

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências
Campus Botucatu, SP
Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE FIBRA PREBIÓTICA DERIVADA DE SUBPRODUTO DA CADEIA
AGRÍCOLA BRASILEIRA:
POLPA DE *COFFEA ARABICA* (CAFÉ)**

**JULIA DA COSTA AGUIAR PETRY
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI**

Botucatu, SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências
Campus Botucatu, SP
Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia

**DESENVOLVIMENTO DE FIBRA PREBIÓTICA DERIVADA DE SUBPRODUTO DA CADEIA
AGRÍCOLA BRASILEIRA:
POLPA DE *COFFEA ARABICA* (CAFÉ)**

**JULIA DA COSTA AGUIAR PETRY
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu e Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, sob orientação do Prof. Dr. Luiz C. Di Stasi.

Botucatu, SP

2024

Petry, Julia da Costa Aguiar

Desenvolvimento de fibra prebiótica derivada de subproduto da cadeia agrícola brasileira: Polpa de *Coffea arabica* (café) / Julia da Costa Aguiar Petry – Botucatu, 2024.

73 p.

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu e Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Versão original

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi.

JULIA DA COSTA AGUIAR PETRY

Desenvolvimento de fibra prebiótica derivada de subproduto da cadeia agrícola
brasileira: Polpa de *Coffea arabica* (café)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu e Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Data de aprovação: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz C. Di Stasi – **IBB / UNESP**

Profa. Dra. Ligia Yukie Sasaki – **FMB / UNESP**

Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira – **IBB / UNESP**

Dra. Erika Ferreira Costa – **IBB / UNESP**

Dra. Ellen Cristina Souza de Oliveira – **FMB / UNESP**

AUXÍLIO FINANCEIRO



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação

MAI/DAI

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho à minha filha, que me concedeu a força mais poderosa, a coragem mais verdadeira e o amor mais avassalador que já senti. Nina, obrigada por ter vindo e ter aberto meus caminhos. Grande parte dos meus pés no chão vem de você, enquanto te seguro.

AGRADECIMENTOS

Nada se constrói sozinho. Toda construção envolve paciência, dedicação e consistência. E por isso, devo os meus mais sinceros agradecimentos a quem esteve comigo, de diferentes formas durante esse percurso trilhado.

Primeiramente, agradeço à minha família, que cresceu ao longo dessa construção. Ao meu marido, Fernando, e à minha filha, Nina. Aos meus pais, Leo e Claudia, e à minha irmã, Carolina, que constituem minha base, meu retorno para casa e minha estrutura mais sólida e confiante.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório FitoFarmaTec, que juntos fazemos uma rede que se ajuda e cresce junto. Gostaria de nomear um a um, pois há dedo de todos eles neste trabalho: Ana, Fábio, Luiz, Mariana, Érika, Laís, Nathália, Vinícius, Bruna, Juliana, Tainan, Mariah, Yuri, Nayana, Gabriel e Daniela. Agradeço imensamente pela paciência, parceria e ajuda em todas as etapas deste projeto!

À empresa Verum Ingredients do Brasil. Agradeço por todo conhecimento compartilhado e colaboração com o FitoFarmaTec para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também à estrutura de seu laboratório, que permitiu realizarmos análises específicas.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e em especial ao Programa MAI/DAI (Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação), pela parceria com a UNESP e pela possibilidade que me ofereceu de participar em um programa tão interessante.

Ao meu professor e orientador, Luiz Claudio Di Stasi, agradeço por ter me dado a oportunidade de trilhar este caminho, permitir meu crescimento acadêmico e por ter me guiado ao longo desses dois anos como mestranda. Mas sobretudo, agradeço ao meu professor por ter me amparado e me tranquilizado como podia, no momento mais vulnerável de minha vida. Agradeço por ter me dado flexibilidade e segurança durante a intensidade que é gerar uma vida. Obrigada de coração, professor.

A todos os professores e amigos que cruzaram com o meu caminho durante os meus anos de UNESP. Obrigada a esta Universidade incrível por todos os momentos vividos, fossem eles felizes ou difíceis.

E por fim, agradeço também às membras da banca avaliadora deste trabalho, Profa. Dra. Ligia Yukie Sasaki, Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Dra. Erika Ferreira Costa e Dra. Ellen Cristina Souza de Oliveira. Obrigada pelo aceite do convite, e pela colaboração com melhorias para o meu projeto de mestrado. É um prazer sem igual ter uma banca composta majoritariamente por mulheres.

PRÓLOGO

Formação: Graduada em Ciências Biológicas (2018-2022), na modalidade Bacharelado, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP.

Atividades realizadas durante o Mestrado (2022-2024)

Disciplinas cursadas

Disciplinas cursadas	Ano	Carga Horária	Conceito
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2022	45	A
Fundamentos sobre Ética e Prática na Experimentação Animal	2022	45	A
Seminários em Biofísica	2022	90	A
Imunomodulação por produtos naturais	2021	90	A
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Aplicação de óleos essenciais como antimicrobianos naturais	2021	30	A
Total		300 h	

Participação em eventos científicos

Eventos	Ano
II Simpósio Online Sulamericano de Tecnologia, Engenharia e Ciência de Alimento	2023
3rd Internacional Conference on Natural Products and Human Health	2023
Congresso Brasileiro de Química dos Produtos Naturais	2023
Congresso Ganepão	2023
24º Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade e Qualidade de Vida	2023

Trabalhos apresentados em eventos científicos

- GAROZZO, MN; **PETRY, JCA**; HENRIQUE, LJA; ALMEIDA, NS; JUNIOR, LDA; QUAGLIO, AEV; DIAS, RLA; DI STASI, LC. Atividade moduladora do subproduto do café (*Coffea arabica*) na microbiota intestinal em camundongos. IX Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 3rd France-Brazil Meeting on Natural Products. Setembro de 2023.
- HENRIQUE, LJA; ALMEIDA, NS; **PETRY, JCA**; GAROZZO, MN; QUAGLIO, AEV; DI STASI, LC. Modulação da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 pela suplementação dietética com farinha do caroço de açaí (*Euterpe oleracea mart.*). XXVII Congresso Brasileiro de Nutrologia. Outubro de 2023.
- HENRIQUE, LJA; ALMEIDA, NS; **PETRY, JCA**; GAROZZO, MN; COSTA, EF; QUAGLIO, AEV; DI STASI, LC. Atividade moduladora pela dieta suplementada com o caroço de *Euterpe oleracea mart.* E seus efeitos em marcadores de desordens cutâneas. XXVII Congresso Brasileiro de Nutrologia. Outubro de 2023.
- ALMEIDA, NS; HENRIQUE, LJA; **PETRY, JCA**; GAROZZO, MN; QUAGLIO, AEV; DI STASI, LC. Modulação da microbiota intestinal pela suplementação da farinha de *Musa spp AAA* em camundongos C57BL/6. XXVII Congresso Brasileiro de Nutrologia. Outubro de 2023.

Colaboração em outros projetos de Pesquisa

- Auxílio em estudo de fermentação *in vitro*, como doadora e para realização do processo. “Fermentação *in vitro* no mapeamento de atividade prebiótica em produtos de origem vegetal”, tese de doutorado de Fábio Perez Ferraz de Mello;
- Auxílio no manejo e matança de animais durante tratamento com resíduo de açaí. “Modulação da microbiota intestinal pela dieta enriquecida com o caroço de *Euterpe oleracea Mart.* e seus efeitos em marcadores de disfunções neurodegenerativas e dermatológicas”, tese de doutorado de Laís Janaína Aparecida Henrique;
- Auxílio no manejo e matança de animais durante tratamento com resíduo de banana nanica. “Modulação da microbiota intestinal pela *Musa spp AAA* e seus

efeitos em marcadores de doenças da pele”, tese de doutorado de Nathalia Soares de Almeida;

- Auxílio em andamento do projeto “Modulação da expressão gênica de marcadores de disfunções de pele e doenças neurodegenerativas a partir da dieta enriquecida com o subproduto do café (*Coffea arabica*)”, dissertação de mestrado de Mariana Nakabara Garozzo;
- Auxílio em projetos de Iniciação Científica com o resíduo de café e resíduo de cevada;
- Participação em Projeto de Extensão (PROEX) atrelado ao Grupo Timbó de Agroecologia e Horta Urbana Jardim Amarelo, em Botucatu.

RESUMO

Desenvolvimento de fibra prebiótica derivada de subproduto da cadeia agrícola brasileira: Polpa de *Coffea arabica* (café)

O Brasil ocupa hoje a posição de maior produtor mundial de café. Nesse sentido, tudo o que é produzido para o consumo do grão, é também desperdiçado no que diz respeito ao restante da planta. A polpa do café é um resíduo alimentar e com amplo potencial de ser utilizado como alimento funcional, por sua ação prebiótica. O consumo de alimentos prebióticos está principalmente associado à fermentação da microbiota intestinal e, portanto, à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Os estudos realizados até o momento por nosso grupo de pesquisa mostram que o resíduo de café arábica possui grande quantidade de fibras em sua constituição, substrato principal para a fermentação pela microbiota. Desta forma, o projeto analisou o comportamento de doze bactérias da microbiota intestinal, assim como a produção de acetato, propionato e butirato após a administração do resíduo de café arábica. Foram realizados estudos *in vitro*, através da fermentação de diferentes concentrações do produto, e estudos *in vivo*, por meio da administração de resíduo de café em camundongos C57/Bl6. Nos estudos *in vitro*, a utilização do resíduo do café na concentração 100 mg/ml promoveu resultados promissores sobre a produção dos três AGCCs analisados, alcançando níveis iguais ou superiores aos de inulina, padrão ouro de prebióticos no mercado. Para os estudos *in vivo*, não houve modulação na produção de AGCCs, no entanto, principalmente o gênero *Bifidobacterium* foi modulado de maneira significativa. Os resultados que demonstram a ação prebiótica do resíduo do café, sugerem maiores investigações sobre sua ação em modelos experimentais de doenças associadas à microbiota intestinal.

Palavras-chave: resíduo de café; prebiótico; fermentação; ácido graxo de cadeia curta; microbiota intestinal.

ABSTRACT

Brazil is currently the leading coffee producer in the world. Everything that is produced and used as grain, is also wasted as the rest of the plant. Coffee pulp is characterized as food by product and has great potential to be used as a functional food, with prebiotic activity. Prebiotics consumption is primarily linked to and increase of short chain fatty acids (SCFAs) production (acetate, propionate and butyrate), by the intestinal microbiota metabolism. Recent studies conducted by our research group has demonstrated that coffee pulp contains notable amounts of dietary fiber in its constitution, serving as a key substrate for microbiota fermentation. Therefore, this project evaluate the behaviour of twelve bacteria species from intestinal microbiota, and the subsequent SCFAs production after coffee administration. In vitro experiments were performed through fermentation of different concentrations of coffee by product, while in vivo experiments were studied through the administration of coffee by product in C57/Bl6 mice. In in vitro studies, coffee by product group at concentration of 100 mg/ml demonstrated important results on the three SCFAs production at similar level of inulin, the main market prebiotic product. Although in vivo studies did not demonstrate modulation in SCFAs production, there was a significantly increase in Bifidobacterium genera. These results indicate the potential prebiotic activity of coffee by product, however, further investigations are needed to elucidate its effects in experimental models associated to intestinal microbiota-related diseases.

Key words: coffee by product; prebiotic; fermentation; short chain fatty acids; intestinal microbiota.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias utilizadas em experimento *in vitro* e *in vivo*

Tabela 2. Determinação das fibras dietéticas do resíduo do café

Tabela 3. Porcentagem de polifenóis no resíduo de café

Tabela 4. Atividade antioxidante (DPPH) do resíduo do café

Tabela 5. Peso dos órgãos dos animais

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos do sangue dos animais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de acetato *in vitro*

Figura 2. Concentração de propionato *in vitro*

Figura 3. Concentração de butirato *in vitro*

Figura 4. Concentração somatória de AGCCs *in vitro*

Figura 5. Padrão de *A. muciniphila* *in vitro*

Figura 6. Padrão de *B. adolescentis* *in vitro*

Figura 7. Padrão de *F. prausnitzii* *in vitro*

Figura 8. Padrão de *L. rhamnosus* *in vitro*

Figura 9. Padrão de *R. inulinivorans* *in vitro*

Figura 10. Padrão de *R. intestinalis* *in vitro*

Figura 11. Padrão de *B. longum*, *E. coli*, *L. agilis*, *L. gasseri*, *L. salivarius* e *R. faecis* *in vitro*

Figura 12. Consumo semanal de ração

Figura 13. Evolução ponderal entre os grupos de tratamento *in vivo*

Figura 14. Concentração de acetato *in vivo*

Figura 15. Concentração de propionato *in vivo*

Figura 16. Concentração de butirato *in vivo*

Figura 17. Concentração somatória de AGCCs *in vivo*

Figura 18. Padrão de *A. muciniphila* *in vivo*

Figura 19. Padrão de *B. adolescentis* *in vivo*

Figura 20. Padrão de *B. longum* *in vivo*

Figura 21. Padrão de *E. coli* *in vivo*

Figura 22. Padrão de *F. prausnitzii* *in vivo*

Figura 23. Padrão de *L. agilis* *in vivo*

Figura 24. Padrão de *L. gasseri* *in vivo*

Figura 25. Padrão de *L. rhamnosus* *in vivo*

Figura 26. Padrão de *L. salivarius* *in vivo*

Figura 27. Padrão de *R. faecis* *in vivo*

Figura 28. Padrão de *R. intestinalis* *in vivo*

Figura 29. Padrão de *R. inulinivorans* *in vivo*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. MATERIAL VEGETAL – Resíduo do Café.....	23
3.2. ANÁLISE DO RESÍDUO DE CAFÉ.....	24
3.2.1. Determinação das Fibras Alimentares.....	24
3.2.2. Quantificação de Polifenóis.....	25
3.2.3. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	26
3.3. ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	27
3.3.1. Obtenção e preparo das amostras.....	27
3.3.2. Fermentação <i>in vitro</i>	27
3.3.3. Análise dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs).....	28
3.3.4. Análise de microrganismos de interesse por qPCR.....	29
3.4. ANÁLISES <i>IN VIVO</i>	31
3.4.1. Animais de Experimentação.....	31
3.4.2. Obtenção das Rações.....	31
3.4.3. Divisão dos Grupos e Período de Experimentação.....	32
3.4.4. Avaliação de Peso e Consumo de Ração.....	32
3.4.5. Obtenção de Material Biológico para Análise.....	32
3.4.6. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos do Sangue.....	33
3.4.7. Extração e Análise dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs).....	33
3.4.8. Análise de microrganismos de interesse por qPCR.....	33

4. RESULTADOS.....	34
4.1. ANÁLISE DO RESÍDUO DE CAFÉ.....	34
4.1.1. Perfil de Fibras Alimentares.....	34
4.1.2. Quantificação de Polifenóis.....	34
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
4.3. FERMENTAÇÕES <i>IN VITRO</i>	35
4.3.1. Análise de AGCCs (<i>IN VITRO</i>).....	35
4.3.2. Análise de microrganismos de interesse por qPCR (<i>IN VITRO</i>).....	37
4.4. EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	42
4.4.1. Consumo de Ração Semanal.....	42
4.4.2. Evolução Ponderal.....	42
4.4.3. Análise de Órgãos.....	43
4.4.4. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos do Sangue.....	44
4.4.5. Análise de AGCCs (<i>IN VIVO</i>).....	45
4.4.6. Análise de microrganismos de interesse por qPCR (<i>IN VIVO</i>).....	48
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	64

1. INTRODUÇÃO

Cerca de um terço de toda produção agrícola mundial é desperdiçada durante seu processamento, gerando cerca de 1,3 bilhões de toneladas de resíduos alimentares não aproveitados anualmente (1). A maior parte dessas perdas ocorre durante o processamento agrícola, que envolve o plantio, colheita, transporte, armazenamento, distribuição, conservação e também o consumo (2). Resíduo alimentar é o termo designado a todo e qualquer resto orgânico oriundo de transformações de matérias-primas em produtos alimentares.

A Comissão Europeia prevê que os resíduos alimentares possam ser geridos como um importante recurso, tornando-se opções atraentes para o mercado em geral (3). A valorização dos resíduos da produção agrícola mundial, torna-se uma saída otimizada e vantajosa, econômica, social e ambientalmente, uma vez que reduz custos, reaproveita e redireciona recursos, além de ser uma estratégia de inovação interessante para as esferas citadas anteriormente.

Especificamente em relação ao café arábica (*Coffea arabica*), o mesmo é caracterizado por ser uma das commodities mais consumidas ao redor do mundo (4). A produção mundial de café na safra de 2023/2024 está estimada para totalizar cerca de 171,4 milhões de sacas, ou 10,3 milhões de toneladas (5). O Brasil em especial, é o maior produtor de café do mundo (café arábica e conilon), sendo detentor de cerca de um terço da produção mundial, e o café um dos principais produtos para o agronegócio brasileiro (6). Em 2018, o Brasil produziu uma safra recorde de grãos estimada em 58 milhões de sacas ou 3,5 milhões de toneladas, com 75% correspondente ao tipo arábica (7).

