

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Modulação da Microbiota Intestinal de Camundongos *Mus Musculus Domesticus* Por Meio de Dieta Hiperlipídica
Adicionada Polpa de Bocaiuva

Autora: Thais Maryelle dos Santos Costa Ponce.

Orientadora: Dra. Alinne Pereira de Castro.
Co-orientadora: Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Modulação da Microbiota Intestinal de Camundongos *Mus Musculus Domesticus* Por Meio de Dieta Hiperlipídica adicionada Polpa de Bocaiuva

Autora: Thais Maryelle dos Santos Costa Ponce.

Orientadora: Dra. Alinne Pereira de Castro.

Co-orientadora: Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães.

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia”

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Dezembro – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Católica Dom Bosco
Bibliotecária Mourâmise de Moura Viana - CRB-1 3360

C837m Costa, Thais Maryelle dos Santos
Modulação da microbiota intestinal de camundongos
Mus Musculus Domesticus por meio de dieta hiperlipídica
adicionada polpa de bocaiuva/ Thais Maryelle dos Santos
Costa sob orientação da profa. Dra. Alinne Pereira
de Castro e coorientação da profa. Dra. Rita de Cássia
Avellaneda Guimarães.-- Campo Grande, MS : 2020.
67 p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, Ano 2020
Inclui bibliografias

1. Obesidade - Biotecnologia. 2. Prebióticos. 3. Flora
intestinal - Biotecnologia. Castro, Alinne Pereira.
II. Guimarães, Rita de Cássia Avellaneda. III. Título.

CDD: Ed. 21 -- 660.6

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS *MUS MUS DOMESTICUS* POR MEIO DE DIETA HIPERLIPÍDICA ADICIONADA POLPA DE BOCAIUVA

Autora: Thais Maryelle dos Santos Costa Ponce

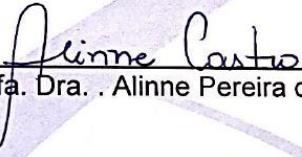
Orientadora: Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimarães

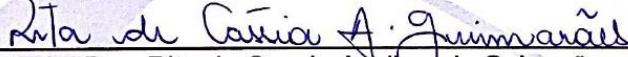
TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 12 de dezembro de 2019.



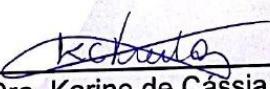
Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB



Profa. Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimarães - UFMS



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB



Profa. Dra. Karine de Cássia Freitas - UFMS

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL
CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-3300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e da saúde, por me conceder a oportunidade de crescer emocionalmente e intelectualmente. Agradeço imensamente a Ele, o doador e consolador da vida. Não seria possível está conquista sem a presença constante do Criador em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Dagmar dos Santos Costa e Neuma dos Santos Costa, por não medirem esforços em me proporcionar uma boa formação educacional. Obrigada pelo apoio ético e moral que sempre me deram e por terem sido pais em tempo integral. Em vocês sempre encontrei amparo e auxílio nas horas mais difíceis. Vocês são minhas maiores riquezas.

Ao meu irmão, Thiago dos Santos Costa, agradeço por sempre acreditar em mim, pelo apoio moral, sorrisos despretensiosos e confiança incondicional. Meu irmão mais novo que cuida de mim como irmão mais velho. Obrigada por ter me ajudado a não desistir. A realização desse sonho também é sua.

Ao meu marido, Jader Carlos Ponce, agradeço a companhia até as altas horas de madrugada, por ter sido o porto seguro nas horas de angústia e aflição. Meu companheiro dos momentos mais difíceis e felizes. Obrigada por enxugar as minhas lágrimas.

Agradeço imensamente minha Orientadora Prof^a Dra. Alinne Pereira de Castro, por ter me ajudado a trilhar este caminho. Me espelho na professora que és, na humildade das palavras, no caminhar lado a lado, no olhar compassivo, na mão auxiliadora e no abraço acolhedor. Obrigada por me ensinar que muito além de títulos

vale o ser humano. Agradeço por não ter desistido de mim nesse caminhar. Amo-te muito.

A minha Co-orientadora Prof^a Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães, agradeço o incentivo e o lindo projeto arquitetado na UFMS, que tive o privilégio de dar continuidade e colher bons resultados.

Aos meus amigos do grupo do mestrado, meus parceiros de lutas. Levarei vocês para sempre em meu coração. Em especial Natali Calças e Fernanda, por sempre acreditarem em mim, quando eu mesma deixei de acreditar. Os ombros mais quentes que já chorei. Obrigada pelo carinho a mim dispensado.

Às minhas amigas e colegas de profissão, Prof Dra. Rosângela dos Santos Ferreira e Dra. Lígia Mendonça. O incentivo na caminhada e a visão que me faltava encontrei em nossa amizade. Me inspiro em vocês, são excelentes profissionais.

Às técnicas do laboratório SINOVA *Biotch*, por auxiliarem na realização dos experimentos.

Minha gratidão à Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) por dispor de estrutura física para a realização deste projeto, bem como pelo corpo docente de alta qualidade. Igualmente, estendo meus agradecimentos a Fundação de apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/ MS) pela bolsa de estudo que me proporcionou solidez no desenvolvimento desse projeto.

E por fim, agradeço a todos que caminharam ao meu lado nesses dois anos, de alguma forma fizeram parte dessa conquista.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 OBESIDADE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	2
2.2 OBESIDADE E ASPECTOS INFLAMATÓRIOS	4
2.3 BOCAIUVA (<i>Acrocomia aculeata</i>): ASPECTOS TAXONÔMICOS	7
2.4 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE BOCAIUVA	9
2.5 PREBIÓTICO	11
2.6 OS BENEFÍCIOS DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC)	13
2.7 MICROBIOTA INTESTINAL	15
2.8 MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE	17
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	22
4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E SECAGEM POR LIOFILIZAÇÃO	23
4.3 DIETA	23
4.4 AMOSTRAS FECAIS	24
4.5 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL	24
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	25
4.7 ANÁLISE DE DNA POR ELETROSFORESE EM GEL DE AGAROSE	26
5. RESULTADOS	27
5.1 EXTRAÇÃO DE DNA	27

	vii
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA	28
5.3 ANÁLISE DOS DADOS	29
6. DISCUSSÃO	37
6.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
6.2 MICROBIOTA INTESTINAL	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Relação da Obesidade na Região Centro Oeste (Fonte: Produção do próprio autor).....	3
Figura 2: <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) (A e C) Palmeira com frutos; (B) Polpa; (E) Amêndoas; (D) Florescência (F e G); (H) Frutos no solo (Fonte: Acervo pessoal)	7
Figura 3: Distribuição geográfica do Cerrado pelos Estados do Território Nacional. MG (estado de Minas Gerais); MA (estado do Maranhão); MT (estado de Mato Grosso); PI (estado do Piauí); TO (estado de Tocantins); BA (estado da Bahia); GO (estado de Goiás) (Fonte: próprio autor)	8
Figura 4: Alterações na abundância e composição dos micro-organismos ao longo do trato intestinal em humanos. Fonte: Adaptada de SEKIROV et al (2010)	16
Figura 5: Diagrama da divisão dos grupos	22
Figura 6: Esquema do processamento de amostra fecal	25
Figura 7: Extração de DNA fecal das 18 amostras demonstrada por Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. 1Kb plus DNA Ladder, CHF8/ CHF9/ CHF10: Amostras do grupo controle <i>high Fat</i> , tempo 0: CS2/ CS3/ CS4: Amostras do grupo controle SHAM, tempo 0: CHFP4- 3/ CHFP4-4/ CHFP4-5: Amostras do grupo controle com 4% de Polpa liofilizada, tempo 0. FHF8/ FHF9/ FHF10: Amostra do grupo <i>high Fat</i> , tempo final: FS2/ FS3/ FS4: Amostras do grupo SHAM, tempo final: FHFP4-3/ FHFP4-4/ FHFP4-5: Amostras do grupo com 4% de Polpa liofilizada, tempo final.....	28
Figura 8: Abundância relativa dos filos bacterianos associados ao consumo da polpa liofilizada de bocaiuva. As sequências dos genes do 16S rRNA foram classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle <i>high fat</i> , FHF: <i>high fat</i> final, CHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% controle, FHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% final.....	30
Figura 9: Curva de rarefação, estimado por OTUs observados das sequências do gene rRNA das fezes de camundongos <i>Mus musculus domesticus</i> , com um ponto de corte de 3%, calculada a partir de valores mínimos de sequência para comunidade de bactérias. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle <i>high fat</i> , FHF: <i>high fat</i> final, CHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% controle, FHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% final	31
Figura 10: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene do 16S rRNA das amostras de fezes do <i>Mus musculus domesticus</i> . Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Pearson. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle <i>high fat</i> , FHF: <i>high fat</i> final, CHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% controle, FHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% final	32
Figura 11: Box plot demonstrando a distribuição de proporção relativa de abundância referente a filos bacterianos. (A): <i>Deferribacteres</i> b): <i>TM7</i> (c): <i>Proteobacteria</i> (d): <i>Firmicutes</i> . O valor mediano é mostrado como uma linha dentro da caixa e o valor médio como uma estrela. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle <i>high fat</i> , FHF: <i>high fat</i> final, CHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% controle, FHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% final.	33
Figura 12: Box plot demonstrando a distribuição de proporção relativa de abundância referente a gêneros bacterianos. (A): <i>Blautia</i> (B): <i>Lactobacillus</i> . O valor mediano é	

mostrado como uma linha dentro da caixa e o valor médio como uma estrela. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle <i>high fat</i> , FHF: <i>high fat</i> final, CHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% controle, FHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% final	34
Figura 13: Proporção relativa de abundância referente a gêneros bacterianos. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por último o <i>p</i> -value indicando se a proporção média é igual para um determinado par. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle <i>high fat</i> , FHF: <i>high fat</i> final, CHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% controle, FHFP4: <i>high fat</i> polpa 4% final	36

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Composição centesimal de polpa de bocaiuva	10
Tabela 2: Fibras alimentares da polpa liofilizada de bocaiuva (Fonte: FERNANDES et al., 2018)	11
Tabela 3: Composição das dietas experimentais formuladas (g/kg) de acordo com a AIN93-M, pela UTASP da UFMS, 2016	24
Tabela 4: Concentração das amostras em ng/uL, quantificadas via Qubit® (Life tecnologies)	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta

AIN93-M: Dieta do American *Institute of Nutrition* para animais adultos (em fase de manutenção) for maintenance

ATP: *Adenosina Trifosfato*

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CCBS: Centro de Ciências Biológicas da Saúde

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA: *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's: *Desoxirribonucleotídeos Fosfatados*

DPM: Desvio Padrão da Média

FUNDECT: Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do sul

kcal: Quilocaloria

kg: Quilograma

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomas

MI: Microbiota intestinal

mg: Miligramas

mL: Mililitro

µM: Micromolar

µL: Microlitro

ng: Nanograma

OTU: Unidade Taxonômica Operacional

pb: Pares de bases

PCoA: Principal Coordinates Analysis – Análise de Coordenadas Principais PCR: *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology xii

rDNA: *Ribossomal deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico ribossômico

RNA: Ribonucleic acid – Ácido Ribonucleico

TGI: Trato gastrintestinal

UCDB: Universidade Católica Dom Bosco

UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

16S rDNA: Menor subunidade do gene 16S do DNA ribossômico

RESUMO

A obesidade é considerada uma epidemia pois atinge cerca de 37,9% da população adulta brasileira, sendo Campo Grande a capital que possui o maior número de adultos obesos 27,9 %. A obesidade é definida como uma doença crônica inflamatória de baixo grau, por envolver marcadores e citocinas inflamatórias. Dessa maneira, pesquisas tem sido realizada com o foco de prevenir ou intervir nesta doença. É evidenciado que a comunidade bacteriana intestinal está envolvida na etiopatogênese da obesidade. As fibras apresentam características físico-químicas importantes na modulação dessa comunidade bacteriana, por esse motivo, são consideradas essenciais e de extrema importância para o consumo humano. Nesse contexto, destaca-se o fruto *Acrocomia aculeata*, predominante na região do cerrado e popularmente denominada bocaiuva, pois apresenta em sua composição significativa concentração de fibra solúvel e insolúvel. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar o perfil da comunidade bacteriana intestinal de camundongos da linhagem Swiss, induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica (*high fat*) e tratados com 4% de polpa liofilizada de bocaiuva. Sendo assim, no tempo inicial, foram coletadas amostras fecais de 9 camundongos Swiss adultos machos, distribuídos nos grupos experimentais, controle (CS n=3), *high fat* (CHF n= 3) e Polpa de bocaiuva à 4% (CHFP4 n= 3), e no tempo final (após 90 dias de tratamento) Novas amostras de fezes foram coletados dos grupos experimentais: FS (n=3), FHF (n=3) e FHFP4 (n=3), totalizando 18 amostras analisadas. Para avaliar a comunidade bacteriana, a extração direta de DNA metagenômico foi realizada a partir de amostras fecais, seguido pela amplificação do gene 16S rDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR), e posterior sequenciamento de DNA em plataforma *Illumina HiSeq*. Como resultado, o filo Firmicutes apresentou maior abundância relativa em todos os grupos analisados, seguido pelos filos Bacteroidetes, Proteobacteria, Deferribacteres e Actinobacteria. Em nível de gênero, a abundância relativa de *Blautia*, *Paenibacillus* e *Lactobacillus* foram maiores no grupo CHFP4 e FHFP4. Por sua vez, os grupos CS, CHF e CHFP4 apresentaram similaridade nas comunidades bacterianas. Diante do exposto, a dieta *high fat* acrescida de 4% de polpa de Bocaiuva, foi capaz de modular a microbiota intestinal, principalmente no nível de gênero. Diante da perspectiva de estudo metagenômico, esta pesquisa demonstrou que a associação de fibra alimentar a dieta, poderá auxiliar na intervenção nutricional da obesidade.

