



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu

ALLAN GABRIEL ALVES

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO DE INSTRUMENTAÇÃO NO LABORATÓRIO
DE FITOMEDICAMENTOS, FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA
(FITOFARMATEC)**

BOTUCATU
2025

ALLAN GABRIEL ALVES

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO DE INSTRUMENTAÇÃO NO LABORATÓRIO
DE FITOMEDICAMENTOS, FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA
(FITOFARMATEC)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências de
Botucatu da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho como
requisito parcial à obtenção de título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

A474r

Alves, Allan Gabriel

Relatório final do estágio de instrumentação no laboratório de fitomedicamentos, farmacologia e biotecnologia (FitoFarmaTec) / Allan Gabriel Alves. --Botucatu, 2025

36 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

1. Farmacologia de Produtos Naturais. 2. Microbiota Intestinal. 3. Disbiose. 4. Prebióticos. 5. Alimento Funcional. I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, por ter me dado a oportunidade da formação em farmacologia de plantas medicinais e alimentos funcionais, desde sua disciplina, assim como as posteriores oportunidades me dadas de estágio observacional e do presente estágio de instrumentação no laboratório FitoFarmaTec.

Agradeço ao Departamento de Biofísica e Farmacologia pela oportunidade da realização do presente estágio curricular.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório FitoFarmaTec, por todo o ensinamento e paciência em me instruir e de esclarecer minhas dúvidas acerca dos métodos e pesquisas do laboratório ao longo de todo este estágio.

Agradeço ao meus colegas Luiz D. de A. Junior e Fábio P. de Mello, por todas as frutíferas discussões teóricas que me proporcionaram, que foram de grande importância na minha formação como biólogo e me deram uma visão mais aprofundada das nuances dos debates e da produção científica.

Agradeço ao Vinícius M. da Cruz, por todos os conselhos e ajuda nas dúvidas que tive ao longo desse estágio, desde sobre a elaboração desse relatório, como também conselhos sobre a carreira acadêmica.

Agradeço ao Gabriel R. Fernandes, que ao longo do estágio e do acompanhamento de suas tarefas no laboratório, também me proporcionou importantes discussões teóricas sobre os conceitos e temas pesquisados no laboratório, além de ajuda em minhas dúvidas no estágio.

RESUMO

Trabalho de Conclusão de Curso realizado no Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) do Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. O presente trabalho apresenta o relatório de atividades realizadas durante o estágio curricular no laboratório, abordando as técnicas, conceitos, ferramentas e o manejo do biotério. Neste trabalho foram abordados os métodos mais utilizados em amplas pesquisas no laboratório observado, sendo os seguintes métodos: cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fermentação *in vitro* e expressão gênica. Além disso, dos conceitos relacionados às pesquisas observadas no estágio, foram abordados: microbiota intestinal, disbiose e prebióticos.

Palavras-chave: Farmacologia de Produtos Naturais; Instrumentação; Microbiota Intestinal; Disbiose; Prebióticos; Alimento Funcional

ABSTRACT

Final Course Report carried out at the Phytomedicines, Pharmacology, and Biotechnology Laboratory (PhytoPharmaTech) of the Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho. This report presents the activities carried out during the internship in the laboratory, addressing the techniques, concepts and tools observed, addressing the techniques, concepts, tools, and management of the animal facility. This work covered the methods most used in extensive research in the observed laboratory, including: gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS), high-performance liquid chromatography (HPLC), *in vitro* fermentation, and gene expression. Furthermore, concepts related to the research observed during the internship included: gut microbiota, dysbiosis, and prebiotics.

Keywords: Pharmacology of Natural Products; Instrumentation; Gut Microbiota; Dysbiosis; Prebiotics; Functional Food

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. UTENSÍLIOS DE PESQUISA.....	10
2.1. MICROTUBO.....	10
2.2. TUBO FALCON.....	10
3. APARATOS E MAQUINÁRIO DE ANÁLISES.....	11
3.1. AUTOCLAVE.....	11
3.2. BALANÇA.....	11
3.3. CÂMARA FRIA.....	11
3.4. CENTRIFUGADORA.....	11
3.5. ESTUFA.....	11
3.6. GELADEIRAS DE -20°C E -80°C.....	12
3.7. INCUBADORA.....	12
3.8. LIOFILIZADOR.....	12
3.9. PIPETA.....	12
4. PROCESSOS DE ANÁLISE.....	13
4.1. CROMATOGRAFIA.....	13
4.1.1. Introdução a cromatografia.....	13
4.1.1.1. Origem da cromatografia.....	13
4.1.1.2. Desenvolvimento da Cromatografia.....	13
4.1.1.3. Conceito padronizado de Cromatografia.....	15
4.1.2. Cromatografia gasosa.....	15
4.1.2.1. Definição.....	15
4.1.2.2. Origem da cromatografia gasosa.....	15
4.1.2.3. Desenvolvimento da cromatografia gasosa.....	16
4.1.2.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	17
4.1.3. Cromatografia líquida.....	17
4.1.3.1. Definição.....	17
4.1.3.2. Introdução.....	18
4.1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	18
4.2. FERMENTAÇÃO IN VITRO.....	19
4.2.1. Introdução.....	19
4.2.2. Aplicações no laboratório.....	19
4.2.2.1. Introdução.....	19
4.2.2.2. Método de fermentação in vitro.....	20
4.2.2.3. Extração dos ácidos graxos de cadeia curta.....	20
4.3. EXPRESSÃO GÊNICA.....	20
4.3.1. Extração do DNA.....	20
4.3.2. PCR.....	21
5. MANEJO DO BIOTÉRIO.....	23
5.1. ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	23
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
5.3. CUIDADOS GERAIS.....	24

5.4. HIGIENIZAÇÃO DO BIOTÉRIO.....	24
5.5. MANEJO DAS COBAIAS.....	24
6. CONCEITOS.....	26
6.1. MICROBIOTA INTESTINAL.....	26
6.1.1. Formação e composição da microbiota intestinal.....	26
6.1.2. Funções da microbiota intestinal na saúde humana.....	27
6.1.3. Aplicações no laboratório.....	28
6.2. DISBIOSE.....	28
6.2.1. Definição.....	28
6.2.2. Dieta, fatores de risco e efeitos no metabolismo.....	29
6.2.3. Relação da disbiose com doenças.....	29
6.2.3.1. Disbiose na obesidade.....	29
6.2.3.2. Disbiose na doença inflamatória intestinal.....	30
6.3 PREBIÓTICO.....	31
6.3.1. Evolução do conceito.....	31
6.3.2. Consenso sobre substâncias prebióticas.....	33
6.3.3. Aplicações no laboratório.....	33
7. CONCLUSÃO.....	34

1. INTRODUÇÃO

Em 1986, o Professor Luiz Claudio Di Stasi ingressou como professor auxiliar no Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências do campus de Botucatu da Unesp e iniciou seu laboratório, cuja linha de pesquisa, na época, era voltada para o estudo de plantas medicinais com atividade analgésica e estudos de etnofarmacologia com comunidades tradicionais brasileiras. Em 1999, houve a mudança de prédio do laboratório, que passou a se chamar Laboratório de Fitomedicamentos (LaFit), mantendo as pesquisas com plantas medicinais analgésicas, e adicionando pesquisas com úlcera gástrica, inibidores da secreção de histamina, antimaláricos, amebicidas e outras.