A utilidade do café na indústria está majoritariamente atrelada ao seu consumo como bebida e, portanto, ao consumo estrito do grão. Entretanto, a relação de proporção das partes da planta, de polpa e de grão, é cerca de 1:1, ou seja, de tudo aquilo que é produzido, parte também é sub-aproveitado ou simplesmente descartado enquanto resíduo alimentar (8). As vias mais comuns para o aproveitamento deste tipo

de resíduo são a alimentação animal, a incineração e a compostagem, embora nem sempre demonstram eficiência e acarretam custos elevados (9). No entanto, é também muito comum o descarte inapropriado, que, invariavelmente torna-se fonte de contaminação ambiental. Há grandes riscos ambientais atrelados à contaminação de resíduos orgânicos por microrganismos, por suas altas concentrações de substâncias e compostos fermentativos, e conseqüentemente riscos de contaminação do solo, lixiviação de toxinas e matéria orgânica em excesso para o solo e corpos d'água próximos (8), além de ocupar extensas áreas em termos de despejo.

A polpa do café representa de 39% a 49% da massa do fruto fresco e se caracteriza como um resíduo rico em nutrientes e compostos úteis que não são utilizados nesta primeira etapa de processamento (1). Com o reaproveitamento dos resíduos, em posterior etapa, é possível alcançar obter subprodutos, os quais representam os resíduos alimentares que contêm substratos potencialmente úteis, que podem ser avaliados quanto sua funcionalidade e gerarem novos produtos com alto valor agregado (10). Ou seja, dependendo da matéria-prima, um resíduo pode conter vários nutrientes básicos, como proteínas, lipídios, minerais e carboidratos, e ainda pode incluir outras classes de substâncias, tais como carotenoides, compostos polifenólicos, peptídeos, entre outros, e especialmente fibras alimentares com potenciais efeitos farmacológicos.

O principal e primário objetivo da alimentação é a garantia de substrato energético suficiente para o funcionamento do metabolismo e, portanto, para o desempenho de atividades sistêmicas básicas. No entanto, produtos incorporados à dieta podem gerar efeitos, além daqueles estritamente nutricionais. Os alimentos funcionais são introduzidos de maneira a sobrepor tal função, e apresentam viabilidades que vão além do amparo energético fornecido pelo alimento.

Alimentos são classificados como funcionais se tiverem capacidade de modular beneficemente uma ou mais funções no organismo, além de seu benefício nutricional intrínseco, como o aprimoramento da saúde e bem-estar físico, assim como no papel preventivo e ou redutor no risco de desenvolvimento de doenças (11).

Alimentos funcionais geralmente são categorizados como produtos de origem natural, com a possibilidade de serem ou não modificados, por meio da adição ou

retirada de componentes. Além disso, o FUFOSE (Functional Food Science in Europe) define alimentos funcionais como:

- Alimentos que fazem parte da dieta usual diária de uma população;
- Compostos naturais, podendo ser modificado quanto a seus componentes;
- Terem efeitos nutricionais intrínsecos, além de promover beneficamente o bem-estar e saúde e terem efeitos na redução de risco de doenças;
- Ter embasamento científico de suas funções e alvos fisiológicos.

É importante que o efeito farmacológico seja demonstrado em quantidades consumidas diariamente por uma pessoa através da dieta, e não pela ingestão concentrada de pílulas ou suplementos, visto que alimentos funcionais devem ser considerados e consumidos como alimentos convencionais (12). Por outro lado, o uso de resíduos alimentares não contemplaria o primeiro item da definição clássica de alimentos funcionais. No entanto, estudos de resíduos alimentares do ponto de vista farmacológico permitiram sua categorização como alimento funcional, os quais poderiam ser incorporados no desenho de novos alimentos com propriedades nutricionais e benéficas ao bem-estar e à saúde, assim como na redução no risco de doenças.

Em adição, a demanda da população por produtos naturais e nutritivos, com foco na qualidade de vida e bem-estar tem crescido exponencialmente nas últimas décadas, por reflexo de uma sociedade mais preocupada com a saúde e longevidade (13). A procura por produtos que auxiliam a manutenção da vida, concomitantemente ao desejo na redução no consumo de fármacos convencionais (muitas vezes de uso crônico e vinculados a efeitos adversos), indica a necessidade de um aprimoramento ao ramo da biotecnologia, com desenvolvimento de novos produtos a serem explorados e comercializados, como estratégia de inovação para a indústria alimentícia e farmacêutica (14).

Além do grande potencial comercial dos alimentos funcionais, é importante apontar que são produtos que podem ser manipulados em grande escala, a baixo custo e com pequeno ou nenhum impacto ambiental (15). Dessa forma, o desenvolvimento de um subproduto derivado do setor agrícola brasileiro, tal como o resíduo do café arábica, é uma estratégia inovadora e potencialmente útil para o desenvolvimento de novos produtos com potencial farmacológico.

Ao longo do processo evolutivo, os mamíferos e os microrganismos que os habitam, evoluíram a ponto de serem considerados organismos simbióticos (16). Esta interação, que envolve diversas comunidades microbiológicas, ocorre em diferentes sítios do organismo humano, como nas cavidades oral (17), vaginal (18), na pele (19), e especialmente no intestino, onde ocorre a maior e mais variada interação simbiótica entre estes organismos. Estima-se, embora muito discutido, que cerca de mil espécies de bactérias habitam esse ambiente, com 10 trilhões de organismos presentes, contando também com a presença de vírus, fungos e protozoários (20). Dentre as bactérias que compõem o ecossistema microbiano, a maioria pertence aos filos Firmicutes (bactérias gram positivas) e Bacteroidetes (bactérias gram negativas). Entre essas primeiras, as classes Bacilli, Clostridia e Mollicutes são as mais encontradas, enquanto que no filo Bacteroidetes, se destacam as Bacterioides, Flavobacterias e Sphingobacterias (21).

A microbiota intestinal (assim chamada a população de microrganismos do TGI) contém cerca de 10 vezes mais genes que o genoma do hospedeiro humano (20). A microbiota intestinal é responsável por variadas funções fisiológicas essenciais para o hospedeiro, muitas das quais não estão codificadas no genoma humano. Dessa forma, devido à simbiose dos organismos, a microbiota é também referida como um “órgão metabólico” (22). Em função desta intrínseca interação, o ecossistema microbiano está atrelado a condições de saúde e bem-estar dos hospedeiros, assim como relacionado ao aparecimento de algumas doenças.

A microbiota intestinal atua sob diversas formas no organismo, principalmente vinculadas ao sistema imunológico. Benefícios tais como imunomodulação, proteção contra patógenos, produção de vitaminas essenciais, são alguns exemplos (23). A função em foco neste estudo está na fermentação pela microbiota intestinal de polissacarídeos,

carboidratos não digeríveis pelo trato gastrointestinal do hospedeiro. Alimentos dessa composição são fermentados e degradados pela comunidade microbiana no intestino grosso, resultando em uma mistura de gases e ácidos graxos de cadeia curta (24), que são metabólitos bacterianos de vital importância para o hospedeiro.

Por outro lado, a disbiose, ou seja, uma microbiota debilitada e em menor diversidade, pode promover, em associação a fatores ambientais e genéticos, o desenvolvimento de diversas condições patológicas. Este desequilíbrio da diversidade e quantidade de microrganismos da microbiota intestinal pode ser causado por variados fatores, mas principalmente por uma alimentação desbalanceada, com o consumo em excesso de produtos ultraprocessados e gordurosos e baixa ingestão de alimentos *in natura*. Há evidências científicas de que a disbiose da microbiota intestinal está relacionada a algumas doenças, tais como alguns tipos de alergias (25), câncer gástrico (26), autismo (27), obesidade (28), anorexia (29), diabetes tipo 2 (30; 31), doença inflamatória intestinal (32; 33), como a doença de Chron e retocolite ulcerativa (32).

A microbiota intestinal é modulada por diversos fatores, dentre alguns deles destaca-se a dieta, estilo de vida, prática de exercícios físicos e ou sedentarismo, consumo de medicamentos, localização geográfica do indivíduo, a via de parto, seja ela cesárea ou parto vaginal, período pós-natal, tipo de amamentação, primeira infância, entre outros (34).

Já está amplamente comprovado que o padrão alimentício de uma pessoa modula a composição de sua microbiota intestinal (35; 36; 37). Além disso, há outras ferramentas de modulação, como por exemplo, o transplante de fezes (38) ou o consumo de prebióticos (39), que são utilizadas para a melhoria nas condições de saúde. Este segundo é largamente utilizado para moldar a comunidade microbiana, de forma a atuar como substrato de maneira seletiva para o crescimento de determinadas bactérias do trato gastrointestinal.

Prebióticos são compostos não digeríveis pelo hospedeiro e que servem de substrato para a fermentação bacteriana no intestino grosso. Diversos tipos de oligo e polissacarídeos possuem atividade prebiótica, incluindo as fibras alimentares solúveis e insolúveis. Para um alimento ser considerado prebiótico ele deve ser: (1) resistente ao

trato gástrico, ao seus ácidos e enzimas; (2) ser fermentado pela microbiota intestinal; e (3) atuar seletivamente no crescimento e atividade de tipos bacterianos da microbiota associados à saúde e bem-estar (40), resultando no aumento na produção de metabólitos bacterianos.

As fibras não digeríveis fazem parte do grupo de carboidratos e geralmente estão presentes em alimentos *in natura*, principalmente de origem vegetal, pela composição da parede celular neste tipo de organismo (41). Entre os vários tipos de fibras, as fibras insolúveis, de maior peso molecular, tendem a armazenar água em sua estrutura e dessa forma, aceleram a passagem do bolo fecal no intestino grosso, auxiliando a motilidade intestinal e facilidade de evacuação (42). Por outro lado, as fibras solúveis, de menor peso molecular atuam de forma a retardar o esvaziamento gástrico, diminuindo a velocidade da passagem do alimento entre o estômago e o intestino delgado (42). Em adição, sendo compostos resistentes à digestão das enzimas no trato gastrointestinal humano, exercem papel importante no fornecimento de substrato para a fermentação pela microbiota intestinal, de modo a se comportarem como prebióticos. Dessa forma, as fibras alimentares, através de seu papel prebiótico apresentam grande potencial na manutenção da saúde e tratamento e prevenção de condições patológicas, e podem ser introduzidos no organismo via consumo de alimentos funcionais.

A partir da interação de diferentes espécies de bactérias e tipos de fibras, é possível a modulação da microbiota intestinal e a produção de seus metabólitos. Dentre as principais fibras, as mais utilizadas são: amido resistente, pectina, inulina, arabinoxilano, frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, os quais são encontrados naturalmente em diversos tipos de alimentos (43). A inulina é um frutooligossacarídeo não digerível, extraído da raiz da chicória e amplamente utilizado como modulador da microbiota intestinal, sendo um prebiótico de referência para aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente de butirato, sendo usada neste estudo como padrão para os estudos de fermentação *in vitro* (44 - 49).

O consumo de fibras alimentares para processo fermentativo das bactérias anaeróbicas presentes na microbiota intestinal, gera como metabólitos principais os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), além de ácidos graxos de cadeia ramificada e

gases, como metano, dióxido de carbono e hidrogênio molecular (CH₄, CO₂ e H₂). A síntese de AGCCs é o mais importante processo fisiológico mediado pela microbiota intestinal no corpo humano (50). Através do catabolismo de carboidratos não digeríveis pelo hospedeiro, assim como de algumas proteínas (embora em menor contribuição), as bactérias são responsáveis por um relevante fornecimento de substrato energético diário para o organismo, através da produção e consumo destes metabólitos.

Os AGCCs produzidos pelo processo fermentativo podem ser absorvidos pelo organismo do hospedeiro e promoverem variadas ações sistêmicas sobre diferentes vias de sinalização no organismo. Além de ser importante fonte energética (para musculatura, rins, coração, SNC e principalmente para as células do cólon intestinal), os AGCCs atuam como agente imunomodulador, antioxidante, são mediadores da resposta inflamatória e da sinalização endócrina, além de influenciarem o metabolismo, crescimento e diferenciação de células epiteliais intestinais (51). Os AGCCs também acidificam o ambiente do intestino grosso, propiciando o aumento na população de bactérias benéficas e inibindo o desenvolvimento de patógenos, assim como atuam no aumento de fluxo sanguíneo no cólon, que promove maior absorção de sódio e água (52).

Em termos de significância metabólica, os principais AGCCs sintetizados são respectivamente, o butirato, o propionato, o acetato e, de menor importância, o valerato (53), além dos ácidos de cadeia ramificada, isobutirato e isovalerato (54). A extensa maioria desses metabólitos (>95%) é oxidada e absorvida por células da mucosa do intestino grosso (colonócitos) (50), atingindo a corrente sanguínea onde podem alcançar diferentes tipos celulares e promover variadas ações farmacológicas.

Como mencionado anteriormente, os efeitos fisiológicos do butirato são os mais relevantes dentre os demais AGCCs. O ácido butírico, assim também denominado, é uma das principais fontes de energia para as células do cólon; atuante no sistema imunológico e mecanismos de inflamação (55; 56; 57), assim como no mecanismo de defesa contra a carcinogênese (58; 59). Em adição, o butirato participa da resposta ao estresse oxidativo nas células (60), na função na barreira na mucosa intestinal (61), nos mecanismos de saciedade (62), na função e manutenção da microbiota, assim como na sensibilidade à

insulina (63). Já o acetato e propionato também possuem ações sistêmicas, como no sistema imune, em processos inflamatórios (64), participação no controle da carcinogênese (65), adipogênese (66) e, metabolismo do colesterol (67).

As concentrações de AGCCs presentes no intestino grosso dependem da qualidade da microbiota intestinal, hábito alimentar, frequência do trânsito intestinal e da interação metabólica entre o hospedeiro e sua microbiota (68).

A presença ou ausência desses metabólitos no organismo está muito relacionada à diversas condições patológicas, como por exemplo a asma, algumas alergias, doenças metabólicas, câncer e doenças autoimunes, inclusive com as doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes e Doença Inflamatória Intestinal (25; 26; 32; 33).

Desta forma, uma alimentação de qualidade, rica em fibras e, portanto, com potencial prebiótico, é fundamental para a síntese de metabólitos essenciais produzidos pela microbiota, e logo, para o funcionamento adequado do organismo humano.

2. OBJETIVOS

Com base nestas considerações, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial prebiótico do resíduo de café (*Coffea arabica*) em modelos de fermentação *in vitro* e *in vivo*, por meio da avaliação do perfil da microbiota intestinal e da produção de ácidos graxos de cadeia curta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. MATERIAL VEGETAL - Resíduo do Café

O resíduo do café foi cedido pela empresa Verum do Brasil Comércio Alimentício LTDA, e engloba a polpa e a casca da planta. As amostras encontravam-se previamente desidratadas e foram submetidas ao processo de secagem em estufa por 48 horas a 50°

C. Em seguida foram trituradas em um moinho de facas rotor tipo ciclone Star FT 51, para obter uma farinha do produto.

3. 2. ANÁLISE DO RESÍDUO DE CAFÉ

3.2.1. Determinação das Fibras Alimentares

A análise do perfil de distribuição das fibras alimentares foi realizada a partir do kit comercial “Integrated Total Dietary Fiber Assay Kit” (Megazyme) com alterações dos métodos AOAC 2009.01/AOAC 2011.25 desenvolvidos por McCleary et al. (2015).

A amostra do resíduo de café foi incubada em estufa por 16 horas a 37°C, com as enzimas amilase pancreática (PAA) e amiloglicosidase (AMG), e posteriormente inativadas em banho a 100°C por 20 minutos, e resfriadas a 60°C. Na sequência foi adicionada a enzima protease, com incubação a 60°C por 30 minutos. Nesta etapa a amostra foi filtrada, e as fibras alimentares insolúveis (IDF) foram obtidas a partir do material retido no filtro. O filtrado foi diluído com 78% de etanol e o precipitado formado foi novamente filtrado por Celite. Este segundo precipitado foi denominado fibras alimentares solúveis - precipitado (SDFP), enquanto o filtrado foi denominado fibras alimentares solúveis - solúveis (SDFS). Os dois primeiros precipitados foram analisados por gravimetria para a quantificação. A fração SDFS, que consiste nas fibras alimentares solúveis de menor peso molecular, foi analisada por cromatografia líquida (HPLC IR – Shimadzu RID10) para sua quantificação.

Cerca de metade do filtrado que continha as fibras solúveis de baixo peso molecular (SDFS) foi transferido para um balão de rotaevaporador de 500 ml, em que foi realizada sua secagem sob vácuo a 60°C. Posteriormente, foi adicionado 5 ml de água deionizada ao balão com agitação durante 2 minutos. A solução foi transferida para um tubo de 20 ml de polipropileno.

Em seguida, 2 ml desta solução foi transferido para o topo da coluna descartável Bio-Rad, contendo uma resina de 4g de Amberlite FPA 53 (OH-) e 4g de Ambersep 200 (H+). A coluna foi eluída a uma taxa de 1 ml/min em um frasco Duran de 100 ml. Quando a amostra iniciou contato com a resina, 2 ml de água destilada foi adicionada e

prosseguiu-se a eluição. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 20 ml de água deionizada no topo da coluna e prosseguiu a eluição a uma taxa de 1 ml/min. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo de 250 ml e o conteúdo submetido a um rotaevaporador sob vácuo a 60°C. Foi adicionado 2 ml de água deionizada à mistura e os açúcares foram dissolvidos com agitação durante 2 minutos. A solução foi temporariamente armazenada em tubo de polipropileno, então transferida para uma seringa descartável de 10 ml e filtrada em filtro de 0,45 µm.

Injeções de 50 µl, em duplicata, foram aplicadas ao cromatógrafo. D-glicose foi utilizada como fator de referência para a determinação da massa das SDFS, em triplicata e volume idêntico aos analitos. Os valores para as áreas de pico de das triplicatas foram calculados com base no padrão interno.