Palavras chaves: Obesidade, Prebióticos, Microbiota Intestinal.

ABSTRACT

Obesity is considered an epidemic because it affects about 37.9% of the Brazilian adult population, being Campo Grande the capital that has the largest number of obese adults 27.9%. Obesity is defined as a low-grade chronic inflammatory disease, involving inflammatory markers and cytokines. Thus, research has been conducted with the focus of preventing or intervening this disease. It is evident that the gut bacterial community is involved in the etiopathogenesis of obesity. Fibers have important physicochemical characteristics in the modulation of this bacterial community, so they are considered essential and extremely important for human consumption. In this context, stands out the fruit *Acrocomia aculeata*, predominant in the cerrado region and popularly called of bocaiuva, because it has in its composition a significant concentration of soluble and insoluble fiber. Therefore, the aim of the present study was to verify the profile of the gut bacterial community of Swiss mice induced by obesity by high fat diet and treated with 4% bocaiuva lyophilized pulp. Thus, in the initial time, fecal samples were collected from 9 male adult Swiss mice, distributed in the experimental groups, control (CS n = 3), high fat (CHF n = 3) and bocaiuva pulp at 4% (CHFP4 n = 3), and at the final time (after 90 days of treatment) new fecal samples were collected from the experimental groups: FS (n = 3), FHF (n = 3) and FHFP4 (n = 3), totaling 18 samples analyzed. To evaluate the bacterial community, direct DNA metagenomic extraction was performed from fecal samples, followed by amplification of the 16S rDNA gene by polymerase chain reaction (PCR), and subsequent DNA sequencing on Illumina HiSeq platform. As a result, the Firmicutes phylum presented higher relative abundance in all groups analyzed, followed by the Bacteroidetes, Proteobacteria, Deferribacteres and *Actinobacteria*. At gender level, the relative abundance of *Blautia*, *Paenibacillus* and *Lactobacillus* were higher in group CHFP4 and FHFP4. In turn, groups CS, CHF and CHFP4 showed similarity in bacterial communities. In this context, the high fat diet plus 4% Bocaiuva pulp was able to modulate the gut microbiota, especially at gender level. From the perspective of a metagenomic study, this research demonstrated that the association of dietary fiber with diet may help in the nutritional intervention of obesity.

Keywords: Obesity, Prebiotics, Gut Microbiota.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica inflamatória de grande impacto para a saúde pública mundial, atingindo cerca de 37,9 % da população adulta brasileira (BRASIL.,2014). Dessa maneira, pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de demonstrar o envolvimento das bactérias intestinais na etiopatogênese da obesidade e de outra Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs) (CANI *et al.*, 2009). Nesse contexto, estudos contemporâneos consolidaram a associação da microbiota intestinal com o excesso de peso corporal, e observou que indivíduos com peso adequado e os obesos possuem composição diferentes de micro-organismos intestinais (LEY *et al.*, 2005;) WENSVEEN *et al.*, 2015).

Sabe-se que a comunidade microbiana pode variar de acordo com as características individuais e ambientais, levando em consideração o modo de nascimento (parto normal ou cesariana), a idade, medicação, gênero e hábitos alimentares (TOJO *et al.*, 2014; MARIETA *et al.*, 2015). Porém, dentre estas, destaca-se a dieta que tem sido desde há muito considerada uma das principais moduladoras externas da microbiota intestinal (MI) (SALENEN e DE VOS, 2014).

Além disso, o intestino humano só é capaz de fermentar fibras dietéticas devido a síntese de enzimas pela microbiota intestinal. A metabolização através dessas enzimas permite que os polissacarídeos não digeríveis a monossacarídeos e a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (ROBERFROID M *et al.*, 2010). Nesse âmbito, o processo fermentativo dos carboidratos não-digeríveis e consequente síntese dos AGCC é complexo e significativamente benéfico para o metabolismo orgânico, pois propicia aumento da saciedade, e garante níveis adequados de glicose plasmática e lipídios séricos (PADDU *et al.*, 2014;)

Diante do exposto, dietas enriquecidas com polpa liofilizada de *Acrocomia aculeata* (bocaiuva), apresentam-se como importantes fontes de fibras alimentar, além de elevados teores de proteínas, vitaminas e minerais (ARRUDA *et al.*, 2012) que auxiliam na modulação intestinal do organismo, uma vez que, frutos com grande aporte fibroso aumentam a fermentação bacteriana (MORRISON; PRESTON, 2015).

Ainda são escassos os estudos sobre modulação da microbiota intestinal e que determinam quais as bactérias que estão relacionadas ao processo inflamatório de DCNTs. Neste contexto, o sequenciamento em larga escala de DNA metagenômico,

permitirá o conhecimento sobre a diversidade e abundância da comunidade bacteriana em relação ao efeito de dietas enriquecidas com polpa liofilizada da bocaiuva sobre a microbiota intestinal. Além disso, irá proporcionar um banco de dados para posteriormente ser utilizado para subsidiar estudos futuros.

Por fim, esse estudo se justifica por verificar o perfil da comunidade bacteriana presente em organismos metabolicamente descompensados pela indução da obesidade, antes e após tratamento com dieta apresentando concentração de 4% de polpa de Bocaiuva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OBESIDADE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.

Nas últimas décadas, a dieta ocidental tem prejudicado significativamente a qualidade alimentar da população, devido ao incentivo ao consumo de alimentos 'rápidos' e 'convenientes'. Porém, esses alimentos apresentam alta densidade energética e baixo teor de fibra dietética, sendo que este último resulta em um menor sinal de saciedade, ocasionando assim, uma maior demanda alimentar e o aumento do tecido adiposo (POPKIN *et al.*, 2012). Nesse contexto, o aumento excessivo do tecido adiposo no organismo, também denominado obesidade, é considerado atualmente como uma doença crônica inflamatória de grande impacto sobre a saúde pública mundial, (WHITE *et al.*, 2013), fato atribuído a um desequilíbrio na ingestão e gasto energético ao longo de um período prolongado (FRANÇA *et al.*, 2012).

Os mecanismos etiológicos da obesidade se relacionam com causas multifatoriais de ordem genética, ambiental, social, econômica, cultural, nutricional, metabólica, psicológica, neurológica e endócrina (GONNELLI *et al.* 2014).

O Índice de massa corporal (IMC) de acordo com a Organização Mundial da saúde (OMS) é a ferramenta comumente utilizada para o diagnóstico nutricional. Baseia-se na razão entre o peso do indivíduo e a altura ao quadrado (Kg/m^2), sendo classificado como eutrófico indivíduos com o IMC de 18,5 a 24 kg/m^2 e obeso igual ou superior a 30 kg/m^2 . O índice de gordura corporal é uma segunda abordagem realizada para o diagnóstico da obesidade, por mensurar a gordura corporal através de aparelhos com tecnologia mais avançada, principalmente quando combinado com

a medida da circunferência da cintura, que não deve ser maior que 94 centímetros (cm) no homem e 80 cm na mulher. (PI- SUNYER *et al.*, 1998; SPEAKMAN, 2004). Com a utilização do IMC, são feitos estudos na ótica da epidemiologia, com objetivo de avaliar o impacto da obesidade no âmbito nacional e internacional (ANJOS *et al.*, 2017).

Em relação aos estudos epidemiológicos, levantamentos realizados em todo o país apontam que a obesidade atinge cerca de 37,9% de toda a população adulta brasileira, (Figura 1). De acordo com a vigilante 2017, é possível verificar que as capitais Macapá, Campo Grande e Porto Velho possuem as maiores concentrações de homens obesos (28,5%, 27,6% e 25,2%) respectivamente, já em relação as porcentagens de mulheres obesas, observa uma variação de 24,1%, 21,1% e 20,9% nas capitais Manaus, Recife e Cuiabá.



Figura 1: Relação da Obesidade na Região Centro Oeste (Fonte: Produção do próprio autor).

2.2 OBESIDADE E ASPECTOS INFLAMATÓRIOS

A obesidade é considerada uma inflamação crônica de baixo grau, devido à elevação de marcadores e citocinas inflamatórias na presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco (TAB) (LEITE *et al.*, 2009). O tecido adiposo está dividido em três citotipos, tecido adiposo marrom (TAM), responsável pela produção de calor (termogênese), sendo produzido em menor quantidade pelo organismo humano, o tecido adiposo bege descoberto recentemente, são consideradas células adiposas benéficas por ajudar na perda de peso através da queima de calorias, enquanto o tecido adiposo branco (TAB), apresenta uma maior distribuição pelo corpo e tem sido considerado um órgão dinâmico, por secretar múltiplos peptídeos bioativos, denominados adipocinas, (WU *et al.*, 2012; WENSVEEN *et al.*, 2015)

As adipocinas envolvidas na patogênese da obesidade, possuem ações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014). De acordo com Athyros e colaboradores (2010), as adipocinas possuem mecanismos em todo o organismo, sendo responsáveis pela homeostasia como o controle da ingestão alimentar e balanço energético, ação da insulina, angiogênese, homeostase vascular, controle da pressão sanguínea e da coagulação. Visto os processos fisiopatológicos envolvendo o desequilíbrio da secreção das adipocinas, torna-se um fator fundamental para gênese da síndrome metabólica (DUNMORE; BROWN, 2013; SIPPEL *et al.*, 2014).

Entre as adipocinas citam-se, o Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α); interleucina 6 (IL-6); resistina; proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1); leptina; adiponectina; interleucina 10 (IL-10). São adipocinas existentes no processo inflamatório da obesidade, sendo que muitas ainda estão sendo identificadas. (MATTU; RANDEVA *et al.*, 2013).

O TNF – α é uma citocina pró-inflamatória produzida por adipócitos e sua principal função é promover as respostas imune e inflamatória (MOTTA *et al.*, 2013). No tecido adiposo de indivíduos obesos essa adipocina apresenta uma maior concentração e está envolvida na resistência à insulina, por inibir a fosforilação da tirosina presente no substrato -1 do receptor de insulina (IRS) (SIPPEL *et al.*, 2014).

A IL- 6 também é uma citocina pró-inflamatória, secretada por células endoteliais, musculares lisas, monócitos e macrófagos (MIRAGLIA; MELL O, 2012; PINTO, 2014; SIPPEL *et al.*, 2014;). A concentração de IL-6 no organismo influência seu campo de atuação. Agindo, tanto no tecido periférico quanto no sistema nervoso central, podendo alterar o peso corporal, a homeostase energética e a sensibilidade insulínica. Além de estimular a produção de proteína C reativa (PCR), uma proteína de fase aguda e proporcional ao IMC, e inibe a expressão de adiponectina, uma adipocina com efeitos anti-inflamatório, antidiabético e antiaterogênico (LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009). De forma semelhante, tanto a IL- 6 quanto o TNF- α estão envolvidas no processo de formação da placa ateromatosa, e pode haver possível relação com a progressão da atherosclerose (MOTTA *et al.*, 2013).

No tocante a resistina, essa possui ação pró-inflamatória, e é secretada por monócitos e adipócitos. Está presente em indivíduos magros e obesos, sendo que indivíduos obesos geralmente possuem níveis elevados desta adipocina. Seus níveis elevados contribuem para resistência insulínica, diminuindo a gliconeogênese hepática (SIPPEL *et al.*, 2014). Além disso, essa adipocina contribui para a disfunção endotelial, e, por aumentar a expressão da molécula de adesão celular VCAM-1 e a MPC-1, está relacionada à lesão aterosclerótica inicial (GOMES *et al.*, 2010).

