradores (2020) em experimento de inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, a expressão gênica da IL-10 apresentou-se diminuída nas células tratadas com extrato da farinha de banana nanica verde, indicando que o aumento de IL-10 é mais interessante quando anterior a lesão inflamatória. No presente experimento a quantificação da expressão gênica de IL-10 foi realizada após o estímulo inflamatório, dessa forma sua redução indica menor dano tecidual [37]. Curiosamente a quantificação da expressão gênica da IL-4, considerada uma citocina com atividade anti-inflamatória, apresentou-se reduzida, entretanto Alms e colaboradores (1996) demonstraram que o organismo humano é capaz de produzir uma isoforma da interleucina 4 com a deleção de 2 éxons [38]. Esta isoforma da IL-4, de comportamento diferenciado no organismo, pode neutralizar a produção da forma convencional de IL-4 e promover ativação M1 em macrófagos, o que induz uma resposta inflamatória [39]. Não é possível afirmar se com os primers utilizados houve a quantificação exclusiva da forma convencional da IL-4 ou em associação com sua isoforma, de modo que novos experimentos são necessários para elucidar este tema.

A farinha de banana nanica verde é um produto amplamente estudado em nosso grupo em modelos de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos [9, 40]. Associando a farinha de banana nanica verde na dieta dos animais foram observados efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes contra a inflamação intestinal provavelmente causados pela presença de carotenoides, luteína, vitamina A, além de fibras fermentáveis [9, 40]. Nos ensaios com as células NCM356D, o extrato da farinha de banana nanica verde promoveu diminuição da expressão gênica de COX-2, corroborando com os efeitos protetores observados nos estudos *in vivo* via diminuição do estresse oxidativo e da atividade inflamatória, que pode ser explicado pela presença de flavonoides

presentes na casca e na polpa da banana nanica verde como a miricetina, neoeritrocina e crisina [41]. Paralelamente, ratos com indução de danos hepáticos e tratados com extrato da casca da banana nanica madura também demonstraram melhora do perfil antioxidante pelo aumento de enzimas antioxidantes (GSH, SOD, CAT e GPX), diminuição da peroxidação lipídica e morte celular (MDA e CASP-3) e de citocinas inflamatórias (NF- κ B, IL-6, TNF- α) [17].

5. Conclusão

A farinha de *Musa* spp AAA verde promoveu aumento da produção de AGCCs e de bactérias benéficas (*Bifidobacterium adolescentis*), bem como seu extrato demonstrou modulação favorável de parâmetros inflamatórios e regenerativos em ensaio de cultivo celular, apresentando potencial como alimento funcional de uso terapêutico em doenças crônicas de caráter inflamatório associadas à disbiose. Os resultados sugerem a realização de mais estudos com indicativos de usos terapêuticos em quadros de inflamatórios de origem multifatorial.

6. Referências

1. Kheto, A., et al., *Utilization of inulin as a functional ingredient in food: Processing, physicochemical characteristics, food applications, and future research directions*. Food Chemistry Advances 2023. **3** (100443).
2. Aune, D., *Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence*. Adv Nutr 2019, 2019. **10**: p. S404–S421.
3. Alongi, M. and M. Anese, *Re-thinking functional food development through a holistic approach*. Journal of Functional Foods, 2021. **81** (104466).
4. Owusu, V. and F. Badu-Gyan, *Consumer willingness to pay a premium for a functional food in Ghana*. Applied Studies in Agribusiness and Commerce, 2017. **11**(1-2): p. 51-60.
5. Zaini, H.M., et al., *Banana peels as a bioactive ingredient and its potential application in the food industry*. Journal of Functional Foods 2022. **92** (105054).
6. Choudhury, N., C. Nickhil, and S.C. Deka, *Comprehensive review on the nutritional and therapeutic value of banana by-products and their applications in food and non-food sectors*. Food Bioscience 2023. **56** (103416).
7. Das, M., et al., *A novel approach for resistant starch production from green banana flour using amylopullulanase*. LWT - Food Science and Technology 2022. **153**(112391).
8. Bello-Perez, L.A. and P.C. Flores-Silva, *Interaction between starch and dietary compounds: New findings and perspectives to produce functional foods*. Food Research International, 2023. **172** (113182).
9. Almeida-Junior, L.D., et al., *Dietary intervention with green dwarf banana flour (Musa sp. AAA) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation*. Journal of Functional Foods, 2017. **38**: p. 497-504.
10. Karamzin, A.M., et al., *Akkermansia muciniphila and host interaction within the intestinal tract*. Anaerobe, 2021. **72**: p. 102472.
11. Maslowski, K.M. and C.R. Mackay, *Diet, gut microbiota and immune responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 5-9.
12. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology*. Cell Res, 2011. **21**(2): p. 223-44.
13. da Silveira Cruz-Machado, S., et al., *Daily corticosterone rhythm modulates pineal function through NfkappaB-related gene transcriptional program*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2091.
14. Dean, J.W. and L. Zhou, *Cell-intrinsic view of the aryl hydrocarbon receptor in tumor immunity*. Trends Immunol, 2022. **43**(3): p. 245-258.
15. Esteban-Zubero, E., et al., *Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review*. Life Sci, 2017. **170**: p. 72-81.
16. Du, L., et al., *Gut microbiota-derived metabolites as key actors in type 2 diabetes mellitus*. Biomed Pharmacother, 2022. **149**: p. 112839.
17. Eddie-Amadi, B.F., et al., *Banana peel ameliorated hepato-renal damage and exerted anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in metal mixture mediated hepatic nephropathy by activation of Nrf2/ Hmox-1 and inhibition of Nfkb pathway*. Food Chem Toxicol, 2022. **170**: p. 113471.
18. Savitri, D., et al., *Anti-inflammatory effects of banana (Musa balbisiana) peel extract on acne vulgaris: In vivo and in silico study*. Journal of Taibah University Medical Sciences 2023. **18**(1586e1598).
19. Pereira, A. and M. Maraschin, *Banana (Musa spp) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health*. Journal of Ethnopharmacology 2015. **160** 2015(149–163).