3.2.2. Quantificação de Polifenóis

Os polifenóis totais presentes nas amostras do resíduo de café foram quantificados através do método espectrofotométrico pela reação com Folin Ciocalteau (25%) e carbonato de cálcio (20%). A quantificação foi feita por equivalência ao ácido gálico por meio de uma curva padrão, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 e 20 mg/ml.

Para a análise do resíduo de café, foram macerados 2g da amostra seca e deixados em 50 ml de metanol 70% em ambiente refrigerado (4°C) durante 72 horas. Os extratos foram filtrados e rotaevaporados em balão volumétrico de 250 ml. O material seco resultante foi novamente suspenso em 50 ml de água ultrapura e armazenado em frasco de âmbar, e posteriormente agitado.

A reação foi realizada transferindo 500 µl do extrato para balão volumétrico, seguido de agitação por 30 segundos. Foi acrescentado 100 µl da solução de carbonato de cálcio e 500 µl da solução Folin Ciocalteau. A solução final foi agitada manualmente por 10 segundos e permaneceu em repouso por 30 minutos na ausência de luz. Ao final do período, foi homogeneizada e sua absorbância aferida em espectrofotômetro BioTek PowerWave HT por frequência de 700 nm.

A solução padrão foi preparada da mesma maneira utilizando-se 500 µl da solução Folin ciocalteau e 1 ml da solução de carbonato de cálcio diluídos em 10 ml de água ultrapura, 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 curva de calibração do espectrofotômetro.

3.2.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

Preparação de Extratos

Foram macerados 40g do resíduo do café em 120 ml de metanol 70% (proporção 1:3) durante três dias, a 4°C. Em seguida, o macerado foi filtrado em papel próprio para o procedimento e armazenado em béqueres de 400 ml. As partes retidas foram novamente submetidas ao processo de maceração sob as mesmas condições. Esta etapa foi executada três vezes. O filtrado de cada etapa foi acondicionado no mesmo béquer em que foi a primeira. Por fim, o filtrado foi rotaevaporado. Ao final as amostras foram acondicionadas em frasco âmbar e o volume final foi ajustado para 50 ml. Em seguida, 200 µl do extrato foi submetido ao processo de secagem em recipiente de alumínio para avaliação do peso seco e concentração da amostra, a qual 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), pelo conteúdo presente no resíduo do café. Como parâmetro de comparação, utilizou-se o ácido gálico 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 2.55 µg/ml).

Para o resíduo do café, utilizou-se o extrato metanólico nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µg/ml. A solução de DPPH foi feita na concentração de 100 µM (ou 40 µg/ml), em balão volumétrico de 25 ml restrito de luz.

A análise de medidas foi feita em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) em comprimento de onda 517 nm, tendo como controle positivo padrões de ácido gálico (0-15 $\mu\text{M}/\text{ml}$ em metanol 70%). Em 100 μl da amostra de café, foi adicionado 200 μl da solução de DPPH (100 μM , 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). As medidas de absorvância das misturas reacionais foram feitas após 30 minutos de incubação ao abrigo de 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 absorvância no tempo de 30 minutos para cada concentração testada, foi determinada a atividade sequestradora de radicais livres (percentuais de DPPH remanescentes).

3.3. ANÁLISES *IN VITRO*

3.3.1. Obtenção e preparo das amostras

Os grupos de café submetidos às análises *in vitro*, nas concentrações de 10, 30 e 100mg/ml (do produto, por ml de solução NaHCO_3), e a inulina cedida pela empresa Beneo (Inulina Orafiti® HP 99% e com grau de polimerização ≥ 23 , utilizada em concentração de 30mg/ml), foram incubados em fezes humanas de voluntário sadio. A inulina foi incluída no experimento como marcador positivo da atividade microbiana e da produção de ácidos graxos de cadeia curta.

3.3.2. Fermentação *in vitro*

Protocolo de Fermentação *in vitro*

O protocolo de fermentação *in vitro* foi realizado com base na técnica de fermentação *in vitro* do tipo “batch” (69). Amostras de fezes humanas oriundas de um único indivíduo, adulto, saudável e do sexo masculino, foram homogeneizadas em um recipiente e processadas imediatamente após a coleta. Para cada amostra fermentada foram transferidos 2g de fezes em tubo falcon de 50 ml, com 10 ml de solução de

NaHCO₃ (159mM em pH 7,8 - proporção 1:5 p/v) e a atmosfera do tubo foi saturada de argônio. Em seguida, foram adicionados os produtos a serem testados em suas respectivas concentrações, sendo a inulina em 30 mg/ml, denominada **I30** e, o resíduo do café, nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml, respectivamente denominadas **Ca10**, **Ca30** e **Ca100** (expressas em miligramas de produto por mililitro da solução NaHCO₃). Novamente a atmosfera foi saturada com argônio e os tubos foram vedados com filme plástico parafinado, mimetizando o ambiente anaeróbico. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex por um minuto, e os tubos mantidos em câmara fermentativa, uma estufa a 37°C, por 24 horas, e agitação constante de 150 rpm, abrigados de qualquer fonte de luz. Foram realizadas seis fermentações, em dias diferentes, e cada uma das amostras foi testada em triplicata.

Além das amostras fermentadas com os produtos e concentrações de interesse, cada processo de fermentação foi acompanhado de dois outros grupos. Um deles, grupo denominado **Controle**, contendo apenas as fezes e a solução de NaHCO₃ com a devida saturação da atmosfera com argônio e procedimento da estufa, sem nenhum produto adicionado, e, outro grupo de amostras de fezes não fermentadas, denominado **Não Fermentado (NF)**, em que continha apenas as fezes armazenadas em tubos eppendorf, sem o procedimento de fermentação em estufa.

3.3.3. Análise dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs)

Extração dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Após o processo fermentativo, foi colhido 1 ml de cada uma das amostras de homogeneizados fecais, e adicionado 1 ml de ácido ortofosfórico na concentração de 0,5%. As amostras seguiram para agitação em vórtex por 1 minuto. Para as amostras não fermentadas, 200 mg de fezes frescas foram diluídas em 2 ml de ácido ortofosfórico a 0,5%, e agitadas também em vórtex por 1 minuto. Após esta etapa, todas as amostras seguiram as mesmas. Os homogenatos, com 2 ml, foram transferidos para tubos eppendorf e submetidos a centrifugação a 17950G por 10 minutos a 4°C. Foi retirado 1ml de sobrenadante, sobre o qual foi adicionado acetato de etila na proporção de 1:1, e novamente agitado e centrifugado nas mesmas condições, enquanto o conteúdo

precipitado fora descartado. Deste segundo sobrenadante, foi também coletado 1ml e o conteúdo acondicionado em vials de 1,5 ml, e 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 (GC-MS Thermo Scientific, modelo FOCUS ISQ 230ST), para análise dos ácidos graxos de cadeia curta.

Quantificação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs) e Curva Padrão

As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa, 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 por meio da integralização da área sob a curva dos picos referentes aos analitos de interesse, bem como do padrão interno (ácido octanóico), adicionado manualmente a cada amostra. Para a quantificação dos AGCCs, feita com base na curva padrão adaptada de Domingues et al. (2017), os dados foram plotados utilizando o software GraphPad Prims 8, e os valores de cada analito calculados via regressão linear, referentes à proporção do padrão interno de cada amostra. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida por teste a posteriori de Dunnett, considerando o nível de significância de $p \leq 0,05$ e $\leq 0,01$, devidamente indicados. Os valores obtidos, expressos em mg/ml, foram posteriormente convertidos em $\mu\text{Mol/g}$, referindo-se então à concentração de AGCCs presente em 1 g de fezes.

3.3.4. Análise de microrganismos de interesse por qPCR

As amostras de fezes e as amostras provenientes da fermentação com o resíduo do café foram armazenadas em freezer - 80°C até o momento da análise. Para a extração do DNA genômico bacteriano foi utilizado o kit PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen™). Após a extração, o gDNA foi mantido em temperatura a -20°C até a realização da reação de qPCR. Para a reação de qPCR foi utilizado o sistema Power SYBR™ Green (Applied Biosystems™) com os primers específicos para cada organismo de interesse, baseados nas sequências 16S rRNA. As bactérias analisadas e os detalhes de

cada primer estão na Tabela 1. Todas as reações foram realizadas no equipamento StepOne Plus do laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) da UNESP de Botucatu.

Bactéria	Primer	[primer]
UNIVERSAL	F: GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA R: ACGTCRTCCMCNCCTTCCTC	100 nM
1. <i>Akkermansia muciniphila</i>	F: AGAGGAAGAGACGGCTAACT R: ACGACTTACGAAACAGCCTAC	100 nM
2. <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	F: GGGTGGTAATGCCGGATG R: CGAAGGGCTTGCTCCAGT	200 nM
3. <i>Bifidobacterium longum</i>	F: CAGTTGATCGCATGGTCTT R: TACCCGTCGAAGCCAC	200 nM
4. <i>Escherichia coli</i>	F: CCTCATAAAGTGCGTCGTAGTC R: CGTATTCACCGTGGCATTCT	100 nM
5. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	F: GGAGGAAGAAGGTCTTCGG R: AATCCGCCTACCTCTGCACT	100 nM
6. <i>Lactobacillus agilis</i>	F: CTTATGACCTGGGCTACACAC R: CCGAACTGAGAACGGCTTTA	100 nM
7. <i>Lactobacillus gasseri</i>	F: CCGCAAGGTTGAAACTCAAAG R: TGGATGTCAAGACCTGGTAAG	200 nM
8. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F: CATGGGTAGCGAACAGGATTAG R: CCCAGGCCGAATGCTTAAT	100 nM
9. <i>Lactobacillus salivarius</i>	F: CTTATGACCTGGGCTACACAC R: CCGAACTGAGAACGGCTTTA	100 nM
10. <i>Roseburia faecis</i>	F: CCGCAGCAAACGCAATAAG R: GGGATGTCAAGACTTGGTAAGG	200 nM
11. <i>Roseburia intestinalis</i>	F: CGCGTGAGCGAAGAAGTATT R: GGCTGCTGGCACGTATTTA	100 nM
12. <i>Roseburia inulinivorans</i>	F: CGGTGGAGCATGTGGTTTA R: TCCGAAGGAAAGGACACATTAC	200 nM

Tabela 1. Bactérias utilizadas em experimento *in vitro* e *in vivo*, detalhamento de cada primer.

Para a análise dos dados foi utilizada a metodologia do Δ Ct-corrigido por meio da eficiência, utilizando o primer universal como referência. Em seguida, os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por

teste a posteriori de Dunnett, considerando o nível de significância de $p \leq 0,05$ e $\leq 0,01$, devidamente indicados.

3.4. ANÁLISES *IN VIVO*

3.4.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados 14 camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 8 semanas de vida, obtidos do Laboratório Anilab (Animais de Laboratório para Pesquisa), em Paulínia - SP. Os animais foram distribuídos em números de 3 a 4 por caixa, em seguida alocados em estantes ventiladas com filtração de ar, e mantidos no interior de uma sala climatizada sob temperatura constante de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, no biotério do laboratório FitoFarmaTec. Água e ração padrão para roedores foram disponibilizadas *ad libitum* durante o período de 10 dias de aclimação, e em seguida, animais foram divididos em dois grupos, Café e Controle. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UNESP de Botucatu no protocolo 1186/2019.

3.4.2. Obtenção das Rações

A ração enriquecida com café foi uma mistura da ração padrão para roedores em pó, Nuvilab, da empresa Quimtia, com adição de 10% do resíduo de café, feita por adição geométrica. A ração foi posteriormente peletizada na Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPEX).

Os pellets produzidos foram depositados em estufa com circulação e renovação de ar a 50°C durante 48h para secagem das rações e finalização do processo de solidificação. Ao final do processo, as rações foram distribuídas em sacos plásticos, vedadas e alocadas em câmara fria a 4°C , sendo retiradas do local sempre que requeridas, ou seja, no momento de abastecimento dos animais.

3.4.3. Divisão dos Grupos e Período de Experimentação

Após o período de aclimação de 10 dias, os animais foram divididos randomicamente em dois grupos ($n = 7$), sendo um grupo denominado **Controle**, de animais que receberam ração padrão de roedores e outro o grupo denominado **Café**, com ração enriquecida a 10% com o resíduo do café.

3.4.4. Avaliação de Peso e Consumo de Ração

A alimentação foi repostada semanalmente, preenchendo o reservatório de ração com capacidade de 150 g. O consumo de ração foi medido por meio de uma balança eletrônica digital Marte modelo AS 200 C, via diferença de peso consumido. A evolução ponderal dos camundongos também foi mensurada a cada semana fazendo uso da mesma balança, e a troca e higienização da caixa, feitas na mesma frequência.

3.4.5. Obtenção de Material Biológico para Análise

Durante o experimento foram coletadas em três momentos, amostras de fezes da caixa dos animais para posterior análise da evolução do perfil da microbiota intestinal, bem como da produção de ácidos graxos de cadeia curta. Essas três amostras foram intituladas de **Dia 0**, coleta feita no início do experimento, no **Dia 45** e **Dia 90**, quando o experimento foi finalizado.

Assim que colhidas, as amostras foram armazenadas em três eppendorfs: dois destinados à análise de AGCCs, com 0,1 g de fezes em cada, e um à análise de microbiota, contendo 1 g de fezes. Em seguida, foram armazenadas a -80°C .

Ao fim dos 90 dias de experimentação, os animais foram mortos após aplicação de anestesia com Ketamina/Xilazina 100/10 mg/kg, e em seguida a morte foi confirmada por deslocamento cervical. O sangue obtido foi coletado por meio de punção intracardíaca, e armazenado em microtubos. Foi mantido em temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorresse a coagulação, e após esse período, o sangue foi

centrifugado por 15 minutos a 4.400 rpm, e o soro separado foi armazenado a -80°C para as análises bioquímicas.

Destes animais também foram coletados o cérebro, coração, pulmão, rins, estômago, fígado, testículos, vesícula seminal, baço e intestino grosso. Estes órgãos foram pesados, analisados macroscopicamente, submersos no formol e armazenados em câmara fria a 4°C.

3.4.6. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos do Sangue

O soro sanguíneo coletado foi enviado para o Laboratório Clínico Veterinário HV FMVZ – UNESP, para a dosagem dos seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), albumina, aspartato aminotransferase (AST), colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, HDL (proteína de alta densidade), LDL (proteína de baixa densidade), proteínas totais, triglicerídeos e ureia. Foram utilizados os kits de reagentes da Bioclin específicos para cada um dos compostos.

3.4.7. Extração e Análise dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs)

Após a coleta de fezes nos três momentos do experimento (D0, D45 e D90), as amostras que haviam sido armazenadas a -80°C foram retiradas e iniciou-se o processamento para análise de AGCCs. A partir deste momento, foram repetidas as mesmas etapas previamente descritas no processamento *in vitro*.

3.4.8. Análise de microrganismos de interesse por qPCR

Assim como para análises de AGCCs, as análises da microbiota intestinal foram feitas da mesma maneira como descrita na sessão *in vitro*, sendo elas referentes aos três momentos do experimento, D0, D45 e D90. Foram feitas análises das mesmas bactérias presentes na Tabela 1.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DO RESÍDUO DE CAFÉ

4.1.1. Perfil de Fibras Alimentares

O resíduo do café possui uma constituição de fibras dietéticas de 38,81% de sua composição, ilustrado na Tabela 2. Desse valor, 36,9% faz referência às fibras de alto peso molecular, sendo parte delas fibras insolúveis e outra parte fibras solúveis de alto peso molecular, ou seja, fibras que se solubilizam em uma primeira filtração, mas em segunda, precipitam. 1,91% desse valor é referente às fibras solúveis de baixo peso molecular, ou seja, fibras que se mantêm solúveis após vários processos de filtração.

Tipo de Fibra	Resíduo do Café
% Fibra Insolúvel	29,76
% Fibra Solúvel de Alto Peso Molecular	7,14
% Total de Fibras de Alto Peso Molecular	36,9
% Fibra Solúvel de Baixo Peso Molecular	1,91
% Total de Fibras Alimentares	38,81

Tabela 2. Determinação das fibras dietéticas do resíduo do café segundo seu peso molecular.

4.1.2. Quantificação de Polifenóis

A Tabela 3 indica a porcentagem de polifenóis do resíduo do café. O produto possui 4,44 mg/ml de compostos polifenólicos em sua composição, que representa 0,44% de sua constituição.

Produto	Porcentagem de Polifenóis (%)
Resíduo do Café	0,44

Tabela 3. Porcentagem de polifenóis no resíduo de café.

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A Tabela 4 indica a concentração necessária para reduzir 50% da atividade antioxidante do DPPH (EC₅₀). Requer-se 57,27 mg/ml da solução de resíduo do café para inibir 50% de DPPH.

Produto	EC50
Resíduo do Café	57,27 mg/mL

Tabela 4. Concentração necessária do resíduo do café para reduzir 50% da atividade antioxidante (DPPH).

4.3. FERMENTAÇÕES *IN VITRO*

4.3.1. Análise de AGCCs (*IN VITRO*)

Em relação ao comportamento da produção de AGCCs na fermentação *in vitro*, o produto de interesse (Café) demonstrou resultados positivos, especialmente quando aplicado em sua maior concentração, 100mg/ml.

Para a produção de acetato (Figura 1), foi notado aumento significativo no grupo Ca100 (Café 100mg/ml), quando comparado com o grupo Controle e I30 (Inulina 30mg/ml). Além disso, o grupo Ca100 também diferiu do grupo NF (Não Fermentado). Os demais grupos não apresentaram significância em seus resultados.