Em indivíduos obesos a MCP-1 se encontra em níveis elevados, essa quimiocina inflamatória está relacionada à quimiotaxia de monócitos e macrófagos para os lugares de inflamação, de modo que facilita a infiltração de macrófagos no tecido adiposo do indivíduo obeso. Os macrófagos quando ativados, secretam citocinas com efeito pró-inflamatório, como TNF- α e IL-6, aumentando a resposta inflamatória e a resistência à insulina. O aumento dos níveis de MCP-1, também está relacionada ao desenvolvimento de aterogênese, que contribui para o acúmulo de monócitos nas artérias colaterais. Além disso, ela estimula a secreção de leptina através de mecanismos pós-transcpcionais (LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009; PINTO, 2014).

A leptina é um hormônio produzido principalmente nos adipócitos. E está relacionado com a redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético, atuando como uma molécula sinalizadora entre tecido adiposo e o sistema nervoso central (OTAVIANNI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Ressalta-se, ainda, que este hormônio está associado ao aumento de linfocinas pró-inflamatórias, pois possui funções sobre os linfócitos-T, regulando a proliferação de células envolvidas na

resposta imune (SIPPEL *et al.*, 2014). Em razão da alta quantidade de tecido adiposo, indivíduos obesos apresentam maiores concentrações de leptina no organismo, e tal condição parece estar relacionada a diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares e outras patologias, como obesidade, SM, resistência insulínica, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, aterotrombose e doença miocárdica (GOMES *et al.*, 2010).

Ao contrário das adipocinas citadas, a concentração plasmática de adiponectina está aumentada em indivíduos eutróficos, quando comparado com obesos (GOMES *et al.*, 2010). A adiponectina possui efeito anti-inflamatório, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6, e também demonstra melhora na sensibilidade à insulina, assim como é um bom protetor contra doenças cardiovasculares (SIPPEL *et al.*, 2014). Adiponectina está relacionada à indução da expressão de IL-10 em macrófagos, e, possivelmente, parte dos efeitos protetores contra aterosclerose da adiponectina estão ligados à IL-10 (SPERETTA *et al.*, 2014). Dessa forma, o desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade, como doenças cardiovasculares estão relacionados aos baixos níveis de adiponectina. (GOMES *et al.*, 2010).

De acordo com Speretta *et al.*, (2014), a IL-10 é uma adipocina anti-inflamatória sintetizada, sobretudo, por macrófagos e linfócitos, sendo que a principal função no organismo é regular o sistema imune. Uma maior concentração dessa adipocina depende de uma menor proporção de gordura corporal. Dessa forma atua para inibir a expressão e/ou síntese de adipocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α em monócitos e macrófagos (LEITE *et al.*, 2009)

Sabe-se que a associação da obesidade e o estresse oxidativo, eleva a concentração de radicais livres no organismo reduzindo o efeito protetor dos antioxidantes, dessa maneira gera danos às macromoléculas e um desequilíbrio no metabolismo. Os antioxidantes atuam para minimizar os efeitos adversos dos radicais livres (FERNANDES *et al.*, 2007). Por esse motivo, se faz importante o consumo de folhas, raízes, frutos e partes de plantas, por terem em sua composição fitoquímicos bioativos que vêm ganhando evidência como possíveis protetores contra o dano oxidativo (FERREIRA; ABREU, 2007).

De acordo com Torres *et al.*, (2014), a alimentação de origem vegetal atua na diminuição da ocorrência de DCNTs, em especial a obesidade, com consequência na redução de processos patogênicos (TORRES-FUENTES *et al.*, 2014). Nesse

contexto, a inclusão de alimentos como a bocaiúva (*Acrocomia aculeata*), torna-se um recurso atrativo por conta de sua composição nutricional identificada até o momento, de forma que seus constituintes atuam de forma a prevenir e/ou controlar doenças crônicas.

2.3 BOCAIUVA (*Acrocomia aculeata*): ASPECTOS TAXONÔMICOS

A espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., uma palmeira nativa da Região do Cerrado (Figura 2), apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas. Esta pertence à família Arecaceae, conhecida popularmente como bocaiuva e macaúba, entretanto, o nome comum desta palmeira varia de acordo com a região onde é encontrada, podendo também ser chamada de coco baboso, coco-de-espinho, macaíba, macaibeira, macajuba, macaúva, chiclete-de-baiano, dentre outros (ALMEIDA *et al.*, 1998).



Figura 2: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) (A e C) Palmeira com frutos; (B) Polpa; (E) Amêndoas; (D) Florescência (F e G); (H) Frutos no solo (Fonte: Acervo pessoal).

O gênero *Acrocomia* é considerada a palmeira de maior disseminação no Brasil, sendo abundantemente encontrada nos Estados de Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Tocantins (TO), Piauí (PI), Bahia (BA), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS), sendo amplamente distribuída pela área de Cerrado (Figura 3) (LORENZI, 2006).

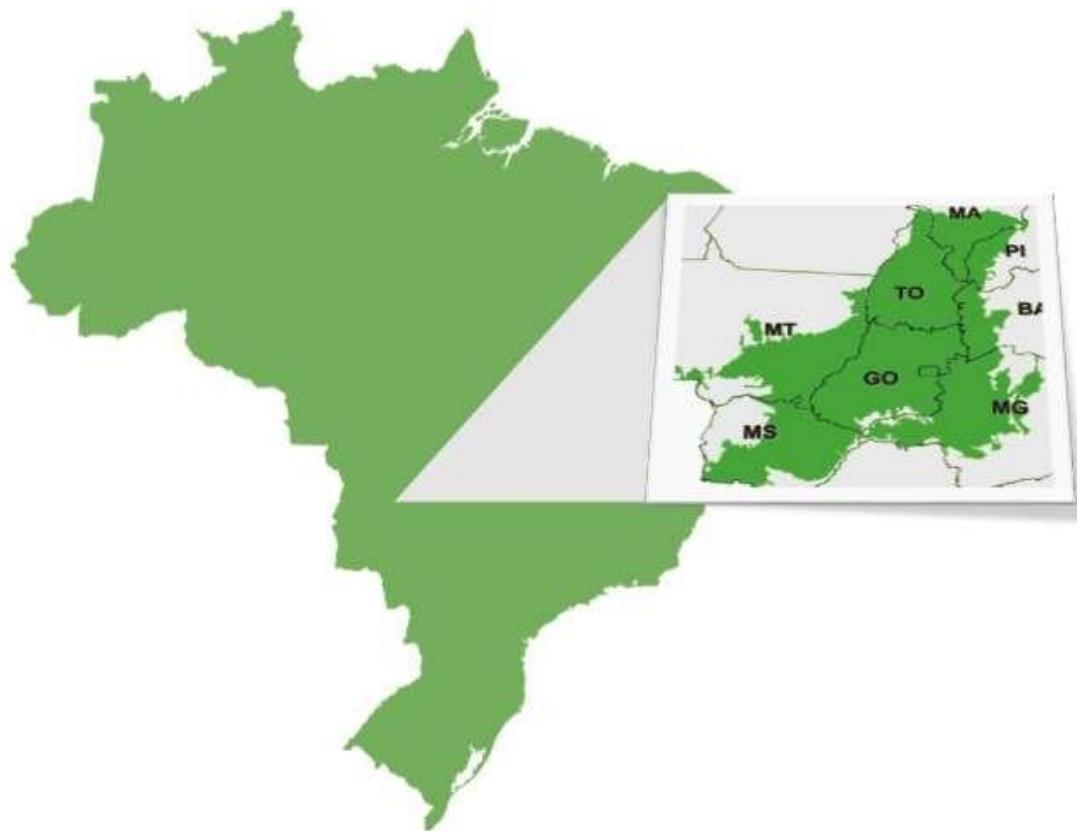


Figura 3: Distribuição geográfica do Cerrado pelos Estados do Território Nacional. MG (estado de Minas Gerais); MA (estado do Maranhão); MT (estado de Mato Grosso); PI (estado do Piauí); TO (estado de Tocantins); BA (estado da Bahia); GO (estado de Goiás) (Fonte: próprio autor).

Sua frutificação acontece ao longo de todo o ano, e o período de amadurecimento dos frutos ocorre entre setembro e janeiro (KOPPER *et al.*, 2009). A parte considerada mais importante desta planta é o seu fruto, que possui formato esférico ou ligeiramente achatado, contendo um diâmetro que varia de 2,5 a 5 cm e em sua composição apresenta aproximadamente 20 % de casca, 40 % de polpa, 33 % de endocarpo e 7 % de amêndoa (FARIA, 2010). Possui epicarpo cartáceo, mesocarpo fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado e aroma característico, sendo seu endocarpo duro e denso (SANJINEZ-ARGANDOÑA; CHUBA, 2011).

As partes comestíveis do fruto são a polpa e a amêndoas, amplamente consumidas pela população da região do Pantanal sul-mato-grossense. A polpa é consumida *in natura* ou como farinha adicionada em outras preparações (RAMOS *et al.*, 2008). A farinha de bocaiuva é produzida artesanalmente através de secagem da polpa, seguida pelo processo de moagem e peneiramento, podendo então ser fornecida aos consumidores (KOPPER *et al.*, 2009). Além disso, suas folhas são comumente utilizadas como laxante, por apresentar um grande efeito purgativo, além de serem consumidas para o controle de doenças das vias respiratórias, e utilizadas para a alimentação animal (SANJINEZ-ARGANDOÑA; CHUBA, 2011).

Além do seu consumo na forma *in natura*, farináceo e medicinal citado acima, o óleo produzido pela polpa é de grande interesse para as indústrias brasileiras por produzir óleo vegetal de alta qualidade, sendo comparado ao óleo de oliva. Apresenta em sua constituição cerca de 79% de ácidos graxos insaturados e 21% de ácidos graxos saturados e possui também grandes valores de ácido oleico e ácido palmítico (HIANE *et al.*, 1990; PENHA, *et al.*, 2015).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE BOCAIUVA

A Bocaiuva é um fruto de baixa acidez (aproximadamente com pH de 5,48), o que torna seu sabor mais agradável ao paladar, favorecendo assim, suas características sensoriais (MOOZ, CASTELUCCI, SPOTO, 2012). Em sua base seca, a polpa representa entre 34,0 % a 48,0 % do fruto (CETEC, 1983), sendo rica em carboidratos e fibras, e possui grande potencial energético (Tabela 1).

Tabela 1: Composição centesimal de polpa de bocaiuva

Componentes	Polpa de bocaiuva*
	Média \pm Desvio Padrão (g/100 g em base úmida)
Umidade	52,99 \pm 2,88
Lipídeos	8,14 \pm 1,45
Resíduo mineral fixo	1,51 \pm 0,06
Proteínas	1,50 \pm 0,04
Glicose	9,47 \pm 2,48
Sacarose	0,07 \pm 0,17
Amido	12,56 \pm 0,48
Carboidratos totais	-
Fibras	13,76 \pm 4,07
Valor calórico total (kcal/100 g)	167,67 \pm 2,56

Fonte: * Ramos et al., 2008.

A exploração sustentável do fruto pode ser economicamente viável, por produzir aproximadamente 6,32 kg de polpa por cacho. Levando-se em consideração sete cachos por planta, a produção média por ano de polpa, poderá atingir 44,24 kg. Estima-se, portanto, que 200 plantas por hectare (ha) produzirão anualmente 8.848 kg de polpa. A quantidade de polpa é uma característica importante, que reflete na valorização do extrativismo dos frutos (SANJINEZ-ARGANDOÑA E CHUBA *et al.*, 2011; LESCANO *et al.*, 2014).

Devido a sua coloração ser amarelo alaranjado, acredita-se que exista a presença de carotenoide, um precursor da vitamina A, com importante função fisiológica como: formação, proteção e regeneração da pele e das mucosas, fortalecimento do sistema imune e é importante para a manutenção da visão (KOPPER, 2009). O principal tipo de carotenoide encontrado na polpa de bocaiuva, é o β -caroteno, sendo cerca de 90% do total existente no fruto. Sua polpa também é considerada, rica em cobre, zinco e potássio para as crianças, e fonte de cobre e potássio para os adultos de acordo com a Ingestão Diária Recomendada (IDR) (RAMOS, 2007).

A polpa destaca-se por apresentar um alto teor de fibra, visto que o consumo de 100g fornece 55 % das necessidades diárias de fibra alimentar (25 g/dia) e cerca de 8,4 % das necessidades calóricas diárias de um adulto com uma dieta de 2000 kcal (BRASIL, 2014). Já em relação as crianças, fornece quase metade (50%) das necessidades diárias de fibras por dia. De acordo com a Organização Mundial da

saúde (OMS, 2007), a recomendação de ingestão para crianças de 1 a 3 anos necessitam de 19g/dia, 4 a 8 anos 25g/dia, meninos de 9 a 13 anos 31g/dia, e meninas com idade entre 9 e 18 anos 26g/dia.