Em 2003, o laboratório deu início às pesquisas na área de Doença Inflamatória Intestinal (DII), inicialmente utilizando compostos químicos de origem vegetal, especialmente cumarinas. A partir de 2004, passou a empregar alimentos funcionais em modelos experimentais de DII, realizando pesquisas em produtos como polidextrose, lactulose, *Musa* spp. e açaí.

Em 2014, o laboratório se expandiu e se tornou Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), um laboratório de farmacologia e biotecnologia de produtos naturais, realizando pesquisas sobre eficácia e segurança do uso de produtos naturais, e seus usos tanto como prebióticos, *prebiotic-like* e fitoterápicos, tendo como foco doenças crônicas não-transmissíveis, como DII, diabetes do tipo 2 e obesidade. Como metodologia nessas pesquisas, são utilizados ensaios experimentais em animais, ensaios clínicos, métodos químicos, testes *in vivo*, *in vitro*, *in silico*, biofísica molecular e expressão gênica.

Destes métodos, serão descritos neste trabalho, os mais recorrentes e utilizados no laboratório em uma ampla variedade de pesquisas, os quais são: cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, fermentação *in vitro* e expressão gênica. Além disso, será abordado o manejo de biotério relacionado a experimentação animal, o ferramental relacionado aos métodos e os conceitos relacionados às linhas de pesquisa do laboratório. Dos conceitos, são descritos a microbiota intestinal, disbiose e prebióticos.

2. UTENSÍLIOS DE PESQUISA

2.1. MICROTUBO

Os microtubos são pequenos tubos cilíndricos de plástico, que variam entre 0,5 mL a 2 mL, utilizados comumente nos laboratórios para armazenar, manipular e centrifugar as amostras, sendo utilizados usualmente em processos de análise bioquímica e de biologia molecular.

2.2. TUBO FALCON

Os tubos Falcon são tubos cônicos de plástico, possuem as mesmas funções do microtubo, além do formato se diferem destes últimos por terem uma capacidade maior de armazenamento, entre 15 mL e 50 mL, e por terem uma tampa de rosquear. Em certos métodos, na qual é necessário uma vedação no tubo para impedir com maior segurança a entrada de ar e contaminações relacionadas, é utilizado plásticos Parafilm para cobrir a tampa.

3. APARATOS E MAQUINÁRIO DE ANÁLISES

3.1. AUTOCLAVE

O Autoclave é um aparato utilizado para esterilização de instrumentos e materiais. Este aparato elimina os microrganismos por combinar elevadas temperaturas, pressão e umidade, a qual leva à desnaturação de proteínas dos microrganismos e por conseguinte a sua morte. Sendo assim um aparato importante para garantir a não-contaminação de análises e métodos científicos, que pode ser causado por instrumentos e materiais contaminados.

3.2. BALANÇA

A balança analítica é uma balança de precisão utilizada para a medição de massa de objetos de interesse científico, usualmente amostras ou substâncias químicas. Por ser um aparato de precisão e sensível a qualquer massa, deve-se manter o seu ambiente controlado, para não haver alterações na medição, que podem ocorrer até por vento.

3.3. CÂMARA FRIA

A Câmara fria é um maquinário que armazena produtos em baixa temperatura controlada. É utilizada para manter as substâncias e amostras estáveis, impedindo condições de reações químicas espontâneas e processos biológicos.

3.4. CENTRIFUGADORA

A centrífuga é um maquinário que separa fases de amostras líquidas a partir da força centrífuga gerada por sua rotação. Esta força centrífuga, separa diferentes componentes dentro das amostras a partir da densidade destes, permitindo a divisão das amostras internamente em duas fases distintas.

3.5. ESTUFA

A estufa é um equipamento de controle de temperatura e umidade, podendo ser utilizado para secagem, esterilização, cultivo e outros processos.

3.6. GELADEIRAS DE -20°C E -80°C

As geladeiras de -20°C e -80°C possuem a mesma função que a câmara fria, armazenando as substâncias e amostras em baixa temperatura controlada, e assim as mantendo estáveis.

3.7. INCUBADORA

A incubadora é uma máquina que permite o controle de temperatura e a agitação, é utilizada no laboratório principalmente no método de fermentação *in vitro*, incubando e permitindo as condições para a fermentação.

3.8. LIOFILIZADOR

O liofilizador é uma máquina que permite a secagem por sublimação, ou seja, a passagem direta do estado sólido para o gasoso, assim sem ser necessário o aquecimento dos materiais em secagem. É utilizado no laboratório para a secagem de produtos testados na fermentação *in vitro*.

3.9. PIPETA

A pipeta automática é um aparelho utilizado para a transferência de substâncias líquidas, possuindo uma medição de volume variável. Seu volume variável pode ir desde nl até ml. Estas pipetas utilizam ponteiros descartáveis, para evitar contaminação da pipeta e outros tubos nas transferências.

3.10. VORTEX

O vórtex é um equipamento que tem função de ser agitador, pode ser utilizado com pequenos tubos, é utilizado para homogeneizar amostras ou outras substâncias.

4. PROCESSOS DE ANÁLISE

4.1. CROMATOGRAFIA

4.1.1. Introdução a cromatografia

4.1.1.1. Origem da cromatografia

O químico e botânico M. S. Tswett, observou em extratos de pigmentos de plantas, que diferentes solventes reagiam de maneiras distintas, extraíndo os pigmentos seletivamente. Em sua época, esse fenômeno era atribuído a problemas de solubilidade e reações químicas nas estruturas dos pigmentos. Porém, M. S. Tswett, discordando desta tese, concluiu que isso ocorria pelas forças moleculares entre os pigmentos e a superfície da folha, assim, determinado solvente extrairia determinado pigmento por possuir uma força de dissolução maior que as forças moleculares de ligação entre este pigmento e a estrutura da planta, deste modo, identificando a adsorção como esta força. Com base nesta descoberta, ele desenvolveu técnicas para utilizar esse princípio para a extração isolada dos pigmentos de plantas, e em 1906, publica 2 artigos (Physico-Chemical Studies of Chlorophyll: the Adsorptions e Adsorption Analysis and the Chromatographic Method: Application to the Chemistry of Chlorophyll), nas quais aborda esse princípio da adsorção e apresenta a cromatografia. Nestes artigos, ele descreve a técnica: o adsorvente (usualmente carbonato de cálcio) é colocado em um tubo estreito, em seguida é inserida a solução com pigmentos e o solvente no tubo, a solução então é filtrada no adsorvente e os pigmentos são separados em zonas coloridas, de acordo com sua sequência de adsorção. Essa técnica é nomeada de cromatografia e definida como “método no qual os componentes de uma mistura são separados em uma coluna de adsorvente em um sistema de fluxo”. Embora essa classificação ainda não existia em seu período, utilizando a nomenclatura e teoria da cromatografia que se desenvolveu ao longo da história da cromatografia, é possível dizer que sua técnica foi o nascimento da cromatografia adsortiva (ou seja, baseada no princípio da adsorção) e da cromatografia líquida. (Ettre e Hinshaw, 2008)

4.1.1.2. Desenvolvimento da Cromatografia

Após a criação em 1906, a cromatografia não é significativamente adotada e cai em desuso por cerca de 25 anos, com poucos cientistas utilizando-a. O químico analítico,

importante teórico e historiador da cromatografia, L. S. Ettre, atribui esse “esquecimento” da técnica ao fato de que na época havia um foco na química e bioquímica em isolar e purificar, e estudar somente uma substância das amostras, ao invés de estudar todos os componentes, assim se utilizava usualmente a extração e cristalização, além disso, havia críticas a cromatografia sobre a questão de sua capacidade da pureza, e a visão de que somente pela cristalização era possível extrair substâncias puras. (Ettre e Hinshaw, 2008)