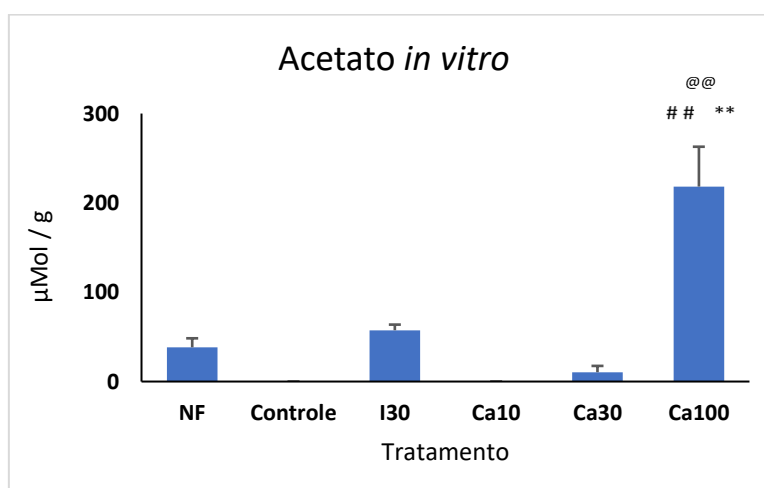


Figura 1. Concentração de acetato após processo de fermentação com Inulina 30 mg/ml (I30), e Café 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100, respectivamente). ** $p < 0,01$ vs Controle; ## $p < 0,01$ vs I30; @@ $p < 0,01$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para o perfil da produção de propionato (Figura 2), notou-se que tanto os grupos I30 quanto Ca100 foram significativamente superiores ao grupo Controle. O grupo Ca100 apresentou níveis ainda superiores aos de I30. Ca100 também apresentou aumento significativo em relação a NF.

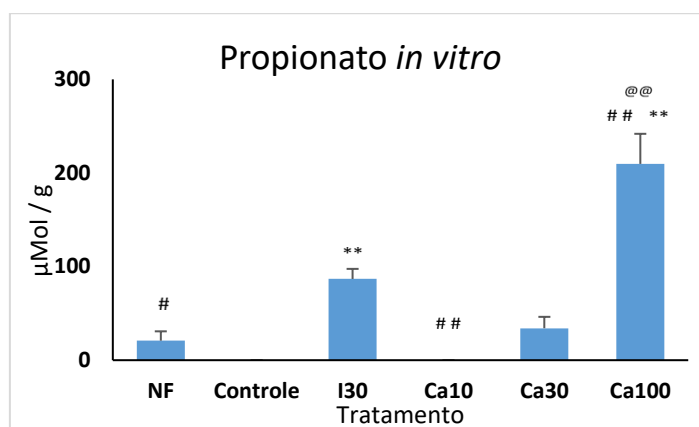


Figura 2. Concentração de propionato após processo de fermentação com Inulina 30 mg/ml (I30), e Café 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100, respectivamente). ** $p < 0,01$ vs Controle; ## $p < 0,01$ vs I30; # $p < 0,05$ vs I30; @@ $p < 0,01$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Em relação a produção de butirato (Figura 3), o grupo Ca100 e I30 apresentaram significância em seus resultados quando comparados com o grupo Controle e NF. No entanto, não houve diferença estatística de Ca100 com I30. Os demais grupos, NF, Ca10 e Ca30 apresentaram resultados significativamente inferiores à I30.

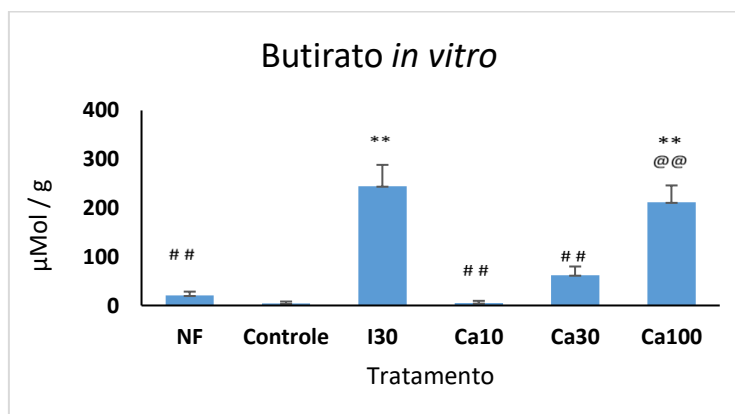


Figura 3. Concentração de butirato após processo de fermentação com Inulina 30 mg/ml (I30), e Café 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100, respectivamente). ** $p < 0,01$ vs Controle; ## $p < 0,01$ vs I30; @@ $p < 0,01$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Por fim, a produção total de AGCCs no processo de fermentação *in vitro*, ou seja, a somatória de acetato, propionato e butirato (Figura 4), o grupo Ca100 foi o grupo de maior produção. Apresentou-se significativamente superior ao grupo Controle, I30 e NF. O café nas demais concentrações, 10 e 30 mg/ml, apresentaram diferença do grupo I30, com a produção inferior. O grupo NF também apresentou diferença de I30, e o grupo I30 apresentou resultados superiores quando comparado ao Controle.

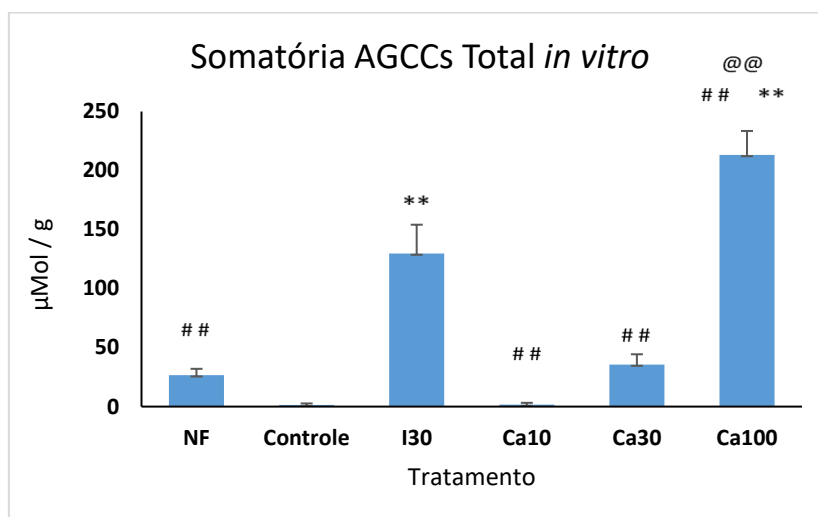


Figura 4. Concentração dos três AGCCs após processo de fermentação com Inulina 30 mg/ml (I30), e Café 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100, respectivamente). ** $p < 0,01$ vs Controle; ## $p < 0,01$ vs I30; @@ $p < 0,01$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

4.3.2. Análise de microrganismos de interesse por qPCR (*IN VITRO*)

Foi realizada análise do comportamento de doze bactérias da microbiota intestinal após o processo de fermentação *in vitro*, das quais seis delas apresentaram algum tipo de significância em seus resultados.

Em relação ao comportamento de *Akkermansia muciniphila* (Figura 5), o grupo I30 e NF apresentaram valores significativamente inferiores, em comparação com o

grupo Controle. Quanto aos demais grupos, o grupo Controle e Ca10 apresentaram níveis similares da bactéria, e Ca30 e Ca100 níveis mais baixos.

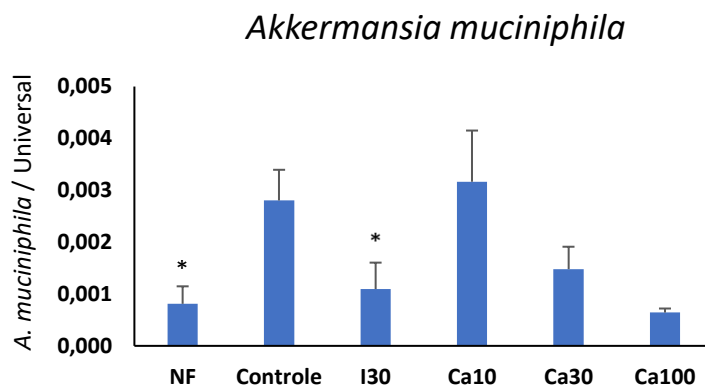


Figura 5: Padrão de *A. muciniphila* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). * $p < 0,05$ vs Controle. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Resultado interessante foi apresentado para *Bifidobacterium adolescentis* (Figura 6), em que o grupo Ca100 apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo Controle, I30 e NF. Os demais grupos não apresentaram nenhuma outra significância.

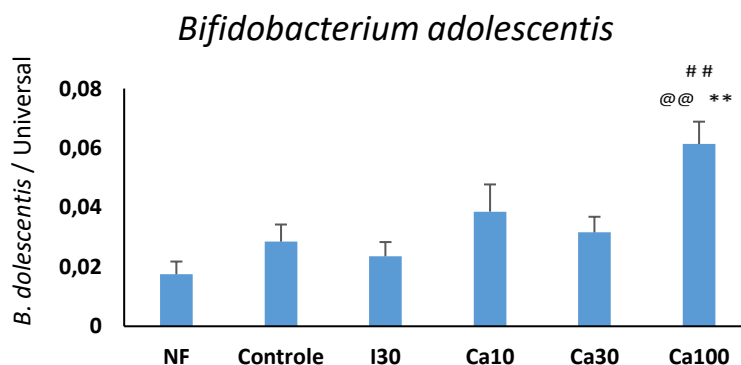


Figura 6: Padrão de *B. adolescentis* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). ** $p < 0,01$ vs Controle; ## $p < 0,01$ vs I30; @@ $p < 0,01$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Tanto *Faecalibacterium prausnitzii* (Figura 7), quanto *Lactobacillus rhamnosus* (Figura 8) e *Roseburia inulinivorans* (Figura 9) apresentaram aumento significativo para

o grupo Ca10. *F. prausnitzii* e *R. inulinivorans* apresentaram aumento no grupo Ca10 quando comparado ao grupo I30, enquanto *L. rhamnosus* apresentou aumento no grupo Ca10 quando comparado com NF. Para as três bactérias, não foi reportada diferença estatística em relação aos outros grupos.

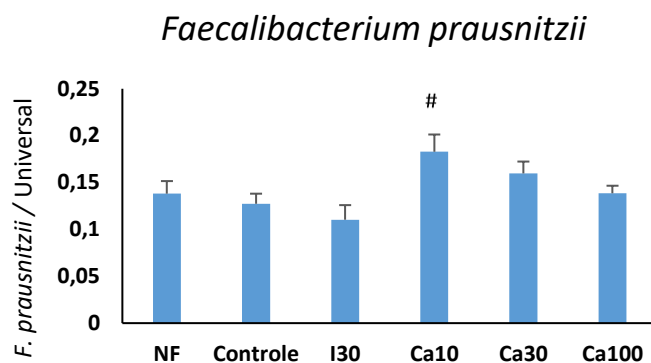


Figura 7: Padrão de *F. prausnitzii* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). # $p < 0,05$ vs I30. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

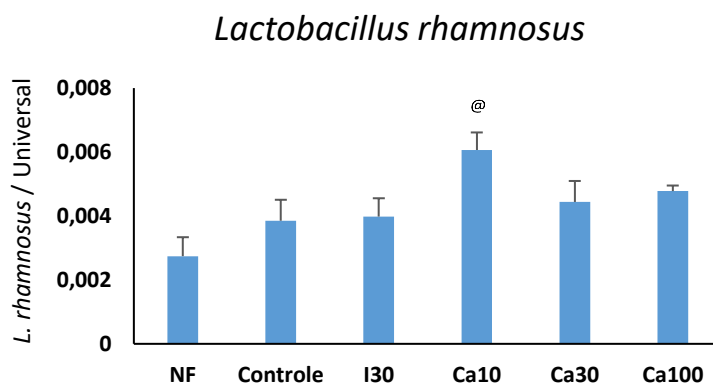


Figura 8: Padrão de *L. rhamnosus* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). @ $p < 0,05$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

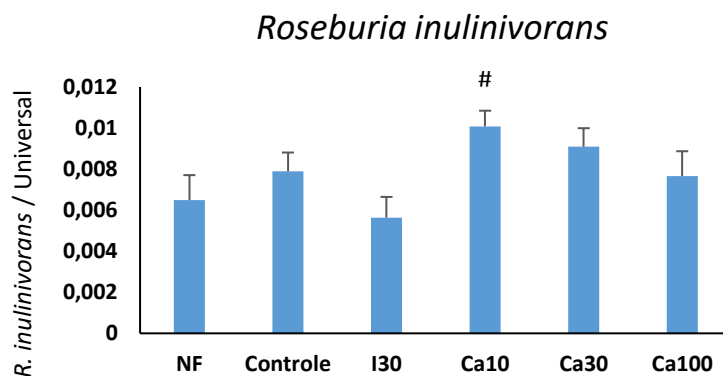


Figura 9: Padrão de *R. inulinivorans* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). # $p < 0,05$ vs I30. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para *Roseburia intestinalis* (Figura 10), a população da bactéria se manteve com níveis muito parecidos para todos os grupos, com exceção do grupo NF, que teve a população aumentada. O grupo Ca100 e NF diferiram do Controle, enquanto todos os grupos diferiram significativamente de NF.

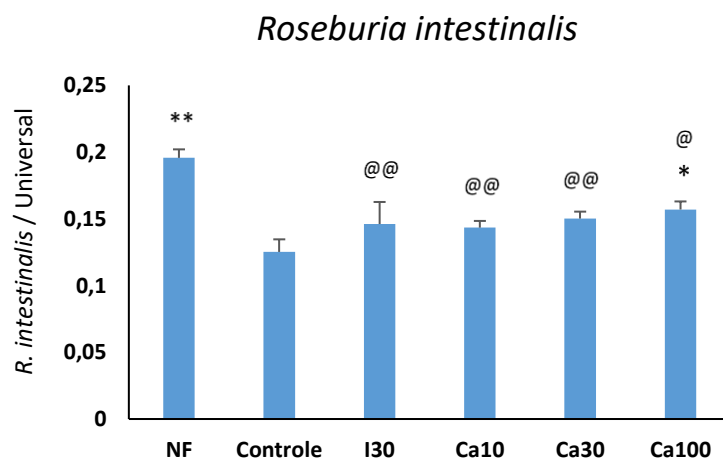


Figura 10: Padrão de *R. intestinalis* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). ** $p < 0,01$ vs Controle; * $p < 0,05$ vs Controle; @@ $p < 0,01$ vs NF (não fermentado); @ $p < 0,05$ vs NF (não fermentado). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para as demais espécies de bactérias, ou seja, *B. longum*, *E. coli*, *L. agilis*, *L. gasseri*, *L. salivarius* e *R. faecis*, não foi reportada diferença significativa no padrão da

bactéria após a fermentação *in vitro*. As bactérias abaixo não apresentaram resultados significativos.

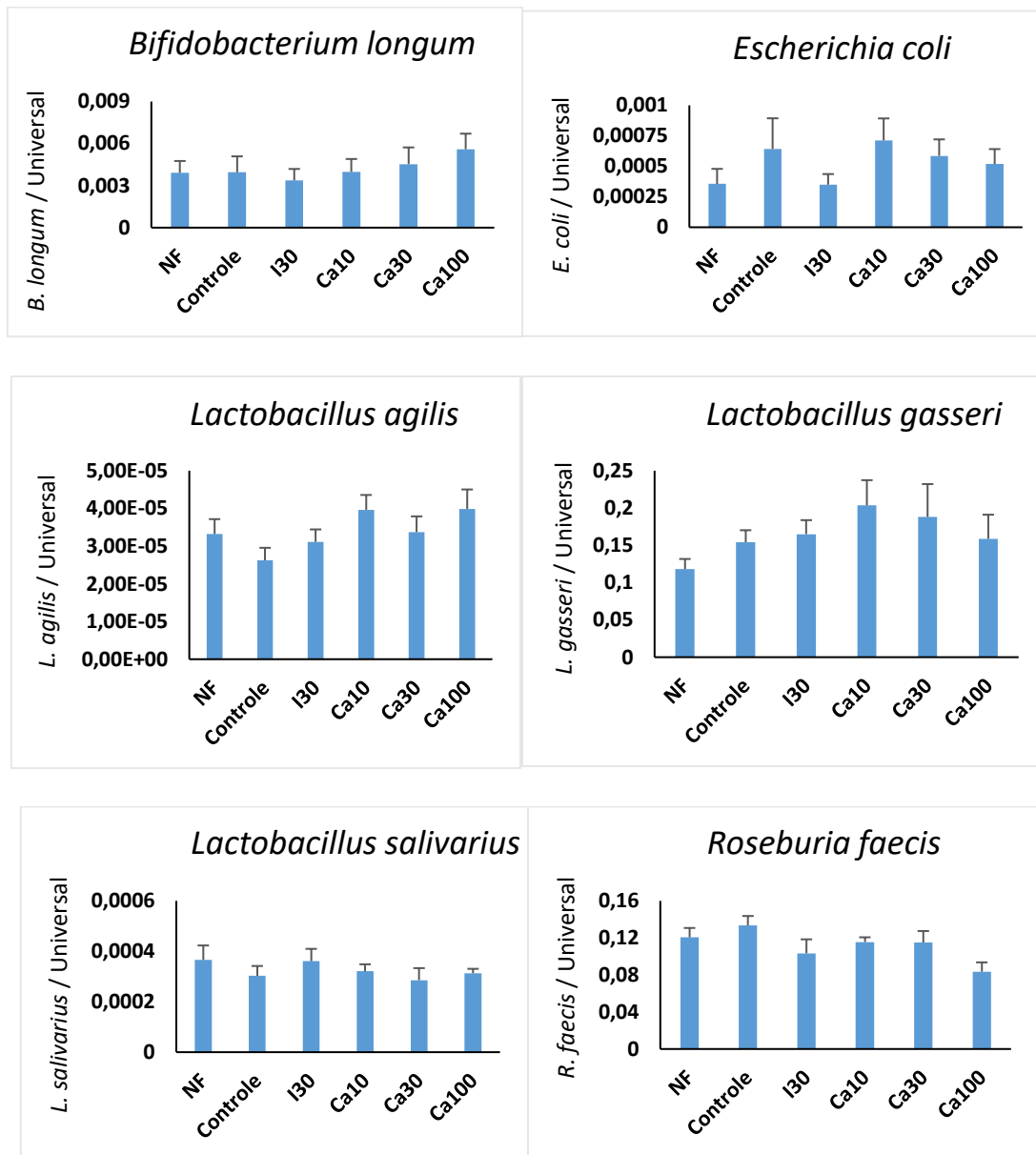


Figura 11: Padrão de *B. longum*, *E. coli*, *L. agilis*, *L. gasseri*, *L. salivarius* e *R. faecis* após processo de fermentação com Inulina na concentração de 30 mg/ml (I30), e com o resíduo de café arábica nas concentrações 10, 30 e 100 mg/ml (Ca10, Ca30 e Ca100). ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

4.3. EXPERIMENTO *IN VIVO*

4.4.1. Consumo de Ração Semanal

O consumo de ração por caixa foi medido semanalmente, e uma média simples foi calculada com base na quantidade de animais presentes em determinada caixa. Foram realizadas análises estatísticas através de teste de t não pareado, dia por dia, comparando ambos os tratamentos. A curva de consumo está ilustrada na Figura 12. A significância dos resultados está pontuada no gráfico, em que foi comparada o mesmo dia entre os grupos. O grupo Café teve um padrão de consumo superior ao grupo Controle, com a média experimental sendo 32,46g por semana, em comparação com 29,41g, respectivamente.