20. Singh, B., et al., *Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review*. Food Chemistry, 2016. **206** (1-11).
21. Bhatt, S. and M. Gupta, *Dietary fiber from fruit waste as a potential source of metabolites in maintenance of gut milieu during ulcerative colitis: A comprehensive review*. Food Res Int, 2023. **164**: p. 112329.
22. Driscoll, K., et al., *Anti-inflammatory and immune-modulating effects of rice callus suspension culture (RCSC) and bioactive fractions in an in vitro inflammatory bowel disease model*. Phytomedicine, 2019. **57**: p. 364-376.
23. Klostermann, C.E., et al., *Type of intrinsic resistant starch type 3 determines in vitro fermentation by pooled adult faecal inoculum*. Carbohydr Polym, 2023. **319**: p. 121187.
24. de Weerth, C., *Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis*. Neurosci Biobehav Rev, 2017. **83**: p. 458-471.
25. Lal, S., et al., *Molecular basis of phytochemical-gut microbiota interactions*. Drug Discov Today, 2023. **28**(12): p. 103824.
26. Senghor, B., et al., *Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance*. Human Microbiome Journal, 2018. **7-8**: p. 1-9.
27. Pinto, C.J.G., et al., *Targeting the aryl hydrocarbon receptor by gut phenolic metabolites: A strategy towards gut inflammation*. Redox Biol, 2023. **61**: p. 102622.
28. Zelante, T., et al., *Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 372-85.
29. Agus, A., J. Planchais, and H. Sokol, *Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(6): p. 716-724.
30. Selmer, T. and P.I. Andrei, *p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from Clostridium difficile. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol*. Eur J Biochem, 2001. **268**(5): p. 1363-72.
31. Evenepoel, P., et al., *Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism*. Kidney Int Suppl, 2009(114): p. S12-9.
32. B S Ramakrishna, I.C.R.-T., P R Pannall, W EW Roediger, *Impaired sulphation of phenol by the colonic mucosa in quiescent and active ulcerative coliti*. Gut, 1991. **36**(46-49).
33. Portune, K.J., et al., *Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **57**: p. 213-232.
34. Stadnyk, A.W., *Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines*. HOT TOPICS IN GASTROENTEROLOGY, 2002. **16**(4).
35. Challagundla, N., et al., *Saga of monokines in shaping tumour-immune microenvironment: Origin to execution*. Cytokine, 2022. **157**: p. 155948.
36. Rebello, L.P.G., et al., *Flour of banana (Musa AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds*. Food Research International, 2014. **55**: p. 397-403.
37. Quaglio, A.E.V., et al., *Bidens pilosa (Black Jack) Standardized Extract Ameliorates Acute TNBS-induced Intestinal Inflammation in Rats*. Planta Med, 2020. **86**(05): p. 319-330.
38. Alms, W.J., et al., *Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing*. Mol Immunol, 1996 **33**(4-5): p. 361-370.
39. Luzina, I.G., et al., *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives"*. J Leukoc Biol. , 2012 **92**(4): p. 753–764. .
40. Scarminio, V., et al., *Dietary intervention with green dwarf banana flour (Musa sp AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis*. Nutr Res, 2012. **32**(3): p. 202-9.
41. Maseko, K.H., et al., *Musa species variation, production, and the application of its processed flour: A review*. Scientia Horticulturae, 2024. **325** (112688).