A partir de 1931, cresce as pesquisas em substâncias naturais complexas na bioquímica, assim como a demanda por técnicas de separação de substâncias similares de mistura de compostos em pouca quantidade, então a técnica de cromatografia retorna a ser usada e tem uma grande adoção, se tornando popular. Com sua popularização, a cromatografia foi se diversificando, com o desenvolvimento de muitas variações independentemente, com suas próprias teorias e nomenclaturas. (Braithwaite e Smith, 1996)

Em 1938, Izmailov e Shraiber, para analisar tinturas farmacêuticas, desenvolveram um sistema cromatográfico na qual utilizavam uma camada fina de adsorvente de alumina em uma placa de vidro e aplicavam manchas (spots) de solvente para formar cromatogramas circulares. Este trabalho inicia a cromatografia de camada delgada moderna. (Ettre e Hinshaw, 2008; Braithwaite e Smith, 1996)

Também em 1938, durante a Segunda Guerra Mundial e o Projeto Manhattan (projeto de desenvolvimento da bomba atômica pelo governo dos Estados Unidos), é desenvolvido a cromatografia de troca iônica para a separação das terras raras e elementos transurânicos. Em 1938, Taylor e Urea relatam o uso de resinas de zeólita para a separação de isótopos de lítio e potássio. Nesta técnica, as moléculas carregadas da amostra se ligam à resina, dependendo da sua afinidade e da força da interação iônica. (Braithwaite e Smith, 1996)

Em 1941, A. J. Martin e R. L. Synge publicaram o artigo “A new form of chromatogram employing two liquid phases”, neste artigo eles descrevem um sistema cromatográfico onde usam água em um suporte de sílica como fase estacionária e clorofórmio como fase móvel, para separar os monoaminoácidos monocarboxílicos. Neste artigo, eles chamam a nova técnica de cromatografia líquida-líquida, porém, essa técnica ficou conhecida como cromatografia de partição, já que o princípio básico de separação se dá por partição, com as

substâncias sendo separadas pela partição entre a água e o clorofórmio. (Ettre e Hinshaw, 2008; Braithwaite e Smith, 1996)

Em 1944, R. Consden, A. H. Gordon e A. J. Martin publicam o artigo “Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper”, neste artigo descrevem

um sistema cromatográfico na qual utilizam um papel filtro impregnado com água como fase estacionária e butanol como fase móvel, com o butanol subindo pelo papel filtro por força capilar e carreando diferencialmente os diferentes monoaminoácidos dicarboxílicos e assim os separando. Com este sistema, eles criavam a cromatografia de papel. (Ettre e Hinshaw, 2008; Braithwaite e Smith, 1996)

4.1.1.3. Conceito padronizado de Cromatografia

Conforme já discutido antes, com o desenvolvimento das variadas técnicas cromatográficas de maneira independente, com cada técnica desenvolvendo sua própria terminologia e teoria, se tornando necessário uma padronização das nomenclaturas e conceitos. Sendo assim, em 1973 a IUPAC publicou sua padronização internacional das nomenclaturas da cromatografia (Unified nomenclature for chromatography - 1973), e em 1993 a revisou e atualizou no documento “Nomenclature for chromatography”, na qual define cromatografia como:

Cromatografia é um método físico de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma sendo estacionária (fase estacionária) enquanto outra (fase móvel) se move em uma direção definida. (Ettre, 1993)

4.1.2. Cromatografia gasosa

4.1.2.1. Definição

A cromatografia gasosa é um método cromatográfico na qual a fase móvel é gasosa. (Ettre, 1993)

4.1.2.2. Origem da cromatografia gasosa

Em 1941, no artigo já anteriormente citado, que iniciava a cromatografia de partição, A. J. Martin e R. L. Synge já comentava sobre a possibilidade de utilizar uma fase móvel gasosa ao invés de líquida para análise de substâncias voláteis.

Em 1952, Martin e James publicam Gas–Liquid Partition Chromatography: The Separation and Microestimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid, esse artigo descreve o que ficou conhecido como a primeira cromatografia gasosa (CG), iniciando o desenvolvimento da técnica. Neste artigo, eles descrevem um sistema onde usavam gás nitrogênio como fase móvel, e uma coluna preenchida com celita coberta com

partículas finas de com óleo de silicone e 10% de ácido esteárico como fase estacionária, com essa coluna aquecida por steam jacket e um equipamento de titulação automatizada no fim da coluna para quantificar a quantidade das substâncias. (Ettre e Hinshaw, 2008).

4.1.2.3. Desenvolvimento da cromatografia gasosa

Na década de sua criação, a CG foi rapidamente adotada na indústria de petróleo para análises de composição, um grande desafio analítico da época na área, levando a grandes desenvolvimentos da técnica. A partir de 1960, esta cromatografia teve um crescimento de adoção em outras áreas, principalmente na bioquímica, com aplicações em análises de aminoácidos, produtos naturais e estudos de alimentos. Em 1980, o desenvolvimento da coluna capilar, continuou a rápida expansão do método. (Bartle e Myers, 2002)

No início da CG, conforme descrito pelo artigo da criação do método, se utilizava colunas preenchidas como fase estacionária, porém, com estas colunas, a resolução da cromatografia ficava limitada pelo comprimento da coluna, ligado a uma restrição pela queda da pressão provocada pela resistência do fluxo de gás. Para superar isso, Golay em 1958 desenvolveu a coluna capilar, nesta coluna a fase estacionária é revestida na parede interna, seja como uma película fina (tubo aberto revestido na parede) ou impregnada em uma camada porosa na parte interna (camada porosa ou tubo aberto revestido no suporte). A coluna capilar permitiu uma melhor eficiência de separação e a possibilidade de se trabalhar com menores temperaturas, permitindo um aumento da velocidade da cromatografia em 10 vezes, se comparado com a coluna original. Porém, como a coluna capilar constitui uma fase estacionária menor, isso faz com que sua capacidade seja mais limitada, se comparada, assim necessitando o desenvolvimento de métodos especiais de introdução de amostras e detectores mais sensíveis nos cromatógrafos gasosos. (Bartle e Myers, 2002)

Em 1961, Desty desenvolveu a coluna capilar de vidro, a qual foi amplamente utilizada até 1980, porém, por conta da sua fragilidade e problemas com interação com analitos polares, foi sendo substituída pela coluna de sílica fundida, desenvolvida em 1979 por Dandeneau e Zerrenner. A coluna de sílica fundida é feita com tecnologia de fibra óptica, sendo altamente flexível, durável e inerte quimicamente. Estas colunas são externamente revestidas com uma camada protetora de poliamida e com um filme imobilizado de uma ampla variedade de fases estacionárias, são úteis para a análise de quase todas as misturas voláteis, tendo como exceção geralmente os gases permanentes e compostos de baixo peso molecular. (Bartle e Myers, 2002)

O desenvolvimento da coluna capilar também criou a necessidade de maior precisão nos controles pneumáticos dos cromatógrafos de CG, relacionados à injeção de amostra e controle de fluxo do gás de arraste. Esta necessidade promoveu todo um desenvolvimento de sistemas automatizados computadorizados, comum aos cromatógrafos gasosos atuais. (Bartle e Myers, 2002)