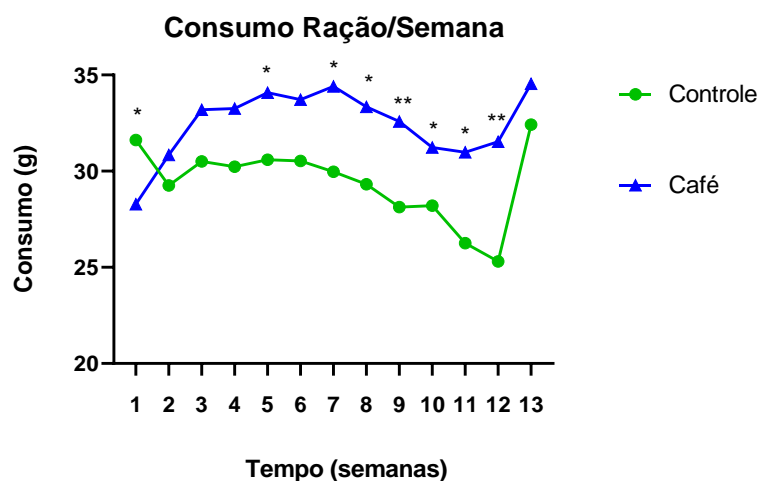


Figura 12: Curva de consumo semanal de ambos os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, em teste t não pareado.

4.4.2. Evolução Ponderal

Foi avaliada a relação entre peso final e inicial dos animais, ou seja, o peso adquirido pelos animais submetidos aos dois tipos de alimentação durante o tratamento (Figura 13). O ganho de peso dos animais de ambos os grupos se deu de forma muito parecida, assim como a diferença entre o peso inicial e final dos animais. Não foi identificada nenhuma diferença estatística entre os grupos, quando comparados os mesmos dias.

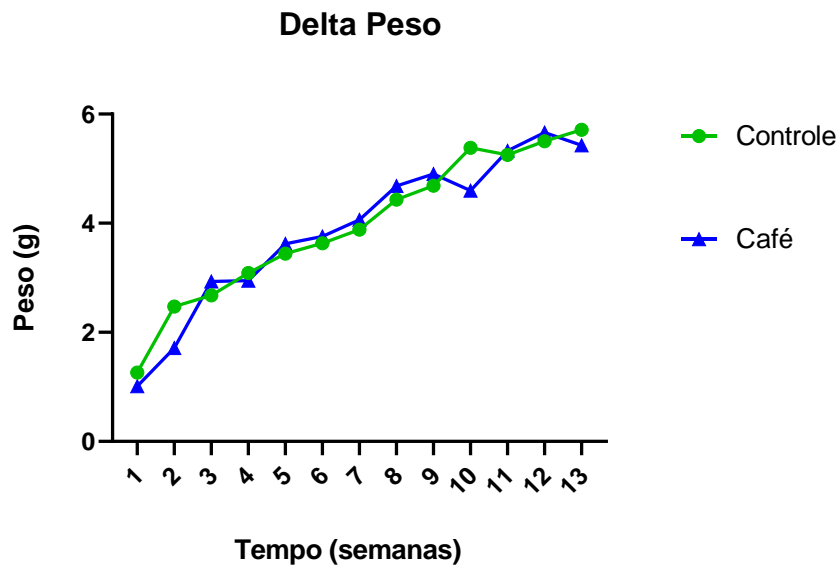


Figura 13: Evolução ponderal entre os dois grupos de tratamento durante o experimento.

4.4.3. Análise de Órgãos

Os órgãos dos animais de cada um dos grupos foram coletados manualmente e pesados. Foi realizada uma relação entre o peso do órgão em função do peso corporal do animal específico, e uma média simples foi calculada. Não foi identificada diferença estatística significativa para nenhum órgão de nenhum dos tratamentos. A pesagem dos órgãos resultou de forma muito parecida para os dois grupos (Tabela 5).

	Controle	Café
Baço (mg)	3,24 ± 0,2	3,35 ± 0,2
Cérebro (mg)	15,1 ± 0,8	15,07 ± 0,4
Coração (mg)	5,85 ± 0,6	5,7 ± 0,3
Estômago (mg)	8,5 ± 1,3	8,3 ± 0,5
Fígado (mg)	60,8 ± 2,4	62,4 ± 1,9
Intestino (mg)	10,36 ± 0,7	12,1 ± 0,5
Pulmão (mg)	8,2 ± 0,4	7,6 ± 0,6
Rins (mg)	12,7 ± 0,2	12,4 ± 0,8
Testículos (mg)	7,9 ± 0,5	8,9 ± 0,5

Tabela 5. Valores referentes à média da relação do órgão em função do peso corporal dos animais.

4.4.4. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos do Sangue

As dosagens dos parâmetros bioquímicos indicam segurança em relação à toxicidade do produto testado, uma vez que não houve diferença estatística para os marcadores, entre o grupo Controle e Café (Tabela 6). Com exceção, apenas, de HDL no grupo Café, que indicou níveis significativamente inferiores quando comparado com o grupo Controle. Portanto, para os demais marcadores, ou seja, ALT, albumina, AST, colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, LDL, proteínas totais, triglicerídeos e ureia, não foi relatada diferença significativa entre os grupos.

	Controle	Café
ALT (UI/L)	47,85 ± 5,2	79,33 ± 15,9
Albumina (g/dL)	2,01 ± 0,1	1,99 ± 0,2
AST (UI/L)	83,3 ± 12,6	139,2 ± 40,1
Colesterol Total (mg/dL)	101,85 ± 3,3	100,32 ± 3,4
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,1	0,25 ± 0,6
Fosfatase Alcalina (UI/L)	82,14 ± 15,1	115,5 ± 12,3
Glicose (mg/dL)	302,7 ± 19,0	296,2 ± 27,2
HDL (mg/dL)	73,6 ± 1,6	61,8 ± 4,5 *
LDL (mg/dL)	8,14 ± 0,6	10,87 ± 1,7
Proteínas Totais (g/dL)	4,99 ± 0,2	5,3 ± 0,5
Triglicerídeos (mg/dL)	81,83 ± 8,3	76,4 ± 5,9
Uréia (mg/dL)	70,5 ± 3,1	65,2 ± 1,8

Tabela 6. Valores referentes aos parâmetros bioquímicos presentes no sangue dos animais. * p < 0,05 vs Controle, em teste t não pareado.

4.4.5. Análise de AGCCs (*IN VIVO*)

Os resultados obtidos da produção de AGCCs *in vivo* durante o tratamento não demonstraram grandes modulações. O nível dos três AGCCs se comportou de forma parecida em ambos os grupos.

Quanto à produção de acetato (Figura 14), o grupo Café registrou níveis pouco mais altos que o grupo Controle, porém, sem significância. Enquanto no grupo Controle houve uma oscilação na produção de acetato entre os três momentos do experimento, para o grupo Café os níveis se mantiveram mais estáveis entre si. Em ambos os grupos, a quantidade de acetato presente nas fezes decresceu ao longo do experimento, mesmo que em baixas quantidades. É importante ressaltar também, que a concentração inicial de acetato, ao início do experimento, diferiu entre os dois grupos, sendo o grupo Controle pouco superior ao Café. Sendo assim, a queda entre o dia 0 e 45 no Controle, foi superior ao grupo Café.

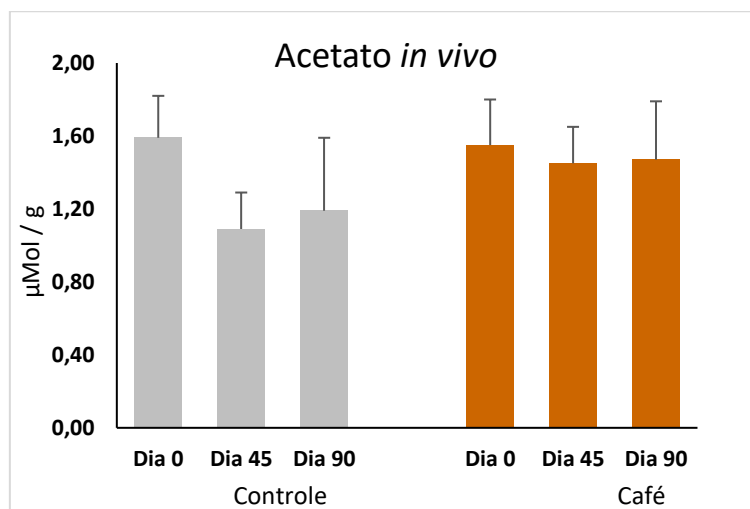


Figura 14. Concentração de acetato nos dias 0 (D0), 45 (D45) e 90 (D90) nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para o comportamento do propionato (Figura 15), ambos os grupos apresentam perfil semelhante. Nos dois grupos houve uma queda na concentração de acetato entre o Dia 0 e 45. Quando comparados no Dia 45, o grupo Controle e Café, houve diferença estatística, sendo que o grupo Café apresentou maiores concentrações de propionato. Não houve demais diferenças estatísticas entre a concentração de propionato

comparando um mesmo grupo, tampouco entre mesmo dia de grupos diferentes. Portanto, Café e Controle não têm diferença estatística interna entre os dias 0, 45 e 90 do experimento.

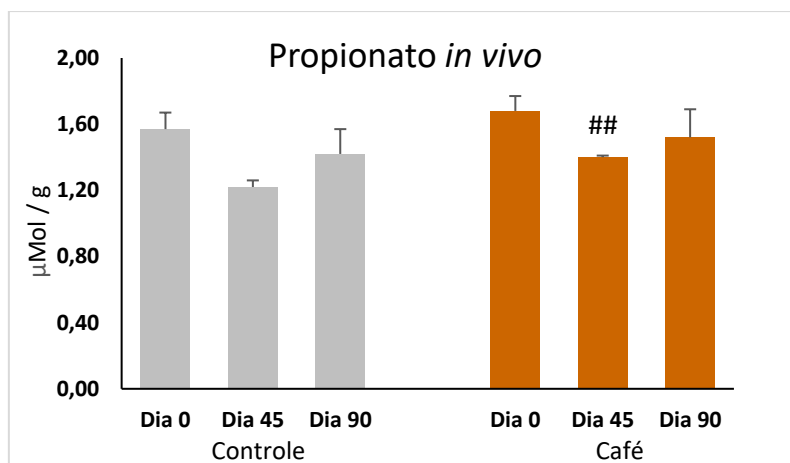


Figura 15. Concentração de propionato nos dias 0 (D0), 45 (D45) e 90 (D90) nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ## $p < 0,01$ vs mesmo dia do grupo Controle. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Tratando-se da concentração produzida de butirato (Figura 16), o padrão entre os diferentes dias ocorreu de maneira semelhante entre os dois grupos. Em ambos os grupos, o nível inicial de butirato estava alto, quando no dia 45 sofreu uma queda, e ao dia 90 a concentração voltou a subir, porém sem retornar ao patamar inicial. Para o grupo Controle, houve diferença estatística entre os dias 0 e 45, sendo o dia 0 superior na concentração de ácido butírico. Da mesma maneira, o grupo Café tampouco apresentou diferença estatística entre os dias de seu tratamento. No entanto, foi reportada diferença significativa no dia 45 entre o grupo Café e Controle, sendo o do Café superior.

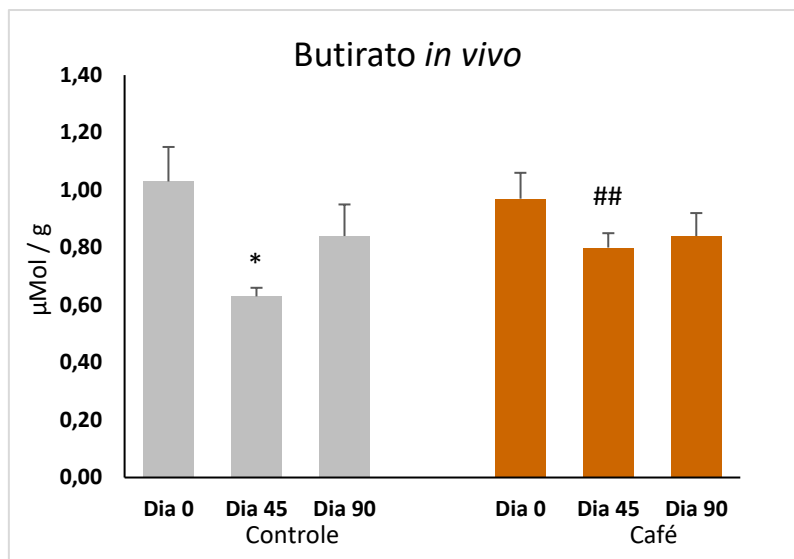


Figura 16. Concentração de butirato nos dias 0 (D0), 45 (D45) e 90 (D90) nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ## $p < 0,01$ vs mesmo dia do grupo Controle; * $p < 0,05$, vs D0 intragrupo. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Quando somados os três AGCCs, foi calculada a concentração de AGCCs totais (Figura 17). Ambos os grupos, mais uma vez, possuem perfil parecido na síntese de AGCCs ao longo do experimento. Dia 0 apresentou o maior pico de concentração de AGCCs, em seguida houve uma queda no dia 45 e uma ascensão novamente ao dia 90. Não foi reportada significância na diferença entre os dias nos diferentes tratamentos, no entanto, o grupo Café apresentou ligeiro aumento nos dias 45 e 90, quando comparados em relação ao Controle, mas sem significância estatística.

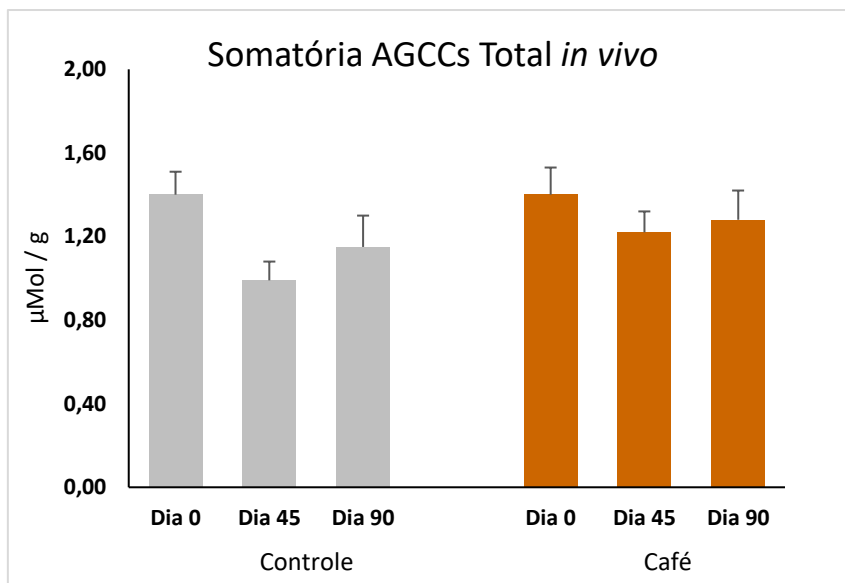


Figura 17. Concentração da somatória de AGCCs (acetato, propionato, butirato) nos dias 0 (D0), 45 (D45) e 90 (D90) nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

4.4.6. Análise de microrganismos de interesse por qPCR (*IN VIVO*)

Foi investigada a presença e comportamento das mesmas doze espécies de bactérias das fezes dos camundongos ao longo de 90 dias de experimento. Três medições foram feitas, uma ao início, ao meio e ao fim do tratamento, denominados também como dia 0, 45 e 90. No entanto, os gráficos demonstram a porcentagem das bactérias em relação ao D0, considerado como 100%, indicado no gráfico pela linha tracejada. Ou seja, a ascensão ou queda da população da bactéria fora medida de acordo com o dia inicial de determinada bactéria analisada.