De acordo com os resultados de FERNANDES et al (2018) após análise da composição química da polpa desidratada por liofilização, demonstrou que a fibra presente na polpa da bocaiuva representa um total de $22,90 \pm 0,04$ (Tabela 2). Aproveitando o período da safra, momento em que ocorre a produção excedente do fruto, a técnica de liofilização vem possibilitar a conservação dos frutos, permitindo assim, sua utilização em qualquer época do ano (SILVA et al., 2017)

Tabela 2: Fibras alimentares da polpa liofilizada de bocaiuva (Fonte: FERNANDES et al., 2018).

Polpa de bocaiuva (100g⁻¹)	
Fibras solúveis	$10,35 \pm 0,32$
Fibras insolúveis	$12,54 \pm 0,36$
Fibras totais	$22,90 \pm 0,04$

De acordo com Bernaud et al (2013) indivíduos que consomem quantidade adequada de fibras parecem apresentar menor risco para o desenvolvimento de doenças como; hipertensão, obesidade, diabetes e câncer de cólon, doenças coronarianas e disbiose. Dessa forma, é possível observar que a polpa da bocaiuva é um fruto potencialmente importante para a saúde da população, uma vez que a fibra é a maior substância presente na composição do fruto ($64,79 \pm 0,02\%$). Ressalta-se ainda, que a fração solúvel e insolúvel da fibra presente na polpa estão em proporções equilibradas (cerca de 50% cada), o que aponta para um alimento possivelmente prebiótico (BOLINA; CREN, 2016).

2.5 PREBIÓTICO

Inicialmente, Gibson et al., (1995) definiram prebiótico como um ingrediente alimentar que proporciona benefícios para a saúde do hospedeiro, por apresentar característica fermentativa que altera a composição e a atividade da microbiota gastrointestinal. Posteriormente, Roberfroid et al., (2010) afirmou que, o prebiótico deve conferir benefícios à saúde do hospedeiro, por permitir mudanças específicas

tanto na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal a partir de ingredientes seletivamente fermentados.

Atualmente, a maioria dos prebióticos identificados são carboidratos de diferentes estruturas moleculares, naturalmente encontrados em alimentos ingeridos pela população, sendo potenciais prebióticos os carboidratos indigeríveis, como a fibra alimentar (MARKOWIAK *et al.*, 2017).

De acordo com Wong (2007), as fibras solúveis são dissolvidas em água, formando posteriormente géis viscosos. Não são degradadas no intestino delgado, e por esse motivo, são facilmente fermentadas no intestino grosso, pela ação da microbiota intestinal, enquanto que as fibras insolúveis, não são solúveis em água, o que acarreta em uma limitação na fermentação dessas fibras. As fibras solúveis são representadas pelas gomas, pectina, inulina e algumas hemiceluloses. Já as fibras insolúveis são representadas por lignina, celulose, e também algumas hemicelulose (MORAES *et al.*, 2014)

As fibras dietéticas promovem efeitos locais e sistêmicos no organismo humano. O efeito sistêmico é caracterizado pela redução dos níveis de colesterol e glicose, enquanto o efeito local é comumente observado, na melhora do trato gastrointestinal como, redução do tempo do trânsito intestinal, maior quantidade de bolo fecal, e em especial na ação potencialmente benéfica na redução do câncer de cólon (BUTTRISS *et al.*, 2008; EFSA, 2010).

Ainda sobre a solubilidade das fibras, Brownawell *et al* (2012), afirmam que a fibra solúvel apresenta uma maior característica fermentativa quando comparada com as fibras insolúveis pois essas não apresentam propensão à fermentação bacteriana, sendo a fermentação um processo benéfico para o hospedeiro, por reduzir o nível do pH no cólon e consequentemente diminuindo o crescimento de patógenos e bactérias putrefativas.

Compreende-se que nem todas as fibras são prebióticos, visto que existem alguns critérios necessários para as fibras serem reconhecidas como tais, por exemplo, não devem sofrer hidrólise e nem serem absorvidas na parte superior do trato gastrointestinal, devem ser capazes de promover uma melhora intestinal e consequentemente induzir efeitos no lúmen que beneficiem o hospedeiro (CRITTENDEN *et al.*, 2009; ROBERFROID *et al.*, 2010). Essa diferenciação se dá pelo fato das fibras serem utilizadas por todos os micro-organismos do cólon de uma forma generalizada, enquanto que os prebióticos atuam selecionando os micro-

organismos capazes de utilizar carbono como fonte de energia, por apresentarem uma estrutura química definida (ZE *et al.*, 2013).

Sendo assim, um experimento realizado *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que os prebióticos que mais se adequam aos requisitos exigidos, são os oligossacarídeos, tais como, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), isomaltooligossacarídeos (IMO), xiloligossacarídeos (XOS), transgalactooligossacáridos (TOS) e oligossacáridos de soja (SBOS). Porém, os polissacarídeos como inulina, amido resistente, celulose, hemicelulose ou pectina também são considerados potenciais prebióticos. Salientando que, os prebióticos são classificados de acordo com a quantidade de monômeros ligados entre si, assim sendo, dissacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos (BAURHOO *et al.*, 2007; ARKEL *et al.*, 2012; AZCARATE-PERIL *et al.*, 2017).

A ingestão de prebiótico está relacionada com diversos benefícios para a saúde, desde fator relacionado a maior saciedade, até redução da lipoproteína de baixa densidade sanguíneo (LDL), melhora no índice glicêmico e estimulação do sistema imunológico. Além de auxiliar na atividade e crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal (VULEVIC *et al.*, 2008; SÁEZ-LARA *et al.*, 2016).

2.6 OS BENEFÍCIOS DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC)

Atualmente, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de descobrir os benefícios da produção de AGCC para o metabolismo humano. Sabe-se que os AGCC se ligam com receptores específicos, considerados ligantes naturais, acoplados às proteínas G (GPCRs), denominados receptores 2 (FFAR 2 - receptor de ácido graxo livre 2), antes conhecido como GPR43 e 3 (FFAR 3 - receptor de ácido graxo livre 3), anteriormente denominado GPR43 que se encontram expressos em células epiteliais intestinais e adipócitos (PADDU *et al.*, 2014).

Ressalta-se ainda que FFA2 e FFA3 tem sido encontrado em regiões periféricas, o que demonstra os possíveis benefícios dos AGCCs sobre os tecidos e órgãos, além do intestino. O FFA2 foi detectado no músculo esquelético, coração, baço e tecido adiposo, enquanto a expressão de FFA3 parece ser mais difundida no sangue periférico em células mononucleadas, pâncreas, medula óssea e gânglios linfáticos (TOLHURST *et al.*, 2012; LAYDEN *et al.*, 2013)

Outro aspecto importante da ligação dos ácidos graxos aos receptores; é a capacidade de influenciar a motilidade intestinal e a produção de hormônios intestinais, apresentando papel na regulação da saciedade (RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016).

Nesse contexto, foi observado que os AGCCs estão associados a um aumento nas concentrações circulantes dos hormônios intestinais anoréticos (glucagon (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY)), que são sintetizados por células L presentes em todo o trato gastrintestinal, com as maiores concentrações no íleo distal e no cólon (REIMER *et al.*, 2012). Além disso, o PYY apresenta um papel importante quando estimulado pela proteína G, inibindo a motilidade intestinal, atrasando o trânsito intestinal, e promovendo uma maior absorção de nutrientes a nível intestinal. Sendo essa função associada a uma redução na ingestão de energia (CHAMBERS *et al.*, 2014).

Sabe-se que menores níveis de AGCC, pode estar associado a menor inibição do processo inflamatório. Esta inibição pode ser resultante da ligação dos AGCC ao receptor GPR43, diminuindo assim o processo inflamatório, devido a conexão com células imunes (MASLowski *et al.*, 2009). Um exemplo importante é o butirato, visto que esse apresenta um papel importante na regulação da expressão das citocinas pró- inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), por inibir a ativação do fator nuclear Kb (NF-Kb) (BERDANI; ROSSI, 2009).

Outro importante estudo constatou que ao alimentar ratos adolescentes com uma fibra solúvel, goma guar, resultou em uma diminuição da ingestão de alimentos, menor ganho de peso e melhora da tolerância à glicose (Gibson *et al.*, 2011). Sob o mesmo ponto de vista um estudo realizado em humanos observou que os AGCCs principalmente o acetato e o propionato possuem efeitos sistêmicos específicos. O acetato age reduzindo a glicemia pós-prandial, enquanto o propionato apresenta um caráter de supressão da síntese de colesterol no fígado, sendo a possível explicação para a redução dos níveis de lipídios no sangue. Dessa maneira, esses efeitos sistêmicos podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares, que estão presentes como uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo (EFSA, 2010b).

Ainda em relação aos efeitos da MI e seus metabólitos, aparentemente expressam similaridades com a função do fígado, principalmente por sintetizar vitamina K e vitamina do complexo B, que são de extrema importância para o metabolismo do indivíduo. De acordo com Barbosa *et al* (2010), não são todas as

bactérias que estão envolvidas nessa função, sendo apenas; *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Estreptococcus*, *Enterobacterium*, *Enterococcus* e *Veillonella*.

Por fim, ainda há necessidade de maiores estudos sobre os benefícios dos ácidos graxos de cadeia curta para os hospedeiros. Porém, de forma sucinta, os AGCC sintetizados pela microbiota intestinal aparentemente são responsáveis pela homeostase energética, além de propiciar aumento da saciedade, diminuir processo inflamatório, e garantir níveis adequados de glicose plasmática e lipídios séricos (KTSOYAN *et al.*, 2016).

2.7 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal (MI) tem sido alvo de grandes estudos contemporâneos, devido sua relação com o processo de saúde e doença. Sabe-se que a MI é formada por diversos micro-organismos, em torno de 10^{14} bactérias e archaeas por grama de conteúdo luminal, além de fungos, vírus e protozoários, que podem apresentar perfil benéfico e ou patogênico (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2016). Embora tenha sido descrito mais de 50 filos bacterianos, apenas dois apresentam predominância; Bacteroidetes e Firmicutes, representando 92,6%, que aparentemente não estão distribuídos de forma homogênea, de acordo com as características de cada porção intestinal (Figura 4).

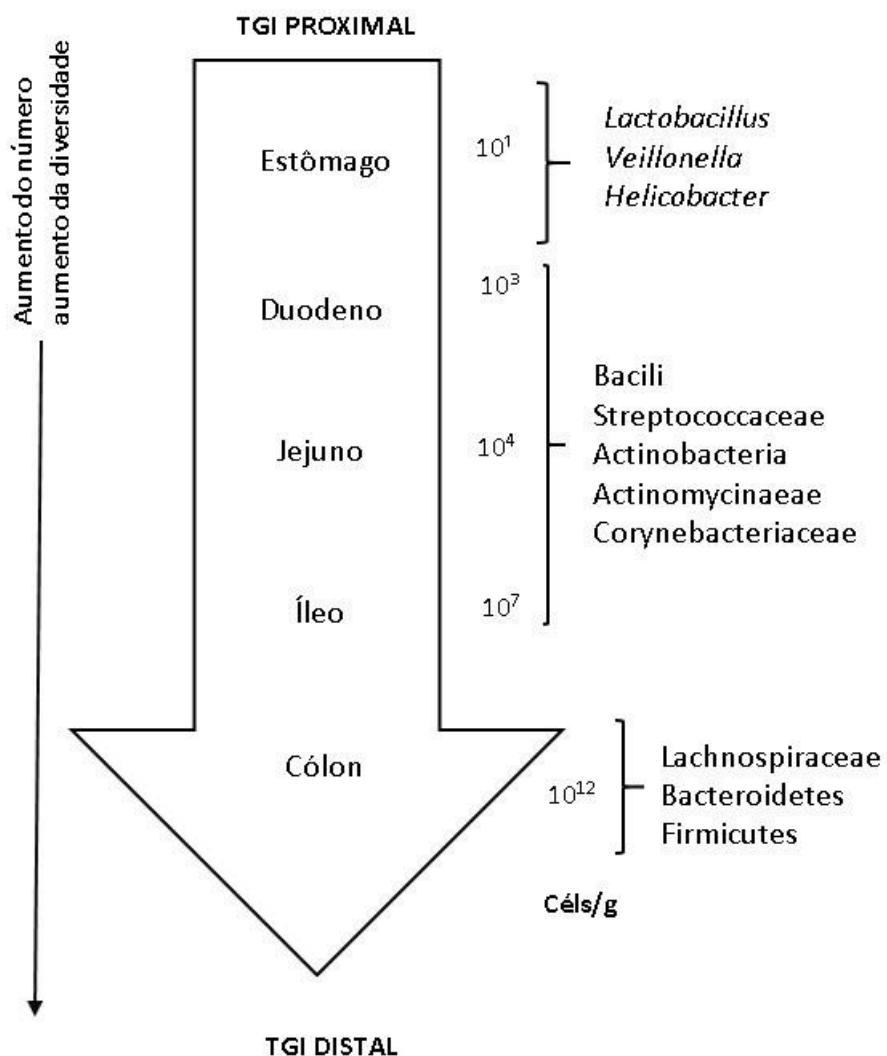


Figura 4: Alterações na abundância e composição dos micro-organismos ao longo do trato intestinal em humanos. Fonte: Adaptada de SEKIROV et al (2010).