No início, a CG utilizava como detector dos compostos um sistema de titulação automatizada, acoplado no fim da coluna. Em 1954, Ray desenvolveu o catarômetro, um meio de detecção por mudança de temperatura de um filamento de um dispositivo de medida de condutividade termal. Este detector, continua popular para uso com coluna preenchida, porém, caiu em desuso para colunas capilares e foi sendo substituído ao longo do tempo por detectores baseados em ionização. (Bartle e Myers, 2002)

4.1.2.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Em 1963, a partir do trabalho de Gohlke, se iniciou o desenvolvimento da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), na qual utiliza um espectrômetro de massa como detector. O espectrômetro de massa identifica e quantifica os compostos a partir da relação massa-carga dos íons, permitindo uma maior sensibilidade na detecção. (Bartle e Myers, 2002)

No laboratório FitoFarmaTec, a cromatografia gasosa é feita utilizando CG-EM, na qual se utiliza um modelo FOCUS da Thermo Scientific, equipado com amostrador líquido automatizado (modelo triplus DUO da Thermo), acoplado com o modelo de espectrômetro de massa Thermo-ISQ 230ST, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com polietilenoglicol TG-WASMS de alta polaridade e hélio como gás carreador. O CG-EM é utilizado no laboratório para análises de substâncias voláteis, principalmente ácidos graxos de cadeia-curta.

4.1.3. Cromatografia líquida

4.1.3.1. Definição

A cromatografia líquida é um método cromatográfico que possui uma fase móvel líquida. (Ettre, 1993)

4.1.3.2. Introdução

A cromatografia e seu desenvolvimento, conforme já abordado anteriormente, desde sua origem à criação e popularização da cromatografia gasosa, utilizava uma fase móvel líquida, sendo assim dominada pela cromatografia líquida. Após a criação e desenvolvimento da cromatografia gasosa, por esta ser mais rápida e eficaz comparada à cromatografia líquida clássica, ela foi sendo menos utilizada. Porém, por conta da limitação de análise da cromatografia gasosa em somente substâncias voláteis, levou a uma necessidade e desenvolvimento de novas técnicas de cromatografia líquida, baseadas nos avanços e teoria desenvolvida na cromatografia gasosa, estas novas técnicas ficaram conhecidas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). (Ettre e Hinshaw, 2008)

4.1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

Inicialmente, chamada de cromatografia líquida de alta pressão, por conta da adoção do uso de pressão de 100 a 300 atm para a aceleração da corrida cromatográfica, posteriormente, com o avanço da técnica, o método foi renomeado por Csaba Horváth para cromatografia líquida de alta eficiência. Diferente dos métodos clássicos, a CLAE possui uma maior velocidade de corrida, por conta do uso de pressão inserida no sistema cromatográfico, além disso, possuindo um sistema automatizado semelhante ao da cromatografia gasosa atual, permite a análise de amostras pequenas, com grande eficiência, utilizando diversos detectores. (Ettre e Hinshaw, 2008; Fanali et. al, 2023)

O desenvolvimento da CLAE se iniciou sobre as bases teóricas estabelecidas por Giddings em 1963, em seu trabalho Giddings concluiu que a cromatografia líquida clássica possui uma difusão na fase móvel líquida 3 vezes mais lenta comparada à cromatografia gasosa, e que para aumentar a performance da cromatografia líquida era necessário alta pressão e pequenas partículas na coluna. Com base nestas conclusões, a partir da década de 1960 se iniciou o desenvolvimento desta nova técnica, levando ao desenvolvimento de inúmeras colunas com superfícies porosas com partículas. Dos detectores desenvolvidos pelo método, desde o início, um dos principais foi o detector baseado em luz ultravioleta (UV), o qual identifica e quantifica as substâncias com base na refração gerada pelo analito ao sofrerem uma radiação de luz ultravioleta. A partir da década 1970 começaram também a ser utilizados os detectores de Índice de Refração (IR), os quais identificam e quantificam as

substâncias pela diferença no índice de refração entre o analito e um fluxo de referência da fase móvel. (Ettre e Hinshaw, 2008; Fanali et. al, 2023)

No laboratório é utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência, sendo este método utilizado para a identificação e quantificação de compostos isolados, extratos de plantas, flavonóides, cumarinas e fibras solúveis de baixo peso molecular. Como detector, são utilizados o detector IR, especificamente para análises de fibras de baixo peso molecular e açúcares, e o detector UV, nas análises das outras substâncias.

4.2. FERMENTAÇÃO *IN VITRO*

4.2.1. Introdução

Os primeiros métodos de fermentação *in vitro* para simular as condições e processos digestivos foram baseadas no trato intestinal superior, já que inicialmente o trato intestinal inferior era considerado de baixa significância nutricional. Entretanto, principalmente na década de 1990, com os estudos e reconhecimento do papel do trato intestinal inferior, na nutrição e na saúde intestinal, iniciou-se o desenvolvimento e adoção de fermentação *in vitro* enquanto modelo para esta região. (Coles et al. 2005)

Os modelos de fermentação *in vitro*, mais adotados para modelos de intestino grosso e região cólica, incluindo as pesquisas de microbiota intestinal, são modelos do tipo “batch”, estes modelos são os mais simplificados. Neste tipo, há apenas o uso de amostra fecal, com tampões e em alguns métodos, meios de nutrição e agentes redox, sendo esta mistura incubada em aquecimento por horas. Embora seja um método simplificado, há vários métodos de fermentação *in vitro* do tipo “batch”, sem uma padronização ampla do método. (Coles et al. 2005)

4.2.2. Aplicações no laboratório

4.2.2.1. Introdução

No laboratório, é utilizado um método de fermentação *in vitro* do tipo “batch” para a fermentação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), estes ácidos são de interesse do laboratório por serem metabólitos da fermentação de produtos com atividade prebiótica pela fermentação microbiana da microbiota intestinal, e estarem relacionadas a efeitos benéficos à

saúde, principalmente a atividade anti-inflamatória. Sendo assim, é utilizado para a verificação da atividade prebiótica de produtos de interesse. (Mello, 2024)

4.2.2.2. Método de fermentação *in vitro*

O método padronizado pelo laboratório é baseado no método de Comalada e colaboradores (2006), neste método se utiliza 2 gramas da amostra de fezes, homogeneizadas em 10 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) sob atmosfera saturada de argônio. Os tubos Falcon com o conteúdo são vedados com plástico de parafina, homogeneizados no vortex e mantidos a 37°C por 24 horas com agitação constante de 150 rpm e protegidos de qualquer fonte de luz. (Mello, 2024)

4.2.2.3. Extração dos ácidos graxos de cadeia curta

Após a fermentação é feito alíquotas de 1 mL das amostras fermentadas, sendo adicionados 1 ml de ácido ortofosfórico a 0,5%, após isso são homogeneizadas no vortex por 1 minuto. São então transferidas para microtubos e centrifugadas por 10 minutos em 4°C e 17950 g. O sobrenadante então é retirado, e nele é adicionado acetato de etila na proporção 1:1, sendo então agitado e centrifugado novamente. Após isso, é retirado novamente o sobrenadante, a qual é colocado em vials de 1,5 ml, é também adicionado ácido octanóico (padrão interno analítico) em uma concentração de 0,755 mg/ml, e então estes vials são injetados no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa para a quantificação dos AGCCs. (Mello, 2024)

4.3. EXPRESSÃO GÊNICA

4.3.1. Extração do DNA

A extração do DNA é um método utilizado para lisar as células da amostra e extrair somente o material genético. Pode ser realizada com protocolos manuais (protocolos *in home*) ou com kits de empresas. O uso dos kits varia de acordo com o tipo de amostra, no laboratório observado, para analisar as amostras de fezes é utilizado o kit “Invitrogen™ PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit” específico para amostra de fezes. (Lipay e Bianco, 2015) Embora haja kits diferentes, de empresas diferentes, os protocolos de extração costumam seguir as mesmas etapas: lise, ligação do DNA/RNA, lavagem, secagem da coluna e eluição.