Primeiramente, para a análise de *Akkermansia muciniphila* (Figura 18) não foi demonstrada diferença significativa nos dias D45 e D90 em ambos os grupos experimentais.

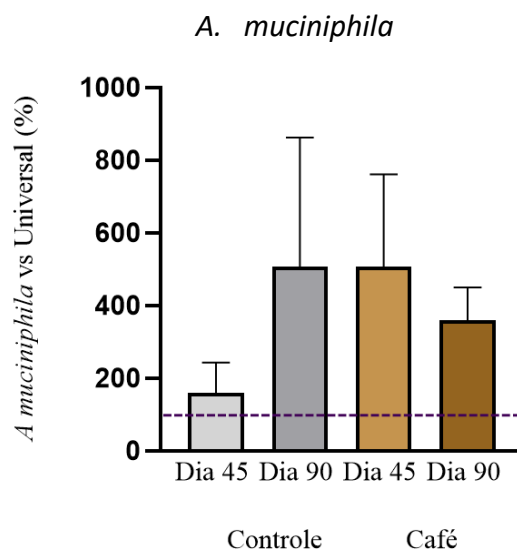


Figura 18: Porcentagem de *A. muciniphila* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para a expressão de *B. adolescentis* (Figura 19), o grupo Controle apresentou uma redução significativa da população da bactéria quando comparado ao início do experimento. Por outro lado, para o grupo Café observou-se um aumento da relação da bactéria ao longo do tratamento, embora não haja significância entre os dias 45 e 90, com o dia 0. No entanto, o dia 90 do grupo Café é significativamente superior ao dia 90 do Controle.

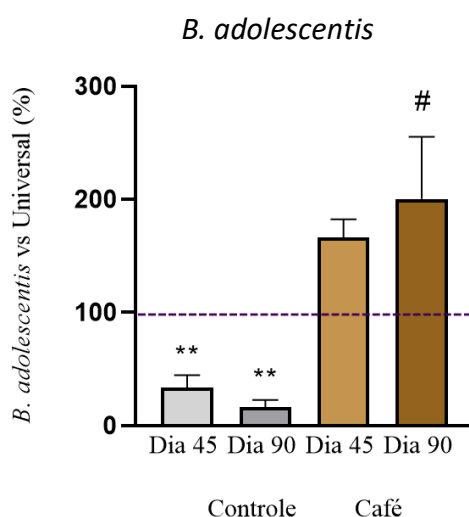


Figura 19: Porcentagem de *B. adolescentis* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** $p < 0,01$ vs D0 intragrupo; # $p < 0,05$ vs mesmo dia do grupo Controle. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para a bactéria *B. longum* (Figura 20) houve redução significativa de ambas as medições do tratamento, em relação ao D0 em ambos os grupos, sem diferença significativa entre os grupos. Os dias 90 de ambos os grupos são significativa e consideravelmente inferiores ao dia 0.

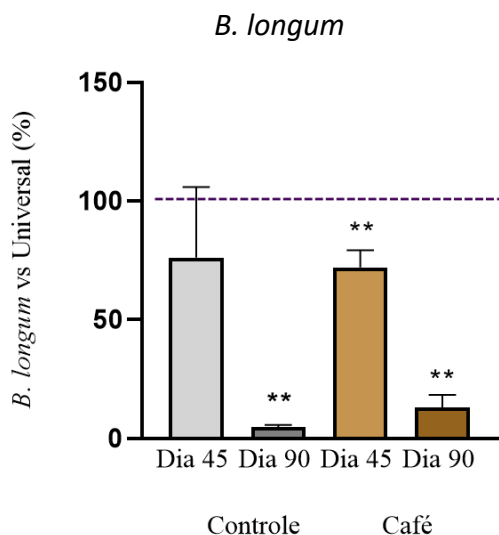


Figura 20. Porcentagem de *B. longum* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** $p < 0,01$ vs D0 intragrupo. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Os estudos com a bactéria patogênica *E. coli* (Figura 21) também mostram que ocorreu uma redução significativa de sua expressão em ambos os grupos experimentais quando comparados ao início do tratamento, porém, sem diferença significativa entre os dois grupos. O fim do experimento para ambos os grupos atinge números muito baixos, e em especial ao grupo Café, os níveis chegam próximo a zero.

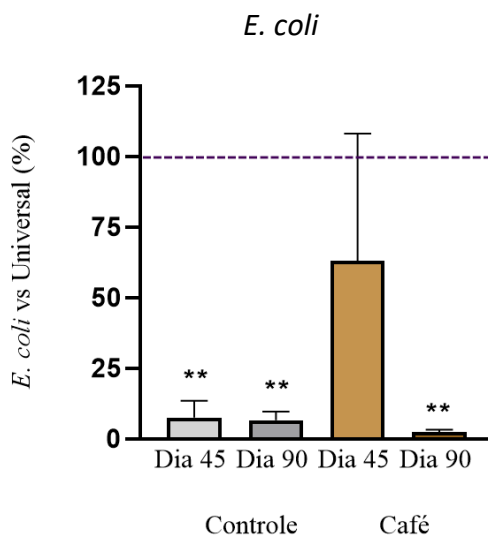


Figura 21: Porcentagem de *E. coli* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** p < 0,01 vs D0 intragrupo. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Já para a análise de *Faecalibacterium prausnitzii* (Figura 22), o grupo Controle teve sua população reduzida em relação ao D0, sendo esta redução significativa ao dia 90 do experimento, enquanto que para o tratamento com o café também apresentou mesmo comportamento em relação ao início do experimento. No entanto, para o grupo Café a redução foi menor no dia 45, quando comparada ao dia 45 do Controle.

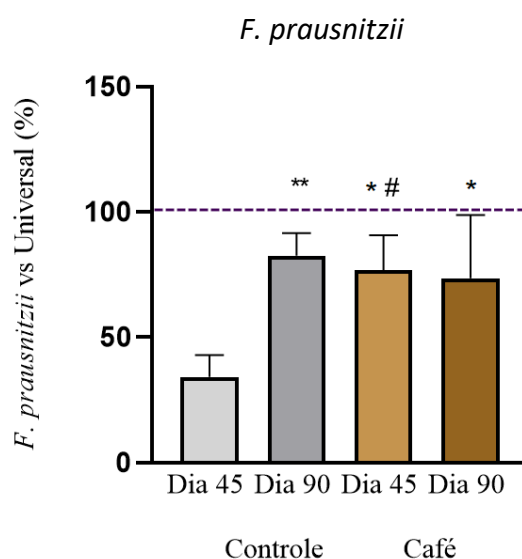


Figura 22: Porcentagem de *F. prausnitzii* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** p < 0,01 vs D0 intragrupo; * p < 0,05 vs D0 intragrupo; # p < 0,05 vs mesmo dia do grupo Controle. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para as análises do gênero *Lactobacillus*, a expressão de *L. agilis* também foi reduzida significativamente em ambos grupos experimentais quanto ao seu respectivo D0, sem diferença significativa entre os grupos nos diferentes dias de tratamento (Figura 23). Para *L. gasseri* (Figura 24), o tratamento com o café aumentou considerável e significativamente no dia 90, quando comparado ao dia 0, assim como quando comparado com o dia 90 do grupo Controle.

Especificamente sobre *L. rhamnonus*, o tratamento com *Coffea arabica* não foi capaz de alterar significativamente a expressão da bactéria, tanto comparado com D0 quando comparado com o grupo Controle (Figura 25). Além disso, o tratamento com o

café não foi capaz de alterar significativamente a expressão de *L. salivarius* tanto comparado com D0 quando comparado com o grupo Controle, embora visualmente o grupo Café tenha demonstrado aumento nos níveis da bactéria em comparação com o início do experimento (Figura 26).

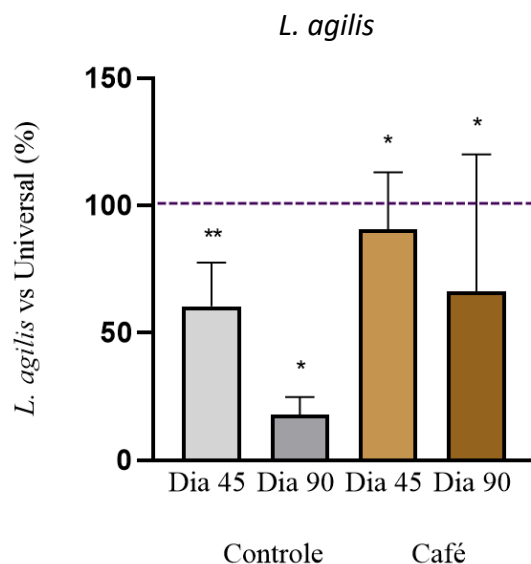


Figura 23. Porcentagem de *L. agilis* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** $p < 0,01$ vs D0 intragrupo; * $p < 0,05$ vs D0 intragrupo. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

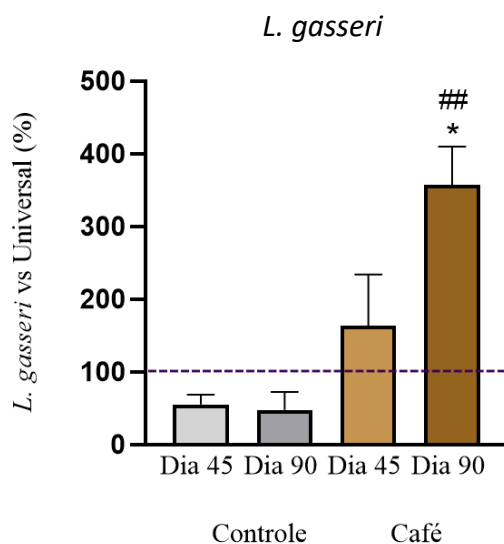


Figura 24. Porcentagem de *L. gasseri* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. * $p < 0,05$ vs D0 intragrupo; ## $p < 0,01$ vs mesmo dia do grupo Controle. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

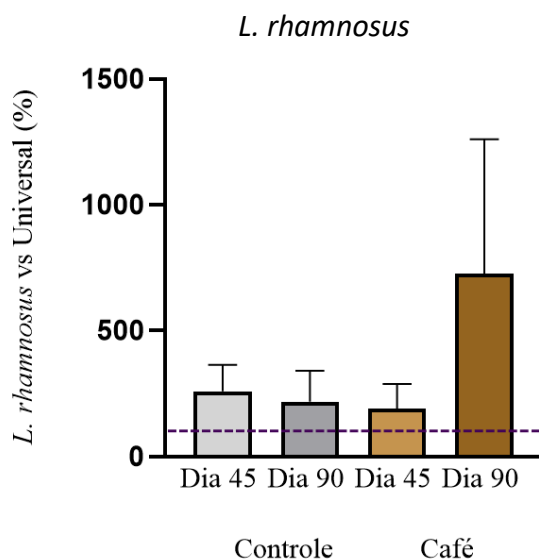


Figura 25. Porcentagem de *L. rhamnosus* dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

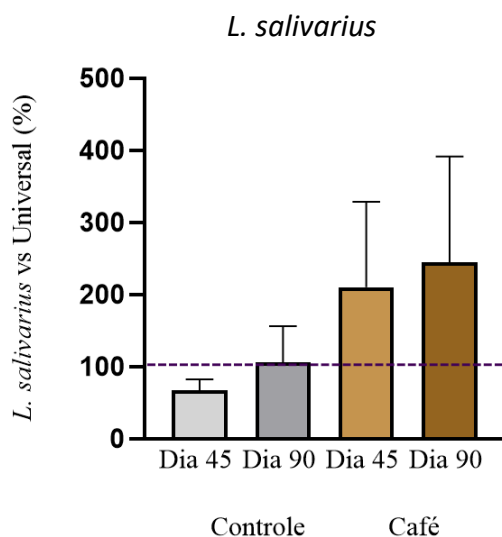


Figura 26. Porcentagem de *L. salivarius* dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para o gênero *Roseburia*, verificou-se que a expressão de *R. faecis* (Figura 27) foi reduzida no grupo Controle ao longo dos 45 e 90 dias e, embora o grupo *Coffea arabica* não tenha afetado de forma significativa a expressão dessa bactéria em relação ao D0, o tratamento evitou a redução detectada no D90 quando comparada ao respectivo D90 do grupo Controle, o qual manteve níveis mais altos da bactéria.

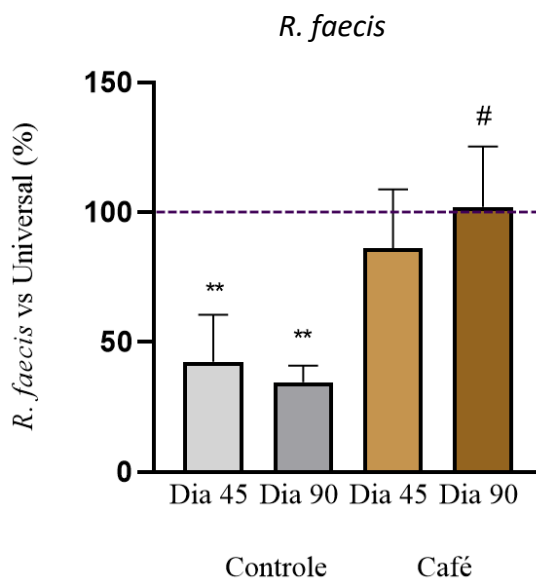


Figura 27. Porcentagem de *R. faecis* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** $p < 0,01$ vs D0 intragrupo; # $p < 0,05$ vs mesmo dia do grupo Controle. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

Para *R. intestinalis* (Figura 28), embora reduzida, não foi detectada diferença significativa da expressão da bactéria no grupo Controle em relação ao D0. No entanto, houve redução significativa da expressão quando os animais foram tratados com *Coffea arabica* quando comparado ao início do tratamento.

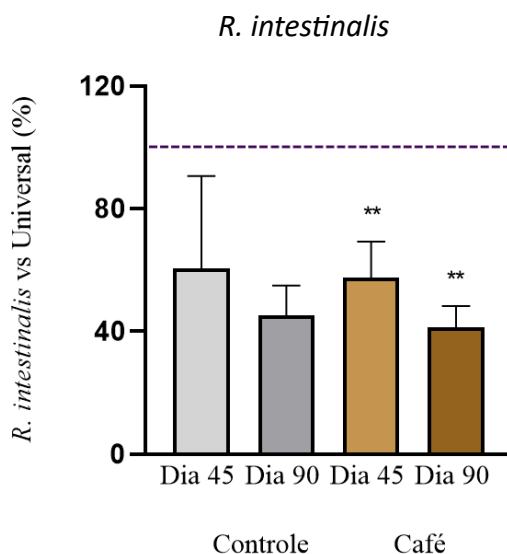


Figura 28. Porcentagem de *R. intestinalis* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. ** $p < 0,01$ vs D0 intragrupo. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

E por fim, o tratamento com o Café reduziu de forma significativa a expressão de *R. inulinivorans* (Figura 29) nos dias 45 e 90 quando comparado ao D0, e não houve diferença significativa para o grupo Controle. Embora o dia 45 do grupo Controle tenha apresentado altos níveis da bactéria, não há significância em seus resultados.

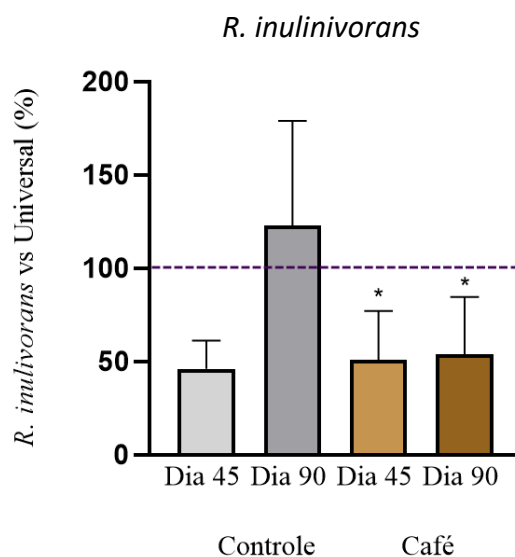


Figura 29. Porcentagem de *R. inulinivorans* nos dias 45 (D45) e 90 (D90) em relação ao dia inicial do experimento, nos animais controle (sem tratamento) e nos animais tratados com dieta enriquecida a 10% de café. * $p < 0,05$ vs D0 intragrupo. ANOVA seguida de teste a posteriori de DUNNETT.

5. DISCUSSÃO

Fibras solúveis e insolúveis são encontradas em diferentes fontes vegetais, como frutas, legumes, sementes, grãos e cereais, em diferentes proporções. A maior parte das fibras insolúveis, como celulose e hemicelulose, quando chegam ao cólon intestinal, tem como função o auxílio da formação do volume fecal, uma vez que não são, ou são muito pouco digeridos pela microbiota intestinal. Já as fibras solúveis atuam de maneira inversa: não contribuem para a formação do bolo fecal, porém atuam diretamente na fermentação das bactérias e na síntese de ácidos graxos de cadeia curta (70). O resíduo do café possui mais de um terço de sua constituição de fibras alimentares (38,81%), das quais a maior parte são fibras insolúveis, que atuam no auxílio da motilidade intestinal. Já as fibras solúveis estão em menor quantidade, cerca de 9%, sendo parte fibras de alto

peso, e parte baixo peso molecular. Sendo assim, é um produto que tem grande potencial para contribuir com a saúde intestinal.