1. Considerações Finais

O presente estudo demonstrou a viabilidade da aplicação da técnica de fermentação *in vitro* na prospecção de compostos com atividade prebiótica. Apesar das limitações técnicas do estudo, a metodologia padronizada se configura como uma técnica relativamente simples e eficaz na triagem de produtos que apresentam grandes potencialidades de aplicações. Além disso, a padronização da fermentação *in vitro* demonstrou pequena variabilidade nas fermentações em diferentes dias com amostras de um mesmo indivíduo, além de indícios do mesmo perfil com amostras de quatro doadores diferentes, indicando ser uma metodologia robusta e reprodutível para a análise de potencial prebiótico.

Em se tratando dos produtos estudados é válido ressaltar que a combinação das análises de AGCCs com a modulação da microbiota se torna útil no que tange a demonstrar diferentes aplicabilidades, a citar, a modulação da composição e diversidade da microbiota pelo açaí mesmo na ausência de aumento da produção de AGCCs. Além disso, foi demonstrado que além dos produtos estudados, com exceção do açaí, foram eficientes no aumento da produção de AGCCs e na modulação de diferentes espécies de acordo com cada produto. Verificou-se ainda que o processamento do subproduto pode aumentar a eficiência do mesmo ou até alterar as características da modulação da microbiota como observado nas comparações entre o bagaço de laranja e sua fração solúvel. Por fim, deve-se considerar outras respostas biológicas que estes produtos possam propor para além de serem prebióticas, como demonstrado nos estudos de cultivo celular, sendo uma ferramenta útil na prospecção e valorização de matérias-primas vegetais ricas em compostos bioativos.

2. Pós-fácio

Este foi um trabalho que se propôs ao desenvolvimento tecnológico de ferramentas no estudo de alimentos funcionais e prebióticos em matérias-primas vegetais, de modo que o mapeamento das potencialidades de produtos com técnicas *in vitro* é útil como metodologia de triagem de compostos para a realização de experimentos subsequentes *in vivo*, permitindo a redução de uso

de animais na experimentação biológica. Adicionalmente, o uso da metodologia padronizada também se mostrou útil para a identificação de compostos e/ou metabólitos com finalidades terapêuticas, com potencial aplicação em DCNTs.. A diversidade dos produtos vegetais testados também demonstrou a rica e potencial capacidade dos subprodutos agrícolas representarem matérias-primas rentáveis e como rica fonte de compostos bioativos e componentes passíveis de fermentação microbiana. Adicionalmente, é importante ressaltar a importância do uso destes subprodutos., muitas vezes inadequadamente descartados sendo potencial poluente ambiental, como uma forma de redução de impactos ambientais.

Dado o exposto, há de se considerar que este trabalho, embora baseado no desenvolvimento tecnológico de estudos *in vitro*, permeia áreas do conhecimento para além da bancada do laboratório, a citar:

- 1- Uso de animais na pesquisa
- 2- Desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas
- 3- Aplicação de matérias-primas vegetais
- 4- Uso racional de tecnologias

Este posfácio visa destacar, mesmo que superficialmente alguns destes pontos.

Em 1978 foi publicado o primeiro estímulo a redução do uso de animais em estudos científicos [1], propondo o princípio dos 3 R's: Reposição, Refinamento e Redução. Desde então o avanço das tecnologias *in vitro* e *in silico* permitiu que inovações nesta agenda fossem de fato propostas e algumas alcançadas. É neste sentido que este estudo também contribuiu, fornecendo uma plataforma de testes simples, reprodutível e de capacidade de teste em uma ampla gama de produtos que visem a aplicação humana e veterinária. O seu desenvolvimento tem potencial para tornar-se uma ferramenta auxiliar na seleção de produtos para estudos que envolvam microbiota intestinal e condições do trato gastrointestinal, assim como de outras doenças crônicas onde a microbiota desempenha papel fundamental em sua etiologia, tais como obesidade, diabetes, doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e outras. Deste modo, refinando a escolha de produtos e

poupando custos na manutenção e utilização de uma grande quantidade de vidas animais.