Na etapa de lise há a ruptura da membrana plasmática para isolamento dos ácidos nucleicos dos núcleos celulares. Para isso é utilizado um tampão de lise contendo sais caotrópicos, estes sais quebram ligações intermoleculares não-covalentes, levando à desestabilização e rompimentos de proteínas, permitindo a ligação destas células rompidas na sílica dos tubos dos kits. (Lipay e Bianco, 2015)

Na etapa de ligação do DNA/RNA, para garantir a total absorção dos ácidos nucleicos na membrana da sílica, é adicionado etanol no tampão de ligação, com os sais, enzimas, proteínas, óleos, e outras impurezas passando pela membrana sem serem absorvidas e sendo então eliminadas. (Lipay e Bianco, 2015)

Na etapa de lavagem a membrana da coluna é lavada dos resíduos das impurezas, nesta etapa há várias etapas de lavagens com sais caotrópicos e posteriormente com etanol para a remoção dos resíduos de sais. Na etapa da secagem da coluna é removido o etanol, para restar somente os ácidos nucleicos. E na etapa final de eluição, é utilizado uma solução de tampão de eluição para desfazer a ligação dos ácidos nucleicos com a membrana de sílica. (Lipay e Bianco, 2015)

4.3.2. PCR

Após a extração do DNA é realizada a amplificação do material genético pelo processo de reação em cadeia da polimerase (PCR). Este método possibilita a sintetização de fragmentos de DNA a partir de sequências-alvo de interesse. Para este método são utilizados os seguintes componentes: material da extração do DNA, enzima polimerase, primers (sequências de oligonucleotídeos desenhadas especificamente para sequência alvo), tampão, magnésio e dNTP (os desoxirribonucleotídeos utilizados para a síntese das fitas). (Lipay e Bianco, 2015)

Para ocorrer a reação, é utilizado um termociclador para ciclar as temperaturas necessárias para cada etapa da reação, no laboratório é utilizado os termocicladores Biomark e StepOne.

As etapas da reação são: desnaturação, que pode ocorrer em temperaturas de 93 a 96°C, nesta etapa ocorre a desnaturação da dupla hélice do DNA-alvo em duas fitas simples; anelamento, que pode ocorrer em temperaturas de 50 a 70°C, onde ocorre o pareamento dos primers com o DNA-alvo nas fitas simples; e a extensão, que pode ocorrer em temperaturas de 70 a 75°C, onde ocorre a síntese da nova fita complementar pela DNA polimerase. Estas

etapas são repetidas em ciclos sequências diversas vezes, de acordo com a configuração do processo no termociclador. (Lipay e Bianco, 2015)

Os termocicladores utilizados no laboratório são de PCR em tempo real, permitindo o acompanhamento das reações e dos resultados quantitativos. Estes termocicladores possuem um sistema óptico que identifica os sinais fluorescentes emitidos pelos sistemas de detecção, e são acoplados a computadores com softwares para analisar estes dados. Estes sistemas de detecção são fluoróforos que se ligam ao DNA e emitem fluorescência, podem ser do tipo Taqman® ou do tipo SYBR® Green I, ambos são utilizados no laboratório. (Lipay e Bianco, 2015)

5. MANEJO DO BIOTÉRIO

5.1. ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Um dos mais importantes e influentes trabalhos sobre ética na experimentação animal foi “The Principles of Humane Experimental Technique”, publicado por Russel e Burch em 1959, neste livro os autores apresentam o princípio dos 3Rs, a partir desta publicação, este princípio se tornou a base de toda a discussão ética e legislação mundial, incluindo a do Brasil, sobre o uso de animais de laboratório. (Lira et al., 2022)

O princípio dos 3Rs se refere à busca, de sempre que possível, diminuir, substituir e refinar o uso de animais em pesquisa. Deste modo, deve-se buscar utilizar métodos alternativos sem animais, como métodos *in vitro*, métodos *in silico*, e etc. Caso isso não seja possível, então deve-se buscar utilizar o menor número de animais possível sem interferir na significância dos resultados, e deve-se refinar as condições e procedimentos para minimizar o sofrimento animal, como por exemplo o uso de analgesia e controle do micro e macroambiente do animal. (Lira et al., 2022)

Com base nesses princípios, em 2008 foi sancionada a “Lei Arouca” (Lei Federal nº 11.794), que regulamenta o uso científico de animais, regulamentando a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS). Dentre as funções do CONCEA, estão: de formular e rever sempre que necessário as normas sobre o uso ético de animais; monitorar e avaliar técnicas alternativas ao uso de animais em ensino e pesquisa; estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações; estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa; manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), de que trata o art. 8º desta Lei. (Lira et al., 2022)

Já as funções das CEUAS são principalmente a avaliação prévia dos procedimentos de ensino e pesquisa que utilizem animais vertebrados não humanos, o cadastro de todos os procedimentos e dos pesquisadores relacionados, a expedição de credenciamento e a notificação às autoridades em caso de acidentes. (Lira et al., 2022)

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O laboratório realiza os experimentos animais com roedores, utilizando Camundongos C57BL/6J e Ratos Wistar como animais de experimentação. Se utiliza Camundongos da linhagem C57BL/6J por serem isogênicos e terem pré-disposição genética a várias doenças crônicas, como síndrome do ovário policístico, doenças que acometem o aparato vascular, infarto, diabetes e obesidade. Os Ratos Wistar são utilizados por serem o melhor modelo experimental para indução inflamatória intestinal com TNBS.

Ratos Wistar são escolhidos como animais de experimentação quando é utilizado TNBS como substância para a indução inflamatória intestinal, por ser mais difícil a indução da inflamação intestinal por TNBS em camundongos. É escolhida a indução inflamatória intestinal por TNBS para induzir uma Doença Inflamatória Intestinal (DII) que se assemelha ao estado de inflamação do tipo da Doença de Crohn. Já quando o objetivo é uma experimentação com DII que se assemelha a inflamação do tipo da colite ulcerativa, é utilizado DSS para a indução inflamatória e camundongos como animais de experimentação.

5.3. CUIDADOS GERAIS

No biotério, é necessário manter a voz baixa, não utilizar pulseira, relógio, perfume, creme e quaisquer produtos com cheiro aversivos aos animais, todos estes comportamentos que podem aumentar o estresse nos animais e alterar o experimento.

5.4. HIGIENIZAÇÃO DO BIOTÉRIO

O bebedouro e os mini-isoladores são lavados com detergente neutro e água, e no caso dos mini-isoladores, é também utilizado hipoclorito de sódio na secagem delas, para desinfetá-las. Sendo toda essa limpeza destes itens realizada uma vez por semana. Além disso, no corredor do biotério é feito semanalmente a utilização de herbalvet no chão, como desinfetante, para garantir a proteção contra infecção por microrganismos.

5.5. MANEJO DAS COBAIAS

Quando os roedores chegam no biotério para o uso nos experimentos, é realizada uma semana de aclimação, para a adaptação destes animais e evitar estresse pela mudança de ambiente. Nos experimentos animais com os roedores, para alojá-los é utilizado

mini-isoladores ventilados, na qual no aramado do mini-isolador há um espaço embutido de comedouro e bebedouro, com o espaço do bebedouro suficiente para acomodar um bebedouro de 400 ml.

