

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 22/02/2026.



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

IBB/IBILCE



TESE DE DOUTORADO

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

Fábio Perez Ferraz de Mello

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi



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



TESE DE DOUTORADO

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

Fábio Perez Ferraz de Mello

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

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

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

Mello, Fabio Perez Ferraz de.

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

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

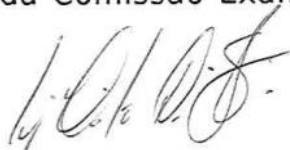
1. Fermentação. 2. Microbioma Gastrointestinal. 3. Prebióticos.

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

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

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

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI



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



Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Prólogo

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

Atividades realizadas ao longo do doutorado (2019-2023)

1. Disciplinas cursadas

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

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

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

2. Participação em eventos científicos presenciais

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

3. Formação Complementar

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

4. Publicações

Artigo

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

Capítulo de livro

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

5. Colaboração em outros projetos de pesquisa

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

6. Outras atividades

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

Sumário

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

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

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

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

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

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

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

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

Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1) Alimentos *in natura* ou minimamente processados

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

2) Óleos, Gorduras, Sal e Açúcar

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

3) Alimentos Processados

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

4) Alimentos Ultraprocessados (AUP)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Considerações Finais

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

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

2. Pós-fácio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Referências

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