Em outro aspecto, as doenças crônicas não-transmissíveis compreendem uma grande gama de doenças, suas incidências encontram-se em ascensão em diversos países do mundo e as causas são multifatoriais. Como exposto anteriormente, as DCNTs exigem terapêuticas medicamentosas de longo prazo, muitas delas com efeitos colaterais que diminuem consideravelmente a qualidade de vida. Além disso há de se considerar o custo para os sistemas públicos de saúde. Cerca de 25% dos portadores de DCNTs utilizam o sistema de saúde a cada duas semanas [2]. As atuais propostas terapêuticas baseadas em mudanças do estilo de vida e farmacológicas, por vezes, denotam baixa aderência com o passar do tempo e, especialmente as farmacológicas, as quais podem acarretar ao surgimento de efeitos colaterais, além de muitos pacientes serem refratários a determinados tipos de drogas. Nesse sentido, o desenvolvimento de opções terapêuticas se torna importante [3] e a utilização de alimentos funcionais como estratégia terapêutica de longo prazo, embora seja um tema ainda pouco discutido em nosso país, pode fornecer opções seguras do ponto de vista farmacológico e de fácil adesão, especialmente se tais alimentos se apresentarem em formas facilitadas de consumo e dosagens adequadas para cada situação. Ainda existe a vantagem da grande variedade de produtos disponíveis considerando a gama de alimentos consumidos pela espécie humana.

Ainda com relação ao desenvolvimento de produtos terapêuticos com base em matérias-primas vegetais, outro ponto importante a se considerar é o fato do Brasil ser um expoente na produção agrícola mundial, além da agricultura familiar e diversos produtos frutos do extrativismo. É bem estabelecida essa gama de produtos como rica fonte de bioativos com diversos benefícios na saúde humana, entretanto a aplicação de agrotóxicos, que acarreta danos ambientais e à saúde humana, ainda se interpõe como uma barreira nesta área [4]. O presente estudo partiu também da perspectiva de valorização de partes sub/não utilizadas desses produtos, como uma forma de aumentar a rentabilidade e estimular não só a utilização racional destes produtos, mas também como uma forma estender os benefícios do desenvolvimento tecnológico nas diversas

camadas, sejam elas as produtoras agrícolas, o setor de pesquisa e desenvolvimento ou os beneficiários finais.

Por fim, é importante destacar a importância do uso racional e responsável de tecnologias, especialmente envolvendo saúde humana. Em 2016 uma publicação no Journal of American Medicine Association demonstrou progressivos investimentos do setor industrial açucareiro norte-americano entre as décadas de 50 e 70 em estudos correlacionado a doença arterial coronariana e consumo de gorduras [5]. Tais investimentos reduziram o foco em estudos envolvendo consumo de açúcares refinados por décadas tendo como consequência a modulação de políticas públicas e rumos científicos. O cenário científico atual classifica o consumo excessivo de gorduras e açúcares refinados como fatores de risco para o desenvolvimento de DCNTs. Entretanto, consoante ao aumento progressivo do consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em gorduras, açúcares refinados e demais ingredientes como corantes e conservantes, há também uma forte influência da propaganda destes produtos com baixíssima regulamentação, especialmente sobre o público infantil, com médias que chegam a 6,17 propagandas/canal a cada hora, sendo 90,8% delas de alimentos ultraprocessados [6]. O presente exposto visa chamar a atenção para o uso racional dos produtos tecnológicos e o bem-estar humano como premissa em suas aplicações para, assim, obter o melhor de seus resultados. Embora, tais comentários não são baseados na análise direta dos nossos resultados, os mesmos permitem tais considerações, que considere pertinentes para sua inclusão.

3. Referências

1. Hendriksen, J.d.B.a.C., *Reduction Strategies in Animal Research: A Review of Scientific Approaches at the Intra-experimental, Supra-experimental and Extra-experimental Levels*. ATLA 2005. **33**, (369–377).
2. Malta, D.C., et al., *Noncommunicable diseases and the use of health services: analysis of the National Health Survey in Brazil*. Rev Saude Publica, 2017. **51**(suppl 1): p. 4s.
3. Ansbro, E., et al., *Chronic NCD care in crises: A qualitative study of global experts' perspectives on models of care for hypertension and diabetes in humanitarian settings*. J Migr Health, 2022. **5**: p. 100094.
4. Sayago-Ayerdi, S., et al., *Tropical Fruits and Their Co-Products as Bioactive Compounds and Their Health Effects: A Review*. Foods, 2021. **10**(1952).
5. Kearns, C.E., L.A. Schmidt, and S.A. Glantz, *Sugar Industry and Coronary Heart Disease Research: A Historical Analysis of Internal Industry Documents*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(11): p. 1680-1685.
6. Soares Guimaraes, J., et al., *Ultra-processed food and beverage advertising on Brazilian television by International Network for Food and Obesity/Non-Communicable Diseases Research, Monitoring and Action Support benchmark*. Public Health Nutr, 2020. **23**(15): p. 2657-2662.