O aproveitamento e utilização das fibras alimentares pelas bactérias da microbiota intestinal, não se dá apenas pelo catabolismo ativo do produto. Algumas bactérias, principalmente dos filos Firmicutes e Actinobacteria, contêm enzimas degradantes de fibras em seus organismos e a fazem ativamente. No entanto, a capacidade enzimática de um organismo não é a única maneira da bactéria de se beneficiar por meio das fibras alimentares, visto que algumas bactérias têm a habilidade de se aderir à cadeia de estrutura, e consumir fragmentos de fibras que foram quebrados por outras bactérias, assim como também podem se aproveitar de metabólitos sintetizados por outras bactérias, a partir do consumo das mesmas (71).

Enquanto a indústria agrícola utiliza estritamente o grão do café, o resíduo constitui a polpa e casca do fruto. Especificamente em relação ao café em grãos moído e consumido por meio da bebida, há inúmeros compostos bioativos em sua constituição, entre eles polifenóis, cafeína, ácido cafeico, ácido clorogênico e melanoidinas (72; 73). Além disso, a bebida em si contém grande quantidade de fibras solúveis, principalmente galactomananas e arabionogalactanas (polissacarídeos) (74).

Estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos evidenciam que a presença de polifenóis em produtos consumidos, podem auxiliar na modulação da microbiota intestinal, por um efeito denominado “prebiotic-like” (75; 76). Essa atividade de mimetização de efeito prebiótico, por parte dos polifenóis, é uma das grandes vantagens do uso funcional dos alimentos. Há evidências de estudos *in vitro* que revelam que flavonoides, como antocianinas, ácidos fenólicos (epicatequinas, cumarinas), polifenóis (ácido cafeico, ácido clorogênico, quercetina) aumentam a abundância de bactérias benéficas para a microbiota intestinal, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e também diminuem a população de bactérias com potencial patogênico, como *E. coli* e *Clostridia* (75 - 77). Resumidamente, ao café consumido como bebida, está evidenciado seu potencial prebiótico, tanto em função da constituição de suas fibras alimentares, quanto pela presença de polifenóis. Segundo análises realizadas neste estudo, o resíduo do café apresenta um baixo teor de polifenóis em sua constituição, cerca de 0,44%, assim como

baixa capacidade antioxidante, da qual necessita-se uma concentração bastante elevada (57,27 mg/ml) para redução de 50% do radical livre DPPH. Sendo assim, em termos de eficiência antioxidante para o produto testado, não se trata de um recurso muito interessante.

Além disso, foi demonstrado que compostos polifenólicos derivados do café interagem com a microbiota intestinal de maneira bidirecional: em que os polifenóis podem modular a microbiota através da capacidade prebiotic-like (78), assim como podem também ser catabolizados por bactérias da microbiota, e serem convertidos em uma variedade de compostos antioxidantes, com maior potência que os compostos de origem, como é o exemplo da quebra do ácido clorogênico presente no café, que gera ácido cafeico, ferúlico e ácido p-cumárico, com capacidades antioxidantes e anticarcinogênicas (79).

No modelo de experimentação *in vitro*, o consumo do resíduo do café mostrou-se muito efetivo no que tange a produção de metabólitos. A concentração de 100 mg/ml demonstrou ser bom recurso ao aumentar a produção de acetato, propionato e butirato, inclusive em proporções maiores que àquela promovida pela inulina.

O café em sua maior concentração, foi diferente dos grupos Controle e do Não Fermentado na produção dos três AGCCs. O grupo Controle reproduz cenário em que houve fermentação, porém sem substrato além do conteúdo presente nas fezes, isto é, assume-se que o Café 100 estimulou ainda mais a capacidade de síntese dos metabólitos quando comparado o basal, com e sem o processo fermentativo. As comparações feitas com o grupo Inulina 30 mg/ml são importantes para demonstrar quantitativamente o efeito do Café 100, em relação ao padrão referência de atividade prebiótica largamente utilizado. O produto é referência por estar principalmente atrelado ao aumento de butirato e de bactérias butirogênicas (80). Dessa forma, o resultado obtido acerca da produção de butirato, mostra-se muito interessante e revela o potencial prebiótico do resíduo do café na concentração 100 mg/ml. Ponto que revela a capacidade prebiótica do Café 100, é a ausência de diferença significativa com Inulina, o que indica que estatisticamente, ambos os grupos não diferem para a produção de butirato. A somatória de AGCCs totais revela a produção dos três metabólitos juntos, que

indiscutivelmente, atinge seu maior patamar com a fermentação realizada com resíduo de café na concentração de 100 mg/ml.

O aumento na síntese de AGCCs ocorre devido ao aumento na efetividade de produção por parte da microbiota intestinal, assim como pelo próprio aumento da população em si, visto que o processo fermentativo com o Café modulou positivamente algumas bactérias. Além dos resultados *in vitro*, este efeito também foi identificado nos estudos *in vivo*, em que o grupo Café aumentou a população de *B. adolescentis* após 45 e 90 dias de tratamento dos animais. O gênero *Bifidobacterium* é produtor de acetato e lactato (81). De acordo com os resultados obtidos *in vitro*, com o aumento da bactéria no tratamento com Café 100 mg/ml, pode-se dizer que houve participação da bactéria, concomitantemente para maiores concentrações de acetato. Embora esteja reportado que a inulina está associada tanto à produção de butirato, quanto às bactérias *F. prausnitzii* e *B. adolescentis* (80), nossos resultados não corroboram com o referido. Para a população de *F. prausnitzii*, o Café 10 obteve os maiores resultados, sendo superior estatisticamente à inulina. Tampouco para *B. adolescentis*, em que a relação da bactéria é superior no grupo Ca100, enquanto para o grupo I30 não apresenta aumento e inclusive, demonstrou-se inferior ao Controle.

Os experimentos *in vitro* e *in vivo* se complementam sob perspectivas diferentes. A experimentação animal abrange características sistêmicas e interações que o experimento *in vitro* não é capaz de englobar. Dessa forma, os estudos *in vivo* realizados com camundongos C57Bl/6 apresentam resultados diferentes, porém complementares. Enquanto nos estudos de fermentação *in vitro*, o café foi capaz de aumentar significativamente a produção dos AGCCs de forma superior a inulina para acetato, propionato e ácidos graxos totais e similar à da inulina na produção de butirato, no ensaio *in vivo*, o café afetou a produção do propionato e butirato no D45 quando comparado ao controle, sem efeitos sobre a produção de acetato e ácidos graxos totais em nenhum dos dias de avaliação. Esta diferença pode ser relacionada ao fato de que nos estudos *in vitro*, o produto está em contato direto com a microbiota intestinal podendo ser diretamente utilizado como substrato, enquanto que nos estudos *in vivo* esta disponibilidade pode estar reduzida por mecanismos farmacocinéticos envolvidos no trânsito do produto, da cavidade oral até a região do intestino onde reside a maioria da microbiota intestinal.

As análises referentes ao consumo alimentar e evolução ponderal, assim como os dados da análise bioquímica do sangue e o peso dos órgãos dos animais, indicam que quando comparado o produto de interesse com o grupo Controle, há uma segurança e confiabilidade para o consumo do resíduo do café. Principalmente parâmetros que avaliam a função renal e hepática, ao apresentarem-se iguais estatisticamente entre os grupos, assume-se a ausência de toxicidade e assegura sua utilização.

Além destes aspectos, as moléculas de AGCCs, além de serem compostos extremamente voláteis, têm meia-vida curta pois são rapidamente metabolizadas no organismo (68). As concentrações de AGCCs presentes no intestino grosso dependem da qualidade da microbiota intestinal, hábito alimentar, frequência do trânsito intestinal e da interação metabólica entre o hospedeiro e sua microbiota (68). Da mesma forma, a concentração dos metabólitos decresce de acordo com a localidade do trato gastrointestinal, sendo o ceco intestinal onde há maior gradiente, seguido do cólon proximal em geral, e com diminuição no cólon distal (82), o que indica que a absorção é realizada no caminho anatômico intestinal. Além disso, a extensa maioria desses metabólitos (>95%) é oxidada e absorvida por células da mucosa do intestino grosso (colonócitos) e segue para a corrente sistêmica (50). Uma pesquisa realizada com indivíduos humanos *post mortem* (após 4h), revela que após a absorção, há uma diferença grande na concentração de AGCCs de acordo com o órgão ou região do corpo (84). As concentrações de AGCCs são muito maiores no trato gastrointestinal em comparação a outros tecidos como o sangue periférico, fígado, e também, nas fezes (84).

Como forma de exemplo, o butirato presente no lúmen intestinal é rapidamente absorvido pela mucosa e atinge a corrente sanguínea (85). Para análises feitas através de fezes ou de bolo fecal presente ainda no intestino, não é possível traçar uma relação linear e direta entre a abundância de butirato disponível e as bactérias butirogênica presentes na microbiota deste indivíduo (85), uma vez que há muitas interferências tangenciando a concentração final de AGCCs.

Além disso, outro ponto importante a ser levantado é a relação entre a produção de AGCCs e os horários do dia. Foi demonstrado que tanto o comportamento de certas bactérias da microbiota, quanto a síntese de AGCCs são correlatas com o ciclo circadiano do hospedeiro (86; 87). A produção de acetato, propionato e butirato decresce ao longo

do dia. Estudos realizados *in vivo* (86) revelam que as bactérias se comportam de maneira rítmica, assim como a produção de metabólitos. Kaczmarek et al., 2017 (86) reportou uma queda na concentração de butirato referente a 5 a 12%/hora em estudos com fezes humanas, enquanto Leone et al. (87) uma diminuição de 22%/h de butirato presente no ceco de roedores. Esses números variam de acordo com a análise e tempo de coleta do conteúdo fecal.

A coleta de fezes dos camundongos foi realizada uma vez na semana juntamente ao processo de troca de caixa dos animais. Dessa forma, adiciona-se a variável tempo de exposição dos AGCCs presentes no conteúdo fecal, ao ambiente, o que pode corroborar com uma perda parcial na concentração dos metabólitos, além da dificuldade de registro do momento em que houve a evacuação.

Além do mencionado anteriormente, há um ponto crucial associado às interações microbiológicas dentro do ambiente intestinal. Para a produção de ácidos graxos de cadeia curta, algumas bactérias da microbiota intestinal consomem não somente carboidratos não digeríveis, mas também, metabólitos produzidos por outras bactérias como substrato intermediário, termo denominado “*cross-feeding*” (85). Segundo Smith, 2004 (88), *cross-feeding* é definido como uma interação entre espécies e ou cepas de bactérias, em que moléculas resultantes do metabolismo de uma bactéria são posteriormente utilizadas e metabolizadas por outra espécie de bactéria. Uma interação exemplificando este conceito foi reportada por Belenguer et al., 2006 (89), em que foi observada uma cepa de *Eubacterium hallii* (produtora de butirato) utilizando lactato produzido por *Bifidobacterium adolescentis* em estudo de cocultura *in vitro*.

Embora o acetato seja o AGCC em maior concentração no conteúdo fecal, sabe-se que há bactérias consumidoras que o utilizam como substrato para a síntese de outros metabólitos (89). Consumidores de acetato englobam dois importantes grupos de bactérias butirogênicas presentes na microbiota, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia intestinalis* (90; 91). Já foi demonstrado relação direta entre a produção de butirato a partir de ambas as bactérias citadas e o consumo de acetato (89; 92).

Portanto, somando-se essas possíveis indagações acerca da baixa produção de metabólitos, a potencial modulação da microbiota intestinal pode ser avaliada pela expressão das bactérias intestinais, através de análise de qPCR da microbiota realizada neste estudo.

Embora a produção de AGCCs não tenha sido modulada ao longo do experimento *in vivo*, a população de várias bactérias foi alterada, corroborando que o café é um modulador da microbiota intestinal. O comportamento da microbiota intestinal dos grupos experimentais, Controle e Café, diferiu entre si, indicando o potencial modulador do café.

Em relação à análise de bactérias do experimento *in vivo*, o comportamento da bactéria *Akkermansia Muciniphila*, não demonstrou significância em seus resultados, embora a população tenha crescido ao longo do experimento, em ambos os grupos. A *A. muciniphila* é uma bactéria presente em grande quantidade no intestino, com uma proporção de 1 a 3% da totalidade de células presente no conteúdo fecal (109). O aumento da bactéria traz benefícios para o epitélio gastrointestinal, assim como para o restante da microbiota intestinal por meio da manutenção e preservação da camada de muco. Além disso, é uma bactéria produtora de metabólitos benéficos ao hospedeiro, incluindo o acetato e propionato (110; 111), assim, portanto contribuem positivamente para a concentração de AGCCs presente no ambiente intestinal.

O gênero *Bifidobacterium* compõe o grupo mais abundante de bactérias da microbiota intestinal de adultos humanos (93), sendo o gênero reconhecido por apresentar benefícios ao organismo do hospedeiro, assim como o *Lactobacillus* (47). Neste estudo foram avaliadas duas espécies do gênero: *B. adolescentis* e *B. longum*. Nos ensaios *in vitro*, o café foi capaz de aumentar a população de *B. adolescentis*, sem produzir efeitos na população de *B. longum*, enquanto nos estudos *in vivo*, os efeitos são similares, uma vez que o café aumenta a população de *B. adolescentis*, sem afetar a população de *B. longum*.

Segundo Gibson, 1994 (94), os benefícios atribuídos ao gênero estão entre a síntese de vitaminas do grupo B, proteção contra infecções intestinais, melhora da resposta imune do hospedeiro e, inibição do desenvolvimento de culturas patogênicas através de exclusão competitiva (95).

Está reportado que a população de *Bifidobacterium longum* decresce de acordo com a etariedade do animal (96), que no estudo corrobora seu comportamento. Em ambos os grupos ao dia 90 há uma queda significativa na expressão da bactéria, e isso

indica o avanço da idade dos animais. No entanto, nossos resultados revelam um aumento após a dieta enriquecida com o resíduo do café, especialmente para *B. adolescentis*. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente, em que houve o aumento significativo do gênero bacteriano após o estímulo com fibra prebiótica, entre eles a partir de inulina e fruto oligossacarídeos (47; 97).

Assim como para os estudos *in vitro*, o comportamento de *B. adolescentis* nos estudos *in vivo*, também foi muito interessante para o tratamento com o grupo Café. Além de aumentar a expressão da bactéria nos dois dias medidos, houve um aumento significativo quando comparado o dia 90 entre os dois tratamentos, indicando que o consumo de resíduo do café modulou positivamente a população de *B. adolescentis*.

B. adolescentis é uma bactéria produtora de lactato e acetato (98). Estudos sugerem a capacidade de ação protetora de *Bifidobacterium* contra a *Escherichia coli* O157:H7 entero-hemorrágica através da produção de acetato (99). Além disso, há outras referências que evidenciam uma correlação inversa entre *Bifidobacterium* e bactérias patogênicas, como *Clostridium* e *E. coli*, como observado em Alvaro et al., 2007 (100) e Chen et al., 1999 (101). Nossos resultados seguem de acordo com o referido. Enquanto as bactérias *Bifidobacterium* apresentaram aumento através da modulação com o resíduo do café, a *E. coli* sofreu decréscimo após o início do experimento. Não se sabe a relação direta para a redução da bactéria patogênica, mas a presença de *Bifidobacterium* somada à dieta enriquecida com o resíduo de café corroboram esta informação.

A *Escherichia coli* é uma bactéria amplamente conhecida e reconhecida como patogênica, assim como *Clostridium*. Tratando-se de microbiota intestinal, quando em níveis elevados está muito associada a doenças intestinais como a retocolite ulcerativa (102) e doença de Crohn (103; 104). Nesse sentido, a modulação pela dieta se mostra positiva para os níveis de *E. coli*, à medida que o tratamento com o café mantém baixos os níveis desta bactéria.

Bem como as bactérias previamente citadas, a *Faecalibacterium prausnitzii* é também importante espécie produtora de butirato presente na microbiota intestinal. Seu principal metabólito é o ácido butírico, mas contribui também para a quantidade total de lactato e, em quantidades menores ainda, acetato, piruvato e etanol (105).

Segundo Duncan et al., 2007 (106), em estudos *in vivo* revelam que *F. prausnitzii* faz contribuição menor para a produção de butirato fecal, quando em comparação com *Roseburia spp.* e *Eubacterium spp.* No entanto, evidências sugerem que os três gêneros são os mais abundantes produtores de ácido butírico da microbiota, juntas somam cerca de 7% do total de microrganismos presentes em amostras fecais de indivíduos saudáveis (90). Nosso estudo demonstrou que o café aumentou a população desta bactéria nos estudos *in vitro*, mas diminuiu no estudo *in vivo*, indicando que a ação moduladora do café sobre a população desta bactéria não ocorre no sistema vivo.