Estes animais ficam em uma sala de biotério com refrigeração ideal para eles, de 22 graus, podendo variar para mais ou para menos em 2 graus. Os mini-isoladores ficam em uma rack ventilada no biotério, com aberturas de ar dos mini-isoladores acopladas a um sistema da máquina de ventilação da rack, que distribui e troca o ar dos mini-isoladores. É utilizado uma ferramenta de iluminação automatizada que inverte o ciclo diário, já que estes animais são noturnos.

É realizada a troca de água, dos mini-isoladores e pesagem dos roedores toda semana e de ração quando necessário reposição.

Os camundongos são manuseados pela base da cauda deles para a pesagem e troca de caixa, realizados uma vez por semana, para não aumentar o estresse nos animais, e eles são organizados entre 2 a 5 animais por caixa, de acordo com o delineamento do experimento e com comportamento social deles. Diferente dos camundongos, os ratos são manuseados pela parte dorsal, próximo da parte posterior do pescoço.

O método de marcação utilizado nos roedores é não-definitivo, sazonal, com caneta permanente, sendo refeita de acordo com o desaparecimento da marcação.

6. CONCEITOS

6.1. MICROBIOTA INTESTINAL

6.1.1. Formação e composição da microbiota intestinal

O termo “Microbiota” se refere a todos os microrganismos que coexistem e habitam o corpo humano, sendo eles várias espécies de bactérias, arqueas, fungos, bacteriófagos e vírus eucarióticos. Estes microrganismos são geralmente comensais ou mutualísticos, e habitam principalmente a cavidade oral, o trato intestinal, a cavidade vaginal e a pele. Dos *habitats* citados, a maioria da microbiota está presente no intestino, principalmente no cólon do intestino grosso. (Adak e Khan, 2019; Fan e Pederson, 2021)

Na microbiota intestinal há o predomínio bacteriano dos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Cianobactéria*, destes filos, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* correspondem a 90% da população microbiana. Do filo dos *Bacteroidetes* predomina os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, já no filo dos *Firmicutes* predomina os gêneros *Clostridium*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*. Por conta da variação das condições do microambiente ao longo do trato intestinal, há muita variação na composição da microbiota intestinal ao longo do trato. No intestino grosso, principalmente no cólon, região onde há maior predominância da microbiota por conta da diminuição do trânsito dos alimentos e da diminuição da acidez, há o predomínio dos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus* no lúmen intestinal, e *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Akkermansia* associados à mucosa. (Adak e Khan, 2019; Fan e Pederson, 2021)

A diversidade e composição da microbiota intestinal varia individualmente de acordo com o tipo de parto, alimentação no início da infância (leite materno ou fórmula), estilo de vida, uso de antibióticos, fatores genéticos, idade e geografia. (Adak e Khan, 2019; Fan e Pederson, 2021)

Embora haja muita discussão e não exista um consenso sobre a alta diversidade estável da microbiota intestinal, com microrganismos relacionados às funções importantes são definidas como uma microbiota saudável, e a ausência disto é associada a desordens metabólicas relacionadas a diferentes doenças. A microbiota intestinal saudável se consolida a partir da infância tardia e permanece relativamente estável (em condições de saúde) até a

velhice, onde ocorre uma diminuição da diversidade microbiana intestinal, principalmente por conta de alterações nas funções imunes. Uma microbiota intestinal saudável estável é geralmente associada com uma dieta baseada em alto consumo de fibras e baixo consumo de gordura animal e proteína animal. (Fan e Pederson, 2021)

6.1.2. Funções da microbiota intestinal na saúde humana

A microbiota intestinal possui importantes funções na imunidade do hospedeiro, na digestão de alimentos, na regulação de funções endócrinas e na sinalização neurológica, além de atuar na metabolização e ação de fármacos, eliminação de toxinas e produção de inúmeros compostos importantes para o hospedeiro. A microbiota intestinal saudável inclui um grupo de bactérias com ação funcional de degradar glicosaminoglicanos, carboidratos e outros produtos da dieta, promovendo a produção de diferentes metabólitos, entre eles, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), além de promover a síntese de lipopolissacarídeos específicos e de alguns aminoácidos essenciais e vitaminas. (Fan e Pederson, 2021)

A metabolização de fibras dietéticas pelos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal produz os AGCCs, os quais são utilizados pelos colonócitos como uma fonte adicional de energia e causam uma diminuição no pH luminal. Além disso, os AGCCs também estão associados com a inibição da infiltração de toxinas de bactérias patogênicas pela barreira intestinal. Destes AGCCs, o acetato, butirato e propionato, após absorção, se ligam aos receptores acoplados à proteína G GPCR-41 e GPCR-43, que são expressos em diferentes tipos celulares. Nas células L enteroendócrinas, os AGCCs induzem a secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e do peptídeo YY (PYY), contribuindo para o aumento do gasto energético, redução da ingestão alimentar e melhora do metabolismo da glicose e da secreção de insulina. O butirato também é um ativador do receptor ativado por proliferador de peroxissomos- γ (PPAR γ) e um estimulador da β -oxidação e do consumo de oxigênio no intestino, o que mantém um ambiente anaeróbio no lúmen intestinal. O acetato, butirato e propionato também possuem importantes funções imunológicas, o acetato induz a expressão da enzima ALDH1A2 em células dendríticas, que converte a vitamina A em ácido retinóico, atuando na sinalização das células B e caliciformes na secreção de mucinas e imunoglobulina A, fortalecendo a função de barreira intestinal. O butirato ao se ligar com o GPCR-43, estimula a ativação de citocinas anti-inflamatórias, regula positivamente o FOXP3 das células Treg e inibe a atividade da histona desacetilase e regula negativamente a resposta inflamatória mediada pelo fator nuclear- $\kappa\beta$. Além disso, o butirato e o propionato em conjunto

inibem a inflamação induzida por LPS, ao ativar as células Treg e reduzindo as citocinas inflamatórias. (Adak e Khan, 2019; Fan e Pederson, 2021)

Alguns metabólitos da microbiota intestinal estão associados ao aumento da termogênese no tecido adiposo. O metabólito succinato estimula a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1), que atua aumentando a termogênese no tecido adiposo. Além disso, a microbiota intestinal metaboliza os ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários, que atuam no receptor TGR5 na liberação de GLP-1, o que também aumenta a termogênese no tecido adiposo. (Adak e Khan, 2019; Fan e Pederson, 2021)

Alguns metabólitos derivados de indol estão associados com a melhora da secreção de insulina, sensibilidade à insulina e a diminuição de risco de diabetes do tipo 2. A microbiota intestinal também sintetiza neurotransmissores, como catecolamina, histamina, ácido γ -aminobutírico e serotonina. (Adak e Khan, 2019; Fan e Pederson, 2021)

6.1.3. Aplicações no laboratório

No laboratório é estudado o uso de produtos com efeitos prebióticos para a regulação da microbiota intestinal. Essas pesquisas têm como objetivo a melhora e prevenção de DII, obesidade e diabetes do tipo 2, geralmente utilizando produtos com fibras dietéticas que são metabolizados em AGCCs, com foco nos efeitos anti-inflamatórios dos AGCCs e a relação dessas doenças com a inflamação crônica sistêmica.