No entanto, a composição e a funcionalidade da MI varia de acordo com a idade, gênero, fatores psicológicos, ambientais e sobretudo hábitos alimentares (TOPPING *et al.*, 2001). De acordo com Moraes *et al* (2014), a microbiota intestinal começa a se estabelecer no momento do parto, uma vez que o contato direto do bebê com o canal vaginal da mãe interfere drasticamente na colonização da MI, no entanto, somente na faixa de 2 a 3 anos de idade, que se percebe uma estabilidade e compatibilidade das bactérias do filo Bacteroidetes e Firmicutes como nos adultos.

Enquanto que no envelhecimento se observa uma redução no crescimento de bactérias anaeróbias facultativas e na população de *Bacteroides* e *Bifidobacterium*

como consequência dessas variações, pode haver alterações no paladar e olfato, com consequente redução da ingestão alimentar (ANGELAKIS *et al.*, 2012).

Além disso, a dieta exerce um grande impacto na composição da microbiota intestinal. O fator dietético influencia de tal maneira que é determinante para a gênese e proliferação de micro-organismos benéficos, o que é percebido por meio da disposição de carboidratos dietéticos, como as fibras alimentares (NICHOLSON *et al.*, 2012).

Sabe-se que a maior concentração de bactérias está no intestino grosso, principalmente no cólon, devido a quantidade e disponibilidade de nutrientes presentes nessa seção (SEKIROV *et al.*, 2010). Sendo os polissacarídeos não amido, os amidos resistentes e oligossacarídeos, as principais fibras que adentram ao intestino grosso, resultando na síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) com o objetivo de garantir a adequada diversidade e os benefícios proporcionados pela MI (RICHARDS *et al.*, 2016).

As fibras dietéticas quando ingeridas ficam sujeitas as inúmeras reações fermentativas no lúmen intestinal que promovem a formação de AGCC, como ácido fórmico, isobutírico, valérico, caprônico, especialmente butírico, propiônico, e acético, os quais totalizam aproximadamente 95% dos AGCC presentes no intestino (RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016).

Daí a importância do papel da microbiota intestinal como intermediária entre fatores ambientais e comportamentais e a ocorrência de obesidade e os distúrbios metabólicos (LEY *et al.*, 2005).

2.8 MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE

A obesidade tem grande impacto na saúde pública mundial, por estar relacionada na gênese de diversas morbidades, tais como a diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e doenças cardiovascular aterosclerótica. Dessa forma, uma possível relação das bactérias que colonizam o intestino humano como agentes etiopatogênicos da obesidade ganha destaque, por representarem alvo potencial de intervenção (IBGE 2010).

Sabe-se que existem diferenças na composição da MI de indivíduos eutróficos e obesos, sendo que a maior concentração é de Firmicutes em relação a Bacteroidetes,

tanto em camundongos geneticamente obesos quanto em humanos (CARVALHO *et al.*, 2012) Da mesma forma, Ley e colaboradores (2006) observaram que ao reduzir a massa de tecido adiposo em humanos com obesidade, modificou-se a composição da MI, resultando em uma redução na proporção de Firmicutes.

Ainda, estudo em humanos analisaram que em mulheres grávidas, que apresentavam Bacteroidetes em maior concentração resultou em um aumento no peso durante a gravidez, em compensação, gestantes que apresentaram maior número de Bifidobacterium pareceu fornecer proteção contra o ganho peso excessivo (SEDOURA *et al.*, 2017).

Além do mais, foi observado um maior ganho de gordura ponderal e maior extração de calorias nos animais que receberam a microbiota intestinal de obesos. Esses achados se baseiam na utilização de transplantes da microbiota intestinal de roedores magros e obesos em animais *germ-free*, o qual sugere que as características da microbiota intestinal dos animais obesos contribuem para o ganho de peso (MORAES *et al.*, 2014)

As bactérias intestinais podem intervir no equilíbrio energético, no estado inflamatório, e na função da barreira intestinal, devido a suas atividades metabólicas além de apresentarem um papel importante no desenvolvimento do epitélio intestinal, no aumento da densidade dos capilares, vilosidades do intestino delgado que por sua vez, influenciam na fisiologia e na motilidade intestinal, resultando em uma maior extração energética da dieta (GOEL *et al.*, 2014).

Nesse contexto, um estudo avaliou o papel da microbiota intestinal na regulação da absorção de nutriente por meio das calorias ingeridas comparadas as calorias eliminadas pelas fezes. Foi identificado a perda de energia nas fezes de indivíduos magros e um aumento do filo Firmicutes. Em contrapartida houve uma absorção de energia de 150 kcal e uma redução de Bacteroidetes em indivíduos obesos. O que indica uma possível função da MI na regulação da biodisponibilidade de nutrientes (JUMPERTZ *et al.*, 2011).

No entanto, são necessários mais estudos para determinar se os filos Bacteroidetes e Firmicutes causam benefícios ou agravos a saúde do hospedeiro. Consta-se até o momento, que não existe um padrão absoluto de distribuição de filos da microbiota intestinal entre indivíduos obesos e magros. Assim, Duncan e colaboradores (2008), observaram que indivíduos obesos e eutróficos apresentaram

mesma proporção dos dois filos, enquanto em outro estudo observou uma maior proporção de Bacteroidetes em relação aos Firmicutes em obesos (MORAES 2014).

Ainda, em relação ao fenômeno da obesidade e microbiota intestinal, Kobyliak 2016, observou uma maior absorção de ácidos graxos e acumulo de triglicerídeos nos adipócitos, ocasionado pela inibição do *Fasting-Induced Adipose Factor* (Fiaf) pela MI, e um aumento da ação da lipoproteína lipase (LPL). Em pesquisas utilizando animais Fiaf-suprimido, observaram que, quando alimentados com dieta ocidental, houve maior ganho de peso corporal que os animais FIAF+/+ wild-type; apresentando assim, uma maior adiposidade, e uma maior concentração de leptina e insulina. (BÄCKHED *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2012).

Outro importante mecanismo envolvido na regulação do metabolismo energético celular, é o 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase (AMP-Q), uma enzima ativada pela adenosina monofosfato (AMP). Quando essa é inibida, ativa processos anabólicos e bloqueia catabólicos. Além disso há evidências dessa enzima estar relacionada na regulação do metabolismo de ácidos graxos e da glicose. Fato esse observado por Kola e colaboradores (2008), em um estudo feito com camundongos *germ-free*, os quais receberam dieta hipercalórica, e conservaram o peso, devido à elevação da atividade da AMP-Q no fígado e músculo esquelético e a maior oxidação de ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina. Dessa forma, demonstra-se que a presença da microbiota inibi a AMP-Q por suspender a oxidação de ácidos graxos muscular, e dessa maneira, favorece a adiposidade corporal e a geração de resistência à insulina (DEVARAJ *et al.*, 2013).

Apesar de haver evidências da participação da microbiota intestinal no acometimento da obesidade, ainda assim, não está bem esclarecido os mecanismos e as formas pelas quais ocorrem tais fatores. Ocasionando, dessa forma, discussão quanto as alterações da composição da microbiota se são fatores causais de obesidade ou resultado dela (BINNS *et al.*; 2014). Dessa forma, para um maior esclarecimento, se faz necessário a utilização de técnicas metagenômicas, tanto para obter resultados apresentados até o momento, quanto para novas pesquisas.

2.9 ESTUDO METAGENÔMICO

As análises metagenômicas, são feitas de forma mais rápida, por ser uma técnica de alta especificidade e de alto rendimento, quando comparada as

metodologias convencionais, principalmente quanto a identificação e quantificação de bactérias não cultiváveis (FURRIE *et al.*, 2006), além de apresentar benefícios no manuseio das amostras, que podem ser congeladas e o DNA extraído é facilmente transportado. A técnica se baseia na identificação de micro-organismos presente na composição da microbiota de um ecossistema, sendo possível esse reconhecimento, através da análise do material genético presente a partir de amostras intestinais e ambientais (solo e água) (NISTAL *et al.*, 2015; MANDAL, SAHA e DAS, 2015).

Imensuráveis genes ou regiões são utilizadas na identificação de bactérias. O gene 16S rDNA é a menor subunidade ribossômica das células procariotas, além de ser o principal marcador genético usado na ecologia de microrganismo. Dessa maneira a utilização da biblioteca genômica 16S rDNA, é amplamente empregada na caracterização da microbiota intestinal humana (MIH), mesmo sendo uma técnica de elevado valor. Essa ferramenta molecular, revela as diferenças significativas entre os componentes da MI além de, apresentar uma maior precisão quanto a descrição dos organismos mais abundantes, através do aumento significativo na detecção de DNA (SHEN *et al.*, 2010; WALKER *et al.*, 2011; FRANASIAK *et al.*, 2015).

Outra importante ferramenta envolvida são as tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração, que promove o sequenciamento do DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhares de pares de base em uma única corrida (plataforma 454 FLX da Roche, Solexa da Illumina, Solid system da Applied Biosystems) (MACHADO *et al.*, 2013). Dessa maneira é utilizado o sequenciamento do gene 16S rDNA que é amplamente empregado na reconstrução filogenética e quantificação de diversidade bacteriana, devido a apresentar uma região conservada e significantemente pequena (~1,5kb). Esse sequenciamento de DNA é feito a partir das análises metagenômicas, onde o DNA é extraído de toda a comunidade e subunidade do gene 16 rDNA que é amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase), porém essa amplificação só ocorre a partir de iniciadores universais. Tendo como resultado milhares de *amplicons* que posteriormente são sequenciados e analisados em programa de bioinformática para criar perfis de riqueza, composição e estrutura da comunidade bacteriana. (FRANZÉN *et al.*, 2015; MANDAL, SAHA e DAS, 2015).

Portanto, a utilização da técnica metagenômica aliada com o ensaio experimental é fundamental para produzir maiores informações quanto a diversidade e abundância de comunidade bacterianas, além identificar micro-organismos aptos

em fornecer compostos bioativos. Já em relação ao uso de animais é imprescindível destacar a importância deste no combate ou prevenção da obesidade e outras doenças crônica não transmissíveis (DCNT), dada a semelhança metabólica com os seres humanos. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa, é observar os possíveis efeitos da dieta enriquecida com 4% de polpa liofilizada da bocaiuva sobre as alterações da microbiota intestinal de camundongos Swiss induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o perfil da comunidade bacteriana intestinal de camundongos machos da linhagem Swiss, induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica e tratados durante 90 dias com dieta adicionada de 4% de polpa de bocaiuva liofilizada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair DNA metagenômico das fezes dos 6 grupos: CS (Controle Sham), CHF (Controle *high fat*), CHFP4 (Controle *high fat* polpa 4%) no tempo inicial. FS (Final Sham) FHF (Final *high fat*) e FHFP4 (Final *high fat* polpa 4%).
- Sequenciar o gene 16S rDNA das bactérias presentes nas fezes dos 6 grupos experimentais;
- Caracterizar a composição e estrutura da comunidade bacteriana, por meio da análise de bioinformática.
- Por meio da análise de bioinformática, será estimado a diversidade taxônica a partir da utilização dos índices de diversidade de riqueza em amostras de fezes para avaliação de sua microbiota intestinal;
- Avaliar se a comunidade bacteriana é influenciada pela adição de 4% de polpa liofilizada de bocaiuva à dieta hiperlipídica, será avaliado em comparação com os resultados da bioinformática em relação ao grupo inicial e final.

4. METODOLOGIA

No presente estudo há colaboração entre duas Instituições de Ensino Superior de Mato Grosso do Sul (MS), sendo a Universidade Católica Dom Bosco UCDB) e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) PROPP/UFMS nº 774/2016.