Quatro espécies de *Lactobacillus* foram investigadas no estudo: *L. agilis*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*. As bactérias do gênero *Lactobacillus* compõe, juntamente com *Bifidobacterium*, microrganismos benéficos para o organismo do hospedeiro. Entre os efeitos positivos que envolvem o gênero estão a diminuição do pH intestinal e inibição do crescimento excessivo de patógenos, como *Candida*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, e *Escherichia coli* (97). Segundo Panpetch, 2021 (107), as espécies *Lactobacillus* auxiliam também na barreira intestinal promovendo aumento na secreção de muco, semelhante a *A. muciniphila*. O resíduo do café modulou positivamente, principalmente *L. gasseri*, em que o dia 90 do grupo Café foi significativamente superior ao início do tratamento, assim como com o dia 90 do grupo Controle, o que indica que o tratamento com o resíduo do café modulou a expressão de *L. gasseri*. Para *L. agilis*, não houve modulação positiva na expressão da bactéria, e inclusive há uma redução significativa para ambos os grupos. Para as demais bactérias do gênero, nota-se um aumento no grupo Café nos dois dias, porém sem significância.

Como mencionado anteriormente, o gênero *Roseburia* é conhecido como grande produtor de butirato da microbiota (108). As bactérias do gênero analisadas foram *R. intestinalis*, *R. inulinivorans* e *R. faecis*, sendo que o café foi capaz de modular positivamente apenas a população de *R. inulinivorans* nos estudos *in vitro*, em sua menor concentração (Ca 10 mg/ml). Para os estudos *in vivo*, os resultados obtidos para as três bactérias, foram a diminuição a população ao longo do tempo, em ambos os grupos experimentais. Tratando-se especificamente de *R. faecis*, embora o grupo Café não tenha aumentado a expressão da bactéria, o dia 90 do tratamento com o café evitou uma redução detectada no dia 90 do controle, uma vez que foram significativamente

distintos. No entanto, as concentrações de butirato *in vivo* permaneceram estáveis ao longo do tempo, independente destes resultados em queda, corroborando com o referido de que a interação entre a microbiota intestinal e seus metabólitos, é muito vasta, complexa e exige uma compreensão e avaliação de todo o cenário em questão.

6. CONCLUSÃO

Com base nestas considerações, pode-se afirmar que o resíduo do café é um modulador da microbiota intestinal, como evidenciado por sua eficácia em aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta, e a população de algumas bactérias da microbiota intestinal, dentre as quais, algumas são de extrema importância para o ambiente intestinal em geral, como é o caso, principalmente de *Bifidobacterium*. Desta forma, o resíduo do café é um produto promissor para ser usado como alimento funcional e para atuar de forma benéfica em doenças em que a microbiota intestinal desempenha papel fundamental em sua etiologia, sendo um excelente candidato para estudos adicionais de avaliação de sua capacidade farmacológica como agente preventivo e complementar para o tratamento de doenças relacionadas à disbiose intestinal. No entanto, estudos *in vivo* adicionais devem ser realizados, especialmente incluindo o uso do resíduo de café em diferentes formulações farmacêuticas, que possam aumentar sua disponibilidade nas porções finais do trato gastrointestinal, e garantir uma maior produção de ácidos graxos de cadeia curta, como foi observado nos estudos *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gustavsson, Jenny, et al. "Global food losses and food waste." (2011).
2. Coelho, Maria Alice Zarzur, et al. "Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde." (2001).
3. Pintado, Manuela E., José A. Teixeira. "Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado." *Boletim de biotecnologia* 6 (2015): 10-12.

4. Pandey, Ashok, et al. "Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses." *Biochemical Engineering Journal* 6.2 (2000): 153-162.
5. Sumário Executivo do Café. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Política Agrícola, 2024
6. Durán, Carlos AA, et al. "Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida". *Revista Virtual de Química* 9.1 (2017): 107-134.
7. Rocha, Alda do Amaral. "Uma safra de café que ficará na memória". *Valor Econômico*, 2018. Disponível em: <<https://valor.globo.com/agronegocios/noticia/2018/08/21/uma-safra-de-cafe-que-ficara-na-memoria-1.ghtml>>. Acesso em: 27/05/2023.
8. Esquivel, Patricia, and Victor M. Jimenez. "Functional properties of coffee and coffee by-products." *Food research international* 46.2 (2012): 488-495.
9. Valente, Joana Miguel Leite Duarte. *Subprodutos alimentares: novas alternativas e possíveis aplicações farmacêuticas*. Diss. Universidade Fernando Pessoa (Portugal), 2015.
10. INE IP. Estatísticas agrícolas 2013. Lisboa-Portugal 2014.
11. Diplock, A. T., et al. "Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document." *Special Publication-Royal Society of Chemistry* 248 (2000): 8-60.
12. Roberfroid, Marcel. "Functional food concept and its application to prebiotics." *Digestive and Liver Disease* 34 (2002): S105-S110.
13. Deliza, R., Amauri Rosenthal, and A. L. S. Silva. "Consumer attitude towards information on non conventional technology." *Trends in food science & technology* 14.1-2 (2003): 43-49.
14. Jones, Peter J., and Stephanie Jew. "Functional food development: concept to reality." *Trends in food science & technology* 18.7 (2007): 387-390.
15. Hsieh, Peggy Yun-Hwa, and Jack Appiah Ofori. "Innovations in food technology for health." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16.S1 (2007): 65-73.
16. Ley, Ruth E., et al. "Evolution of mammals and their gut microbes." *science* 320.5883 (2008): 1647-1651.
17. Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., and Stoneking, M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 19, 636–643.
18. Ravel, Jacques, et al. "Vaginal microbiome of reproductive-age women." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.supplement_1 (2011): 4680-4687.
19. Costello, Elizabeth K., et al. "Bacterial community variation in human body habitats across space and time." *science* 326.5960 (2009): 1694-1697.
20. Qin, Junjie, et al. "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *nature* 464.7285 (2010): 59-65.

21. Huttenhower C, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *nature*, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012.
22. O'Hara, Ann M., and Fergus Shanahan. "The gut flora as a forgotten organ." *EMBO reports* 7.7 (2006): 688-693.
23. Sekirov, Inna, et al. "Gut microbiota in health and disease." *Physiological reviews* (2010).
24. Walsh, Calum J., et al. "Beneficial modulation of the gut microbiota." *FEBS letters* 588.22 (2014): 4120-4130.
25. Round, June L., and Sarkis K. Mazmanian. "The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease." *Nature reviews immunology* 9.5 (2009): 313-323.
26. Lathrop, Stephanie K., et al. "Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota." *Nature* 478.7368 (2011): 250-254.
27. Robinson, Courtney J., Brendan JM Bohannon, and Vincent B. Young. "From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74.3 (2010): 453-476.
28. Ley, Ruth E., et al. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proceedings of the national academy of sciences* 102.31 (2005): 11070-11075.
29. Armougom, Fabrice, et al. "Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients." *PloS one* 4.9 (2009): e7125.
30. Brown, Linda Morris. "Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission." *Epidemiologic reviews* 22.2 (2000): 283-297.
31. Larsen, Nadja, et al. "Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults." *PloS one* 5.2 (2010): e9085.
32. Spor, Aymé, Omry Koren, and Ruth Ley. "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome." *Nature Reviews Microbiology* 9.4 (2011): 279-290.
33. Sartor, R. Balfour. "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 134.2 (2008): 577-594.
34. Kashtanova, Daria A., et al. "Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life." *Nutrition* 32.6 (2016): 620-627.
35. Backhed, Fredrik, et al. "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *science* 307.5717 (2005): 1915-1920.
36. Claesson, Marcus J., et al. "Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly." *Nature* 488.7410 (2012): 178-184.
37. David, Lawrence A., et al. "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." *Nature* 505.7484 (2014): 559-563.

38. Khoruts, Alexander, et al. "Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea." *Journal of clinical gastroenterology* 44.5 (2010): 354-360.
39. Gibson, Glenn R., and Marcel B. Roberfroid. "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." *The Journal of nutrition* 125.6 (1995): 1401-1412.
40. Gibson, Glenn R., et al. "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics." *Nutrition research reviews* 17.2 (2004): 259-275.
41. Marriott, Bernadette P., et al., eds. *Present knowledge in nutrition: basic nutrition and metabolism*. Academic Press, 2020.
42. Cummings, J. H. "The effect of dietary fiber on fecal weight and composition." *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition* 1 (1986): 211.
43. Reichardt, Nicole, et al. "Specific substrate-driven changes in human faecal microbiota composition contrast with functional redundancy in short-chain fatty acid production." *The ISME journal* 12.2 (2018): 610-622.
44. Tawfick, Mahmoud M., et al. "Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics." *International Journal of Biological Macromolecules* 208 (2022): 948-961.
45. Uerlings, Julie, et al. "Chicory root and inulin stimulate butyrate-producing bacterial communities in an *in vitro* model of the piglet's gastro-intestinal tract." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 26 (2021): 100269.
46. Zou, Jun, et al. "Inulin fermentable fiber ameliorates type I diabetes via IL22 and short-chain fatty acids in experimental models." *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 12.3 (2021): 983-1000.
47. Gibson, Glenn R., et al. "Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin." *Gastroenterology* 108.4 (1995): 975-982.
48. Niness, Kathy R. "Inulin and oligofructose: what are they?" *The Journal of nutrition* 129.7 (1999): 1402S-1406S.
49. Jung, Tae-Hwan, Woo-Min Jeon, and Kyoung-Sik Han. "In vitro effects of dietary inulin on human fecal microbiota and butyrate production." *Journal of microbiology and biotechnology* 25.9 (2015): 1555-1558.
50. Macfarlane, George T., and Sandra Macfarlane. "Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health." *Journal of AOAC International* 95.1 (2012): 50-60.
51. Cummings, John H., and George T. Macfarlane. "Collaborative JPEN-Clinical Nutrition Scientific Publications Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism." *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 21.6 (1997): 357-365.
52. Mortensen, P. Brobech, and M. Rye Clausen. "Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 31.sup216 (1996): 132-148.

53. Akhtar, Muhammad, et al. "Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation." *Animal nutrition* 8 (2022): 350-360.
54. Tazoe, H1, et al. "Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions." *J Physiol Pharmacol* 59.Suppl 2 (2008): 251-262.
55. Segain, J. P., et al. "Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease." *Gut* 47.3 (2000): 397-403.
56. Lührs, Hardi, et al. "Butyrate inhibits NF-κB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis." *Scandinavian journal of gastroenterology* 37.4 (2002): 458-466.
57. Aoyama, Michiko, Joji Kotani, and Makoto Usami. "Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways." *Nutrition* 26.6 (2010): 653-661.
58. Joseph, Jeena, et al. "Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB." *Oncogene* 23.37 (2004): 6304-6315.
59. Andoh, Akira, et al. "Sodium butyrate enhances complement-mediated cell injury via down-regulation of decay-accelerating factor expression in colonic cancer cells." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 50 (2002): 663-672.
60. Rosignoli, Patrizia, et al. "Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumor cells." *Carcinogenesis* 22.10 (2001): 1675-1680.
61. Gaudier, E., et al. "Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 287.6 (2004): G1168-G1174.
62. Cani, PDea, et al. "Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study." *European journal of clinical nutrition* 60.5 (2006): 567-572.
63. Gao, Zhanguo, et al. "Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice." *Diabetes* 58.7 (2009): 1509-1517.
64. Tedelind, Sofia, et al. "Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease." *World journal of gastroenterology: WJG* 13.20 (2007): 2826.
65. Ishizaka, Shigeaki, Eiryō Kikuchi, and Tadasu Tsujii. "Effects of acetate on human immune system." *Immunopharmacology and immunotoxicology* 15.2-3 (1993): 151-162.
66. Hong, Yeon-Hee, et al. "Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43." *Endocrinology* 146.12 (2005): 5092-5099.
67. Illman, Richard J., et al. "Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and perfused rat liver." *Annals of Nutrition and Metabolism* 32.2 (1988): 97-107.
68. Rooks, Michelle G., and Wendy S. Garrett. "Gut microbiota, metabolites and host immunity." *Nature reviews immunology* 16.6 (2016): 341-352.

69. Payne, Amanda N., et al. "Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling." *Trends in biotechnology* 30.1 (2012): 17-25.
70. Makki, Kassem, et al. "The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease." *Cell host & microbe* 23.6 (2018): 705-715.
71. Deehan, Edward C., et al. "Modulation of the gastrointestinal microbiome with nondigestible fermentable carbohydrates to improve human health." *Microbiology spectrum* 5.5 (2017): 10-1128.
72. Fredholm, Bertil B., et al. "Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use." *Pharmacological reviews* 51.1 (1999): 83-133
73. Nakayama, Tatsuya, and Kazunori Oishi. "Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses." *FEMS microbiology letters* 343.2 (2013): 161-168.
74. Jaquet, Muriel, et al. "Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study." *International journal of food microbiology* 130.2 (2009): 117-121.
75. Selma, Maria V., Juan C. Espin, and Francisco A. Tomas-Barberan. "Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health." *Journal of agricultural and food chemistry* 57.15 (2009): 6485-6501.
76. Parkar, Shanthi G., David E. Stevenson, and Margot A. Skinner. "The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health." *International journal of food microbiology* 124.3 (2008): 295-298.
77. Tabasco, Raquel, et al. "Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism." *Food microbiology* 28.7 (2011): 1345-1352.
78. Aura, Anna-Marja. "Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon." *Phytochemistry Reviews* 7 (2008): 407-429.
79. Couteau, D., et al. "Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid." *Journal of applied microbiology* 90.6 (2001): 873-881.
80. Ramirez-Farias, Carlett, et al. "Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*." *British Journal of Nutrition* 101.4 (2008): 541-550.
81. Fernández, Javier, et al. "Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review." *Journal of Functional Foods* 25 (2016): 511-522..
82. Topping, David L., and Peter M. Clifton. "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides." *Physiological reviews* 81.3 (2001): 1031-1064.
84. Cummings, John H., et al. "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." *Gut* 28.10 (1987): 1221-1227.

85. Parada Venegas, Daniela, et al. "Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases." *Frontiers in immunology* 10 (2019): 277.
86. Kaczmarek, Jennifer L., Salma MA Musaad, and Hannah D. Holscher. "Time of day and eating behaviors are associated with the composition and function of the human gastrointestinal microbiota." *The American journal of clinical nutrition* 106.5 (2017): 1220-1231.
87. Leone, Vanessa, et al. "Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism." *Cell host & microbe* 17.5 (2015): 681-689.
88. Smith, Nick W., et al. "The classification and evolution of bacterial cross-feeding." *Frontiers in Ecology and Evolution* 7 (2019): 153.
89. Belenguer, Alvaro, et al. "Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut." *Applied and environmental microbiology* 72.5 (2006): 3593-3599.
89. Barcenilla, Adela, et al. "Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut." *Applied and environmental microbiology* 66.4 (2000): 1654-1661.
90. Hold, Georgina L., et al. "Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces." *Applied and environmental microbiology* 69.7 (2003): 4320-4324.
91. Duncan, Sylvia H., et al. "Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human feces." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52.5 (2002): 1615-1620.
92. Duncan, Sylvia H., et al. "Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria." *British Journal of Nutrition* 91.6 (2004): 915-923.
93. Biavati, B., et al. "Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications." *Annals of microbiology* 50.2 (2000): 117-132
94. Gibson, G. R., and Xin Wang. "Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria." *Journal of Applied Microbiology* 77.4 (1994): 412-420.
95. Collado, M. Carmen, et al. "Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion." *Journal of food protection* 68.12 (2005): 2672-2678.
96. Lee, Hae-Ji, et al. "Suppression of gut dysbiosis by *Bifidobacterium longum* alleviates cognitive decline in 5XFAD transgenic and aged mice." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 11814.
97. Guarner, F., et al. "Effect of a mixture of inulin and fructo-oligosaccharide on lactobacillus and bifidobacterium intestinal microbiota of patients receiving radiotherapy; a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Nutricion hospitalaria* 27.6 (2012): 1908-1915.
98. Russe, D. A., et al. "Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria." *International journal of food microbiology* 149.1 (2011): 88-105.

99. Fukuda, Shinji, et al. "Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate." *Nature* 469.7331 (2011): 543-547
100. Alvaro, Elise, et al. "Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt." *British Journal of Nutrition* 97.1 (2007): 126-133.
101. Chen, R. M., et al. "Increase of intestinal Bifidobacterium and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion." *Journal of Dairy Science* 82.11 (1999): 2308-2314.
102. Zeng, Wen, et al. "Internal connections between dietary intake and gut microbiota homeostasis in disease progression of ulcerative colitis: A review." *Food Science and Human Wellness* 10.2 (2021): 119-130.
103. Darfeuille-Michaud, Arlette, et al. "High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease." *Gastroenterology* 127.2 (2004): 412-421.
104. Liu, Ying, et al. "Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease." *Gastroenterology* 108.5 (1995): 1396-1404.
105. Hove, H., I. Nordgaard-Andersen, and P. Brobech Mortensen. "Faecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients." *Scandinavian journal of gastroenterology* 29.3 (1994): 255-259.
106. Duncan, Sylvia H., et al. "Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces." *Applied and environmental microbiology* 73.4 (2007): 1073-1078.
107. Panpetch, Wimonrat, et al. "Lacticaseibacillus casei strain T21 attenuates *Clostridioides difficile* infection in a murine model through reduction of inflammation and gut dysbiosis with decreased toxin lethality and enhanced mucin production." *Frontiers in microbiology* 12 (2021): 745299.
108. Benus, Robin FJ, et al. "Association between *Faecalibacterium prausnitzii* and dietary fiber in colonic fermentation in healthy human subjects." *British journal of nutrition* 104.5 (2010): 693-700.
109. Derrien, Muriel, et al. "The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract." *Applied and environmental microbiology* 74.5 (2008): 1646-1648.
110. Lukovac, Sabina, et al. "Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids." *MBio* 5.4 (2014): 10-1128.
111. Van Passel, Mark WJ, et al. "The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes." *PloS one* 6.3 (2011): e16876.