6.2. DISBIOSE

6.2.1. Definição

Conforme discutido anteriormente, o conceito de microbiota saudável é incerto por conta de toda a variabilidade encontrada individualmente, da mesma forma, o conceito de disbiose, o qual se refere ao oposto de uma microbiota saudável, levanta muitas discussões. (Brüssow, 2019)

Dentre as definições do conceito de Disbiose, se encontram tanto as definições que associam a disbiose como uma perda de diversidade, perda das bactérias benéficas, o aumento de bactérias potencialmente patogênicas e a perda das funções metabólicas da microbiota, como também as que definem disbiose como mudanças na composição da microbiota em relação a uma microbiota saudável, com este último tipo de definição ligando a disbiose

diretamente a doenças, ou seja, comparando as microbiotas de indivíduos doentes com as microbiotas de indivíduos saudáveis. (Brüssow, 2019)

6.2.2. Dieta, fatores de risco e efeitos no metabolismo

A disbiose é associada a uma dieta baseada em alta gordura, alta proteína animal e baixa quantidade de fibras, além de uma vida sedentária, tabagismo, consumo de álcool e frequente constipação. Promove a infiltração na mucosa intestinal, e a inflamação intestinal e sistêmica, além da baixa produção de AGCCs. (Fan e Pederson, 2021)

A baixa quantidade de fibras e o subsequente aumento do tempo de passagem no intestino promove uma mudança no metabolismo da microbiota intestinal, na qual a parte da microbiota intestinal que preferencialmente metaboliza as fibras, acaba por aumentar a via de proteólise, ou seja, degradando mais as proteínas alimentares. Esse aumento da fermentação proteica, gera um aumento de ácidos graxos de cadeia ramificada, trimetilamina, ácidos orgânicos, H₂S, H₂ e CO₂ e traços de fenóis, aminas, indóis e amônia, que são associados com um aumento do PH luminal e a infiltração de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo lipopolissacarídeos (LPS), que aumentam no sangue e desencadeiam inflamação sistêmica de baixo grau e resistência à insulina. (Fan e Pederson, 2021)

6.2.3. Relação da disbiose com doenças

6.2.3.1. Disbiose na obesidade

A obesidade é uma desordem metabólica causada tanto por fatores genéticos e fatores ambientais, geralmente definida pelo índice de massa corporal (IMC), sendo classificado como obesidade um IMC acima de 30, porém esse padrão de IMC pode variar nos países. A obesidade é associada com desordens no metabolismo de lipídeos e glicose, inflamação crônica, estresse oxidativo e o aumento de riscos a várias doenças, como doenças cardiovasculares e diabetes. (Liu B-N. et al, 2021; Geng J. et al, 2022)

O desenvolvimento da obesidade é associado com a alteração na composição da microbiota intestinal, com essa alteração provocando uma maior extração e adsorção de calorias, uma redução na secreção de hormônios anorexígenos (GLP-1, PYY e leptina) e de saciedade, um aumento no armazenamento de gordura no tecido adiposo e danos na barreira

intestinal, aumentando a infiltração de LPS e inflamação. (Crovesy, Masterson e Rosado, 2020)

O filo *Firmicutes* é associado com a obesidade, enquanto os *Bacteroidetes* são associados com a redução de gordura. A relação entre os *Firmicutes* e a obesidade se dá por eles terem uma maior capacidade de extrair energia, por possuírem mais enzimas de metabolismo de carboidratos. Apesar dessa associação com os filos, as pesquisas demonstram muita variação nos gêneros e a relação da disbiose e obesidade parece estar mais ligada com alterações de espécies, já que há variação dentro dos mesmos gêneros bacterianos, com espécies sendo associada a obesidade e outras espécies sendo associada a diminuição do peso. Em geral, o aumento de *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Staphylococcus aureus*, *Prevotellaceae*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus gasseri*, e a diminuição de *Bacteroidetes*, *Akkermansia muciniphila*, *Oscillibacter*, *Alistipes*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacteroides vulgatus*, *Methanobrevibacter smithii* e *Lactobacillus paracasei* são associados com a obesidade. (Crovesy, Masterson e Rosado, 2020; Liu B-N. et al, 2021; Geng J. et al, 2022)

6.2.3.2. Disbiose na doença inflamatória intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença intestinal inflamatória idiopática, sendo caracterizada por uma inflamação crônica persistente e descontrolada no intestino. É dividida em 2 tipos: Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa. O desenvolvimento da DII é influenciado por múltiplos fatores, que incluem fatores genéticos, imunes e a microbiota intestinal. A Doença de Crohn é caracterizada por um processo inflamatório que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, sendo uma inflamação mais ampla, enquanto no tipo da Retocolite ulcerativa há uma inflamação localizada na camada mucosa do cólon e do reto. Apresenta períodos de remissão intercalado com recidiva dos sintomas, entre os sintomas o paciente pode apresentar dores abdominais, cólicas, fezes moles, diarreia com sangue, fadiga, anemia e perda de peso. (Qiu P. et al., 2022; Oligschlaeger Y. et al., 2019)

Indivíduos com DII apresentam uma microbiota intestinal alterada, se comparada com indivíduos saudáveis, com pacientes com Doença de Crohn possuindo uma disbiose maior que pacientes com retocolite ulcerativa. Pacientes com DII apresentam um aumento da *Intestinibacter spp.*, *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* e a redução de *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia intestinalis*. (Qiu P. et al., 2022; Oligschlaeger Y. et al., 2019)

Nos pacientes com Doença de Crohn há a diminuição de *Christensenellaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Coprococcus spp.* e *Clostridium leptum* e o aumento de *Actinomyces spp.* e *Veillonella spp.*. Já nos pacientes com colite ulcerativa há o aumento de *Eubacterium rectum* e *Bifidobacterium longum* e a diminuição da *Akkermansia muciniphila*. (Qiu P. et al., 2022; Oligschlaeger Y. et al., 2019)

A disbiose é associada com danos na barreira intestinal e o desenvolvimento da DII, principalmente pela redução das funções imunes da microbiota intestinal. A microbiota saudável está associada às funções imunes tanto pelo antagonismo e competição das bactérias comensais com as patogênicas, como também pela função imunomoduladora que os metabólitos produzem, principalmente os AGCCs, os ácidos biliares secundários e os indoís, que estão associados com atividade anti-inflamatória e com o reparo das células epiteliais do intestino. Assim, com a disbiose, há um aumento de bactérias patogênicas se infiltrando na mucosa intestinal e da inflamação. (Qiu P. et al., 2022; Oligschlaeger Y. et al., 2019)

6.3 PREBIÓTICO

6.3.1. Evolução do conceito

Em 1995, G. R. Gibson e M. Roberfroid, no artigo “Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics”, criam o conceito de Prebiótico, na qual eles definem como “ingrediente alimentar não-digerível que afeta benéficamente o hospedeiro por estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade de um ou um limitado número de bactérias no cólon, assim melhorando a saúde do hospedeiro”. Conforme eles descrevem no artigo, para um substrato se enquadrar neste conceito, é necessário cumprir os seguintes critérios:

- 1) Não ser hidrolisado nem absorvido no trato gastrointestinal superior
- 2) Ser um substrato seletivo para uma ou um número limitado de bactérias benéficas comensais do cólon, as quais são estimuladas para crescer e/ou ser metabolicamente ativas
- 3) Consequentemente, ser hábil a alterar a microbiota colônica em favor de uma composição mais saudável
- 4) E induzir efeitos luminiais ou sistêmicos que são benéficos a saúde do hospedeiro

Por conta da necessidade de ser resistente a digestão até o cólon, os carboidratos não-digeríveis são os melhores candidatos a prebióticos levantados, porém, eles concluem a

partir de outros estudos sobre fermentação cólica destes carboidratos, que apenas os frutooligossacarídeos são comprovadamente seletivos para bactérias benéficas (ao serem seletivos para *Bifidobacteria*) e cumprem todos os critérios. (Gibson e Roberfroid, 1995; Gibson et al., 2017)

Em 2004, G. R. Gibson em seu artigo “Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics” revisa os candidatos a prebióticos e conclui que apenas a inulina (frutooligossacarídeo), os trans-galactooligossacarídeos e a lactulose satisfazem os critérios e podem ser classificados como prebióticos.