4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais utilizados foram camundongos da linhagem *Mus musculus* Swiss machos, com 56 dias de vida e peso entre 25 – 35 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da UFMS.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, e mantidos sob condições de ciclo de luz controlado claro-escuro (12/12h) e temperatura de 24 ± 1 °C. O consumo de água e dieta ocorreu sob sistema de livre acesso, *ad libitum*, e a administração da polpa liofilizada foi adicionada a ração *high fat*. Os grupos foram divididos da seguinte forma (Figura 5)

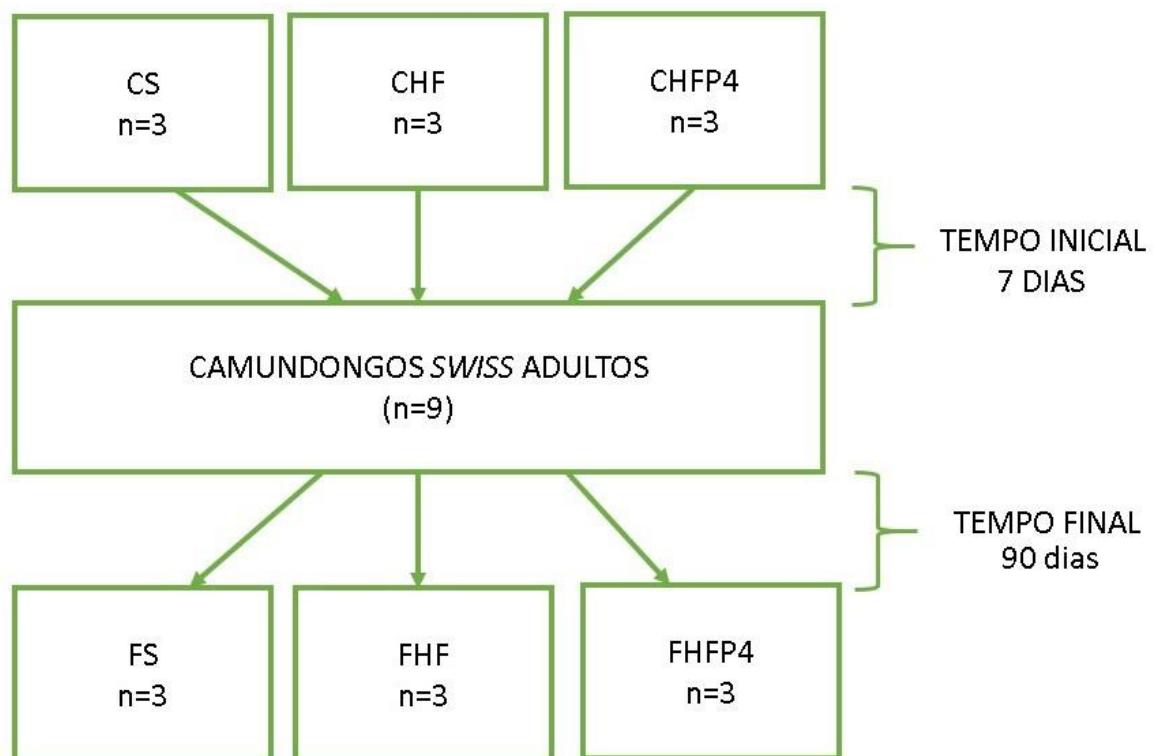


Figura 5: Diagrama da divisão dos grupos.

As fezes foram coletadas 7 dias após o início e na véspera do término do experimento (3 meses, totalizando 90 dias). Ao final do experimento, todos animais foram submetidos a eutanásia, utilizando anestésico inalatório, isoflurano, seguido de exanguinação, minimizando dor e sofrimento, de acordo com os princípios bioéticos (CONCEA). Os animais foram descartados em locais adequados sob orientação de técnicos especializados do Biotério Central da UFMS.

4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E SECAGEM POR LIOFILIZAÇÃO

Os frutos de bocaiuva (*Acrocomia* sp.) foram obtidos maduros no município de Aquidauana, no Estado de Mato Grosso do Sul. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob número 54.032. Os frutos foram selecionados, higienizados, pesados e posteriormente despolpados. Para propiciar um maior rendimento do fruto a extração da polpa foi realizada através de uma despolpadora mecânica, com hélices em facas, utilizada para a despolpa de frutos como coco, o equipamento foi disponibilizado pelo Instituto de Física (INFI) da UFMS. A polpa foi armazenada até o momento da liofilização em freezer a -20°C. Para garantir que os constituintes do fruto estejam presentes para avaliar sua ação mediando a obesidade, a polpa foi liofilizada, utilizando-se liofilizador industrial LH0601-B, Terroni (CHIU et al., 1970; LENQUISTE et al., 2015). E posteriormente armazenadas em embalagens metalizadas, fechadas a vácuo e mantidas em freezer a -20° para garantir a integridade ao realizar as análises da amostra e o preparo das rações.

4.3 DIETA

As dietas utilizadas para alimentar os animais foram elaboradas pela empresa Pragsoluções Serviços e Comércio Ltda-ME em JAÚ/SP, segundo protocolo de Reeves, Nielsen e Fahey (1993) da dieta AIN-93M de manutenção isocalórica para o grupo controle (CS); a dieta *high fat* (hiperlipídica) foi elaborada segundo o protocolo de Pimentel et al., 2013, acrescida de 1,25% colesterol, que compôs os grupos: *high*

fat (CHF) e *high fat* Polpa 4% (CHFP4) (Tabela 2). Estas dietas foram oferecidas aos animais diariamente, em quantidade suficiente para garantir o consumo *ad libitum*.

Os teores de vitaminas, sais minerais, fibras e demais nutrientes foram equilibrados segundo as recomendações da AIN-93M (Tabela 3) para ratos (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 3: Composição das dietas experimentais formuladas (g/kg) de acordo com a AIN93-M, pela UTASP da UFMS, 2016.

Ingredientes	Dieta Controle (Kg)	Dieta <i>High fat</i> (Kg)	Dieta Intervenção 4% (kg)
Amido de Milho	465,69	116	96
Maltodextrina	155	132	132
Caseína	140	200	198,3
Sacarose	100	100	100
Óleo de Soja	40	40	30,6
Celulose	50	50	41,9
Mix Mineral	35	35	35
Mix Vitamínico	10	10	10
L- Cistína	1,8	3	3
Birtartarado de Colina	2,5	2,5	2,5
Terc-Butil	0,008	0,008	0,008
Hidroquinona			
Banha	0	312	312
Colesterol	0	1,25	1,25
Polpa Liofilizada 4%	0	0	40

Fonte: dados da pesquisa.

4.4 AMOSTRAS FECAIS

Em um microcubo *eppendorf*, com auxílio de uma espátula estéril individual, foram coletadas as fezes no início do experimento (7 dias) e um dia antes da eutanásia (90 dias). Os microtubos foram identificados por número do animal e grupo correspondente, mantidos sob refrigeração sendo posteriormente transferidos para o Laboratório S-Inova da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), onde foram conservadas em ultra freezer a -80 °C até o momento da análise.

4.5 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL

Segue abaixo etapas do delineamento experimental que foram realizadas no presente estudo até o momento (Figura 6).

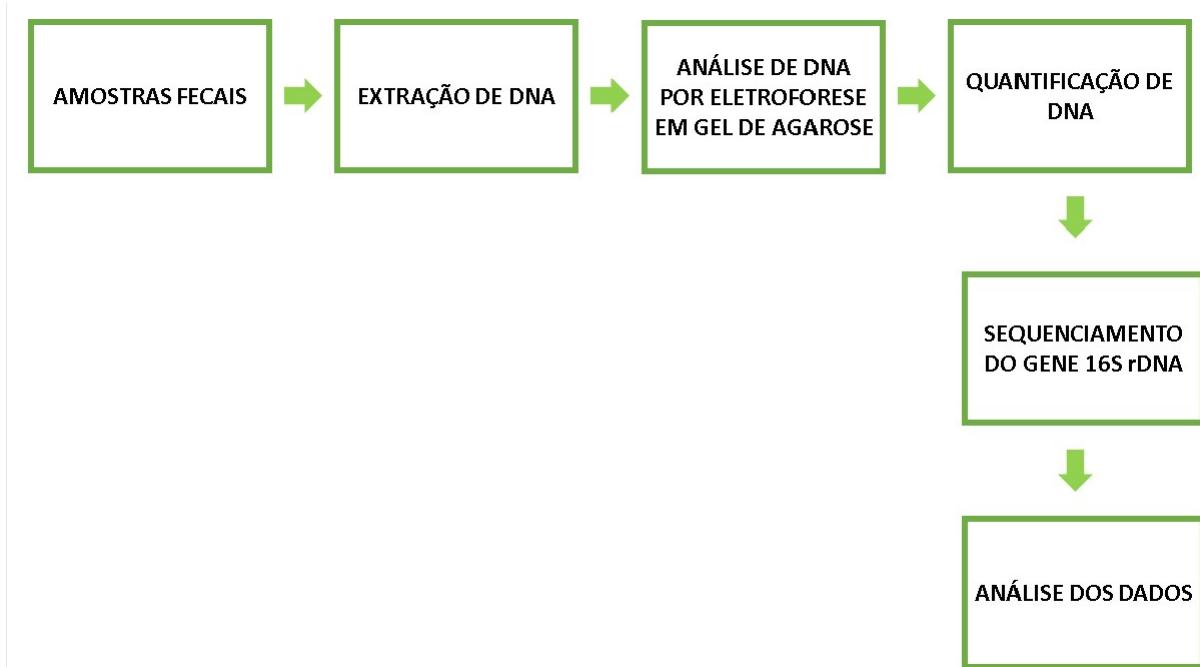


Figura 6: Esquema do processamento de amostra fecal.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a obtenção do DNA metagenômico foi pesado 0,250 g de material fecal de cada grupo, as análises foram avaliadas em triplicata, para garantir um resultado mais fidedigno. Ao total, foram extraído DNA de 18 amostras através do Kit de extração de DNA, Qiagen QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit, com alterações nas instruções do fabricante, incluindo:

- 1) pesar 0,250g de fezes tubo de microcentrífuga de 2 ml
- 2) foi necessário deixar as amostras em temperatura ambiente de um dia para o outro, para que houvesse o descongelamento em temperatura ambiente, com a finalidade de facilitar na homogeneização das fezes,
- 3) adicionar 1000 ul de Inhibitex buffer, vórtex por 6 min e colocar no banho maria de 75ºC por 5 min.
- 4) Retirar do banho maria e vórtex por mais 5 min.
- 5) Banho maria 75ºC por mais 5 min.
- 6) Vórtex por mais 5 min.

- 7) centrifugar por 1 min (sem adição de reagentes).
- 8) banho maria de 75°C por 10 min
- 9) 2 para 1 de sobrenadante e álcool respectivamente, ou seja; colocar 200 ul de sobrenadante na coluna e em seguida 100 ul de etanol, fazer essa proporção até o fim do sobrenadante, e vórtex de 2 min.

Essas alterações foram necessárias, devido à alta concentração de lipídeos presente nas fezes em análises.

4.7 ANÁLISE DE DNA POR ELETROSFORESE EM GEL DE AGAROSE

As análises foram feitas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), e tampão TBE 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 80V. A eletroforese foi realizada com uma alíquota de 8 µL de DNA adicionada de 2 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de xileno cianol v/v]. O marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder foram utilizados para estimativa do tamanho dos *amplicons*. Posteriormente, o gel foi colocado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 5 minutos e água destilada para descorar durante 15 minutos, sendo a visualização do DNA possível sob luz UV e a imagem documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad - Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio RadTM, Hercules, CA, USA), resultando em bandas com perfil de DNA metagenômico.

4.8 Sequenciamento do gene 16S rDNA

Para o processo de sequenciamento, foram utilizadas as amostras de DNA, as quais formaram um *pool* com a junção das 3 réplicas biológicas de cada amostra. Deste modo, as análises do sequenciamento do presente estudo, foram analisadas em triplicata, sendo os grupos no tempo inicial (7 dias): CS, CHF, e CHFP4, e no tempo final após 90 dias (FS, FHF e FHFP4) que foram enviadas para empresa GenOne Soluções em Biotecnologia para o sequenciamento em larga escala de DNA. Dito isso, a amplificação, assim como o sequenciamento das regiões V3-V4 do gene 16S rDNA foi realizada pela plataforma *Illumina HiSeq* (<http://www.genone.com.br/genomica/>).

4.9 Análise dos dados do gene 16S rDNA

A análise dos dados subsequentes foi processada usando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). O QIIME é um programa livre baseado em *scripts Python* que permitem a classificação das sequências de 16S rDNA em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) e, usando-as como base para construir árvores filogenéticas, plotar gráficos taxonômicos, construir redes de interação, calcular medidas de alfa e beta diversidade, entre outros (CAPORASO et al., 2010).

Dessa maneira, as OTUs foram definidas por agrupamento a 97%, utilizando como referência o banco de dados de OTUs mais recente do Greengenes com o método Uclust (EDGAR, 2010).