Além disso, neste artigo o autor afirma que o conceito clássico considera apenas mudanças microbiais no cólon, e para extrapolar isso, ele modifica o conceito para: “Um prebiótico é um ingrediente seletivamente fermentado que promove mudanças específicas, tanto na composição e/ou atividade na microflora gastrointestinal que confere benefícios no bem estar e saúde do hospedeiro”. (Gibson, 2004; Gibson et al., 2017)

Com o tempo, as pesquisas e o desenvolvimento de prebióticos foram expandindo de escopo, para além da aplicação somente no trato gastrointestinal, assim, em 2008 a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) organizou uma reunião técnica para atualizar a definição de prebióticos, no artigo “FAO Technical meeting on prebiotics”, redefinindo o conceito para “um componente alimentar não viável que confere um benefício à saúde do hospedeiro associado à modulação da microbiota”. (Pineiro et al., 2008; Gibson et al., 2017)

Em 2010, G. R. Gibson, no artigo “Dietary prebiotics: current status and new definition”, cria uma categoria mais restrita nomeada de “prebióticos dietéticos” e definida como “um ingrediente fermentado seletivamente que resulta em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefício(s) à saúde do hospedeiro”. (Gibson, 2010; Gibson et al., 2017)

A partir dessas propostas de mudanças do conceito, além de outras, e da necessidade de chegar a um consenso sobre a definição, em 2017 a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) realizou um painel de consenso com vários especialistas, a partir da qual, chegou na seguinte definição: um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos hospedeiros conferindo um benefício à saúde. (Gibson et al., 2017)

6.3.2. Consenso sobre substâncias prebióticas

Os tipos de prebióticos com bastante evidências, e que são geralmente os mais pesquisados e utilizados na indústria, são os frutooligossacarídeos (FOS, também chamadas de frutanos), galactooligossacarídeos (GOS, também chamados de galactanos), além destes, a lactulose, com menos estudos e menos utilizada, também é citada como prebiótico. (Gibson et al., 2017; Davani-Davari et al., 2019)

Outros candidatos a prebióticos, bastante estudados, mas que as pesquisas apontam a necessidade de mais evidências para a confirmação como prebióticos, são: Amido resistente, polidextrose, isomalto-oligossacarídeos, xilooligossacarídeos, pectina, oligossacarídeos do leite humano e polifenóis. (Gibson et al., 2017; Davani-Davari et al., 2019)

6.3.3. Aplicações no laboratório

Como a pesquisa com prebióticos no laboratório é focada na modulação benéfica da microbiota intestinal a partir da ingestão de produtos naturais, a definição utilizada pelo laboratório é a original, todavia, o laboratório também pesquisa produtos com substâncias que não são substratos não digeríveis, como açúcares, alguns tipos de fibras solúveis ou polifenóis glicosilados, mas não trabalha com eles os classificando como candidatos a prebióticos, apenas os classificando como substâncias ou produtos com efeitos prebióticos. Não havendo assim, no laboratório, um foco em provar novos prebióticos, conforme os requisitos e discussão abordada anteriormente, mas sim em utilizar produtos com estes efeitos para a modulação da microbiota intestinal.

Alguns exemplos de produtos já pesquisados pelo laboratório e seus substratos constituintes de interesse em efeito prebiótico: farinha de banana verde (amido resistente), extrato solúvel de chá mate (polifenóis), bagaço de laranja (pectina), café (fibras de baixo peso molecular, glicose, sacarose e frutose) e resíduo de cevada (fibras solúveis de baixo peso molecular e aminoácidos).

7. CONCLUSÃO

O estágio curricular obrigatório é um componente importante para a formação do Biólogo por permiti-lo ter contato com a aplicação prática da área, além de dar a oportunidade de observar a relação no dia a dia da teoria com a prática nos laboratórios.

O estágio me permitiu conviver o cotidiano do laboratório e entender na prática a relação dos processos científicos com a teoria das linhas de pesquisa do laboratório, permitindo minha formação tanto nos métodos utilizados, como também na teoria, dando a oportunidade de vivenciar frutíferas discussões teóricas, assim como a vivenciar e compreender o cotidiano de um pesquisador e de um laboratório, cotidiano esse que não é possível compreender somente com as disciplinas da graduação. Sendo assim, o estágio foi importante para complementar a minha formação e possibilitar uma formação completa como biólogo.

REFERÊNCIAS

- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cell Mol Life Sci.** v. 76, p. 473–493, 2019.
- BARTLE, K. D; MYERS, P. History of gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry.** v. 21, n. 9-10, p. 547-557, 2002.
- BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. Chromatographic Methods. 5. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.
- BRÜSSOW, H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. **Microb Biotechnol.** v. 13, n. 2, p. 423-434, 2019.
- COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology.** v. 123-124, n. 1, p. 421-444, 2005.
- CROVESY, L.; MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition.** v. 74, n. 9, p. 1251–1262, 2020.
- DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods.** v. 8, n. 3, p. 92, 2019.
- ETTRE, L. S. Unified nomenclature for chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography.** v. 16, n. 4, p. 258-261, 1993.
- ETTRE, L. S. Chapters in the evolution of Chromatography. 1. ed. Londres: Imperial College Press, 2008.
- FAN, Y.; PEDERSON, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nat Rev Microbiol.** v. 19, p. 55–71, 2021.
- FANALI, S. et al. Liquid Chromatography. [s.l.] Elsevier, 2023.
- GENG, J. et al. The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 147, p. 112678, 2022.
- GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Sci. Tech. Bull. Funct. Food.** v. 7, p. 1–19, 2010.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v. 14, P. 491–502, 2017.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.** v. 125, p. 1401–1412, 1995.

LIPAY, Monica V N.; BIANCO, Bianca. *Biologia Molecular - Métodos e Interpretação*. Rio de Janeiro: Roca, 2015. E-book. ISBN 978-85-277-2768-6. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2768-6/>. Acesso em: 12 jun. 2025.

LIRA, E. C. (org.). **Bioética e manejo de animais em laboratório**. [s.l] Atena Editora, 2022. *E-book*. ISBN: 978-65-258-0130-8. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/bioetica-e-manejo-de-animais-de-laboratorio>. Acesso em: 16 jun. 2025.

LIU, B.-N. et al. Gut microbiota in obesity. **World J Gastroenterol**. v. 27, n. 25, p. 3837–3850, 2021.

MELLO, F. P. F. de. **Fermentação in vitro no mapeamento de atividade prebiótica em produtos de origem vegetal**. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, 2024.

OLIGSCHLAEGGER, Y. et al. Inflammatory Bowel Disease: A Stressed “Gut/Feeling”. **Cells**. v. 8, n. 7, p. 659, 2019.

QIU, P. et al. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 12, 2022.