A estrutura geral da comunidade bacteriana de filo e gênero foram analisados utilizando gráfico de abundância relativa. Por sua vez, a alfa diversidade foi analisada por meio de curva de rarefação e observação de OTUs. A análise de beta diversidade foi mensurada pela matriz de distância não ponderadas UniFrac (PCoA), sendo esta utilizada para demonstrar similaridade ou dissimilaridade entre as amostras analisadas (FUKUYAMA et al., 2015).

Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do software STAMP utilizando o Teste exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS et al., 2010).

No momento do estudo de bioinformática houve modificação das siglas dos grupos experimentais, conforme a seguir.

Tempo Inicial: SH para CS; HP4 para CHFP4; CHF mantido CHF

Tempo Final: SH para FS; HP4 para FHFP4 e CHF para FHF.

5. RESULTADOS

5.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O resultado da extração direta de DNA foi avaliado por gel de agarose 0,8%, (Figura 7). Como previsto, foi possível observar a presença de DNA metagenômico nas amostras de fezes dos camundongos, como foi evidenciado na Figura 7.

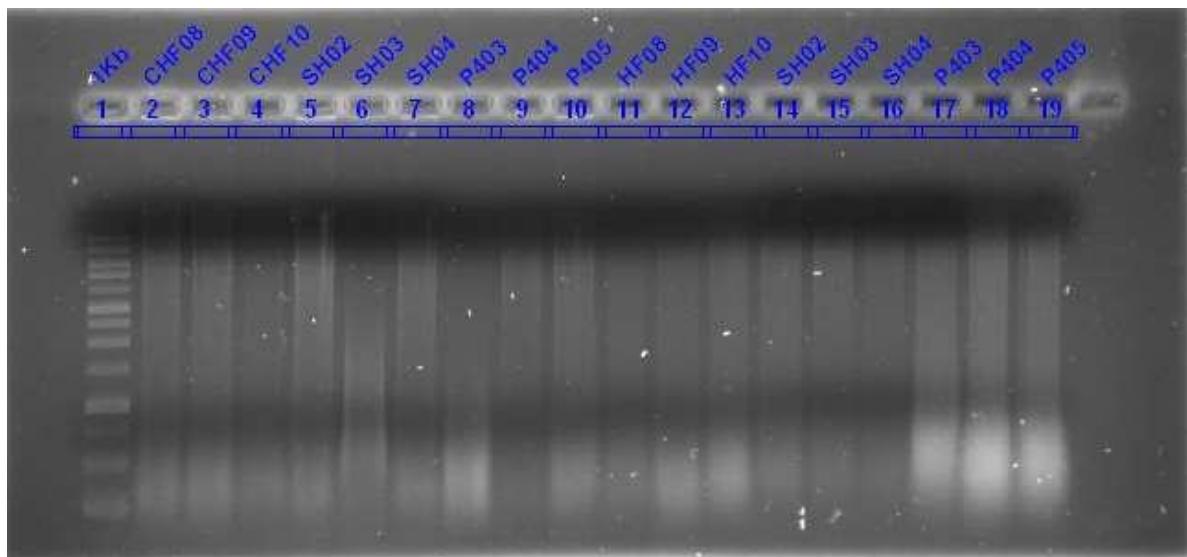


Figura 7: Extração de DNA fecal das 18 amostras demonstrada por Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. 1Kb plus DNA Ladder, CHF8/ CHF9/ CHF10: Amostras do grupo controle *high Fat*, tempo 0: CS2/ CS3/ CS4: Amostras do grupo controle SHAM, tempo 0: CHFP4- 3/ CHFP4-4/ CHFP4-5: Amostras do grupo controle com 4% de Polpa liofilizada, tempo 0. FHF8/ FHF9/ FHF10: Amostra do grupo *high Fat*, tempo final: FS2/ FS3/ FS4: Amostras do grupo SHAM, tempo final: FHFP4-3/ FHFP4-4/ FHFP4-5: Amostras do grupo com 4% de Polpa liofilizada, tempo final.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Além da avaliação por meio da visualização em gel de agarose, foi realizado a quantificação das amostras pelo método Qubit® 3.0 (Life Technologies) como demonstrado na Tabela 4. As amostras extraídas de DNA tiveram variação entre a 11,2 a 130 μ g/ μ L.

Tabela 4: Concentração das amostras em ng/uL, quantificadas via Qubit® (Life technologies).

Grupos experimentais	Tempo inicial (ng/uL)	Tempo final (ng/uL)
CHF 8	38.6	51.6
CHF 9	96.6	57.4
CHF 10	20.2	16.3
SH 2	110.0	35.0
SH 3	116.0	25.4
SH 4	92.0	57.6
HP4 3	41.4	11.2
HP4 4	61.6	120.0
HP4 5	130.0	69.8

Fonte: Dados da Pesquisa.

Conforme o resultado obtido por meio da quantificação as 18 amostras apresentam-se aptas para o sequenciamento em larga escala de DNA, sendo a empresa GenOne Soluções em biotecnologia responsável por tal sequenciamento. O processo ocorre através da amplificação, e o sequenciamento das regiões V3-V4 do 16S rDNA que será realizada pela plataforma *Illumina HiSeq* (<http://www.genone.com.br/genomica/>). Essa técnica é amplamente utilizada para caracterizar a comunidade bacteriana intestinal, revelar as diferenças significativas entre os componentes da mesma, além de apresentar uma maior precisão quanto a descrição dos organismos mais abundantes, através do aumento significativo na detecção de DNA (SHEN *et al.*, 2010).

5.3 ANÁLISE DOS DADOS

Ao analisar os filos bacterianos, o filo Firmicutes apresentou maior abundância relativa nos grupos CHF, FHF, FHFP4, CHFP4 e FS. Enquanto, no grupo CS, não foi observado tal análise, sendo a maior abundância de Bacteroidetes. (Figura 8). A maior abundância foi observada em sequência dos filos Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Deferribacteres e Cyanobacteria. Já os filos Proteobacteria e Actinobacteria notavelmente, foram mais abundantes nos grupos CS e FS quando

comparado aos demais grupos analisados. Observou-se ainda, que o grupo FHF apresentou abundância considerável do filo *Deferribacteria*, contudo o grupo CHF demonstrou declínio na abundância relativa do filo *Actinobacteria*.

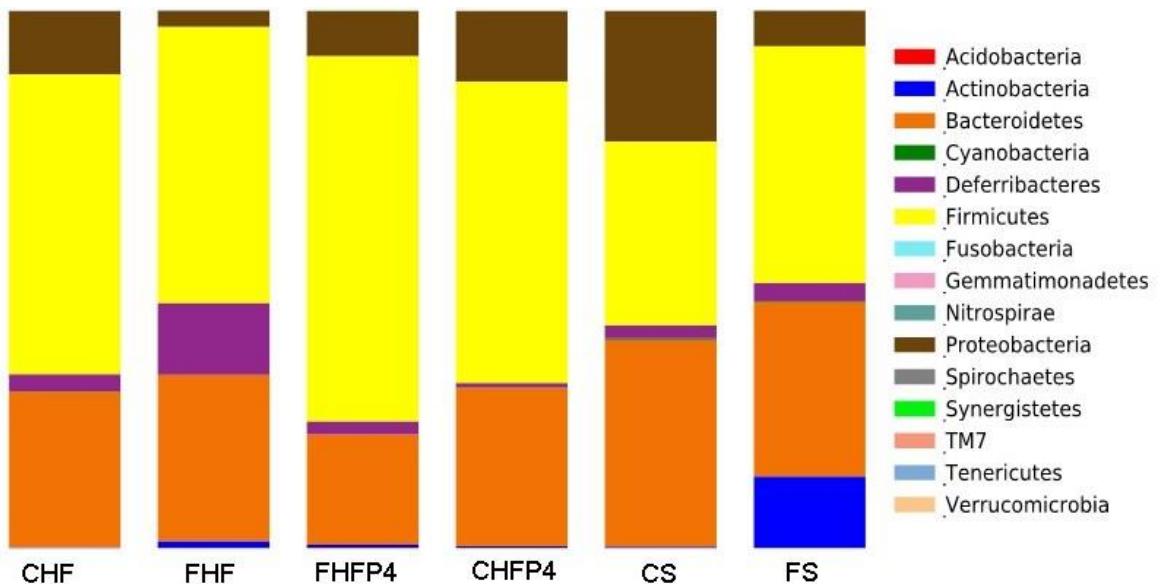


Figura 8: Abundância relativa dos filos bacterianos associados ao consumo da polpa liofilizada de bocaiuva. As sequências dos genes do 16S rRNA foram classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle *high fat*, FHF: *high fat* final, CHFP4: *high fat* polpa 4% controle, FHFP4: *high fat* polpa 4% final.

Ao analisar as sequências de DNA, depara-se com a associação entre α e β -diversidade da comunidade bacteriana. Sendo α o estudo da diversidade em cada indivíduo, e a β a diversidade de bactéria específica entre indivíduos. Em relação a riqueza/abundância estimada pelo índice de OTUs observados, a curva de rarefação demonstrou que houve diminuição da riqueza de OTUs observados para o grupo FHF, onde o grupo CHFP4 detectada possui maior riqueza de OTUs dentre os demais grupos analisados (CS, FS, CHF, FHF e FHFP4) (Figura 9).

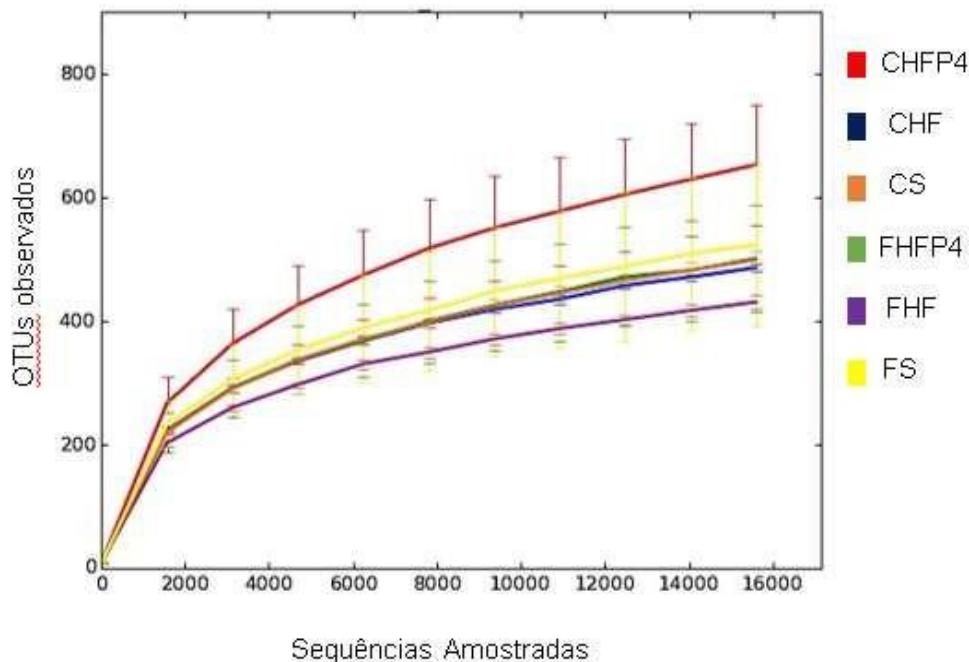


Figura 9: Curva de rarefação, estimado por OTUs observados das sequências do gene rRNA das fezes de camundongos *Mus musculus domesticus*, com um ponto de corte de 3%, calculada a partir de valores mínimos de sequência para comunidade de bactérias. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle high fat, FHF: *higth* fat final, CHFP4: *higth* fat polpa 4% controle, FHFP4: *higth* fat polpa 4% final.

A análise de β -diversidade, analisada por meio da distância não ponderada, foi demonstrado em gráfico PCoA (Figura 10). Por meio da análise foi possível observar que os grupos FHF e FS obtiveram similaridade entre suas comunidades bacterianas, que também foi possível ser observado nos grupos (CHF, CS E CHFP4). Por outro lado, a dieta do grupo FHFP4 induziu uma diferença notória na composição da comunidade bacteriana em comparação com as dietas dos demais grupos (CS, FS, CHF, FHF e CHFP4), indicando que o consumo da dieta *high fat* com adição de polpa 4% influenciou a comunidade de bactérias intestinais quando comparado aos demais grupos em análise.

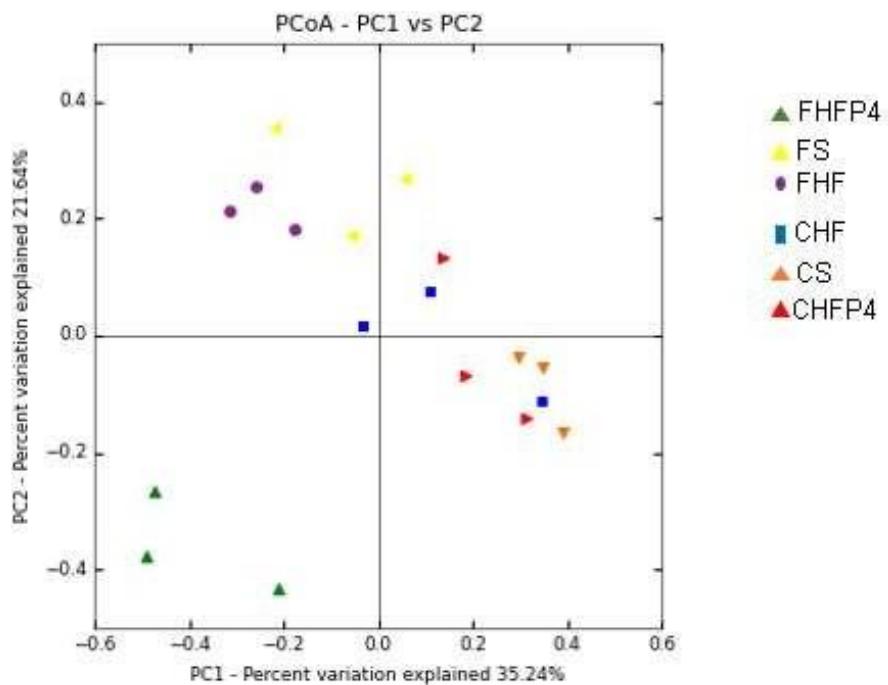


Figura 10: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene do 16S rRNA das amostras de fezes do *Mus musculus domesticus*. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Pearson. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle *high fat*, FHF: *high fat* final, CHFP4: *high fat* polpa 4% controle, FHFP4: *high fat* polpa 4% final.

Na análise Box plot que demonstra a distribuição da proporção relativa de abundância referente a filos bacterianos, foi possível observar que no grupo FHF houve uma maior proporção do filo *Deferribacteres* quando comparado com os demais grupos (Figura 11, A). Enquanto ao filo *TM7* apresentou maior abundância no grupo CHF (Figura 11, B). O filo *Proteobacteria* apresentou maior proporção no grupo CS (Figura 11, C). E por fim, o filo *Firmicutes* foi mais abundante no grupo CHF (Figura 11, D).

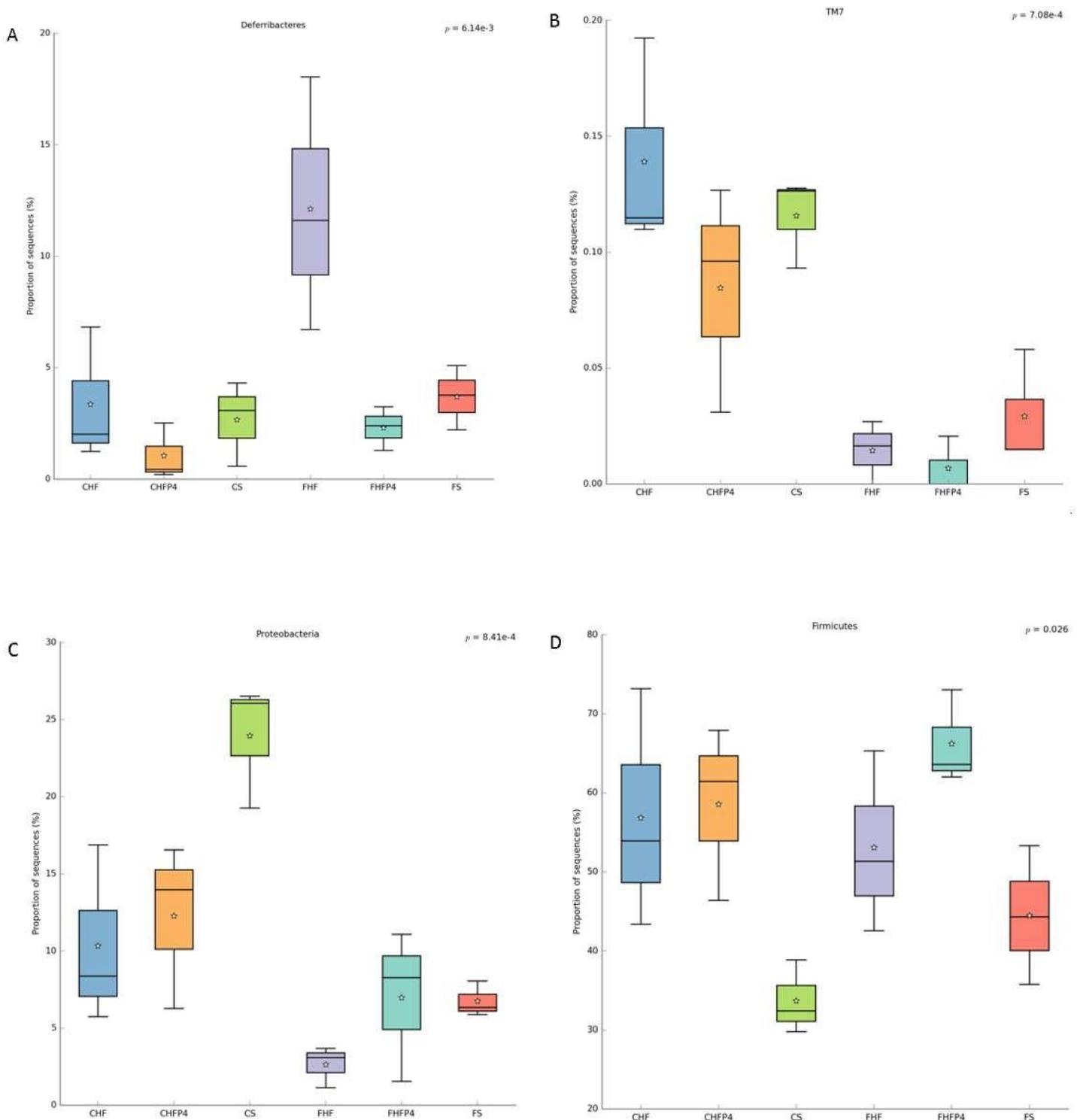


Figura 11: Box plot demonstrando a distribuição de proporção relativa de abundância referente a filos bacterianos. (A): Deferribacteres b): TM7 (c): Proteobacteria (d): Firmicutes. O valor mediano é mostrado como uma linha dentro da caixa e o valor médio como uma estrela. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle *high fat*, FHF: *high fat* final, CHFP4: *high fat* polpa 4% controle, FHFP4: *high fat* polpa 4% final.

Quando se tratando da análise de Box plot que demonstra a proporção relativa referente a gênero, foi possível avaliar que o gênero *Blautia* foi mais abundante no grupo CS, em comparação aos demais grupos (CHF, CHFP4, FHF, FHFP4 e FS) (Figura 12, A). Já em relação ao gênero *Lactobacillus*, abundância relativa foi maior no grupo FHFP4 (Figura 12, B).

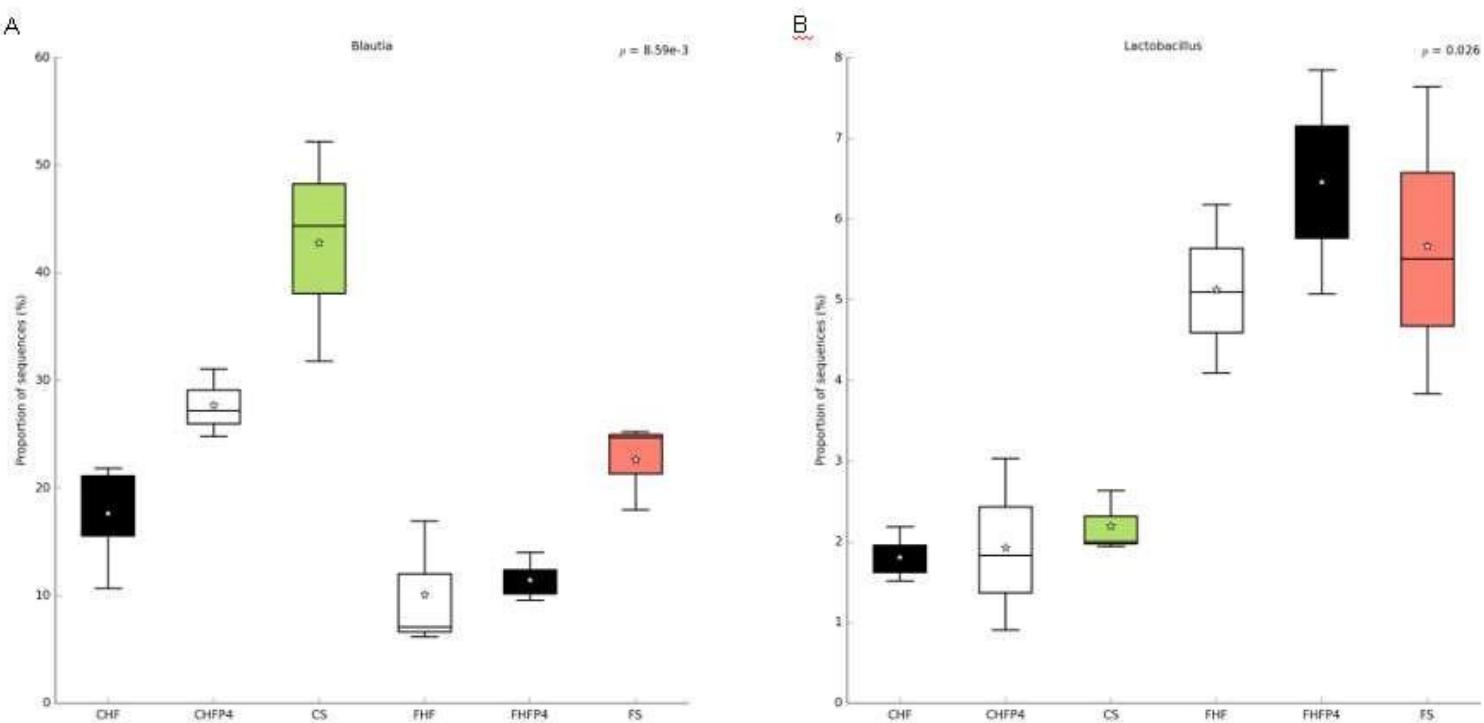
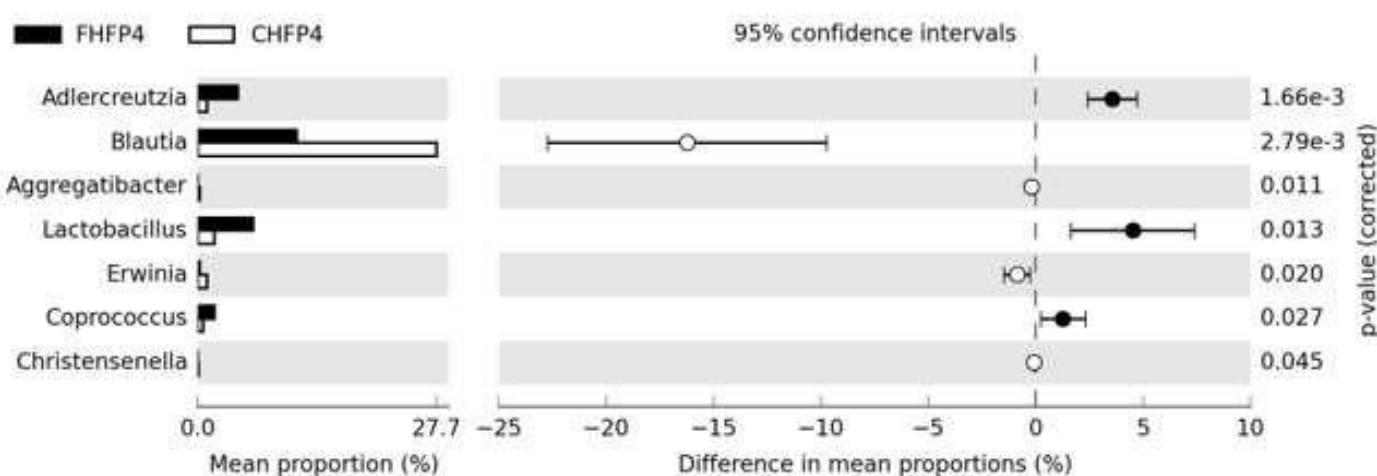


Figura 12: Box plot demonstrando a distribuição de proporção relativa de abundância referente a gêneros bacterianos. (A): *Blautia* (B): *Lactobacillus*. O valor mediano é mostrado como uma linha dentro da caixa e o valor médio como uma estrela. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle *high fat*, FHF: *high fat* final, CHFP4: *high fat* polpa 4% controle, FHFP4: *high fat* polpa 4% final.

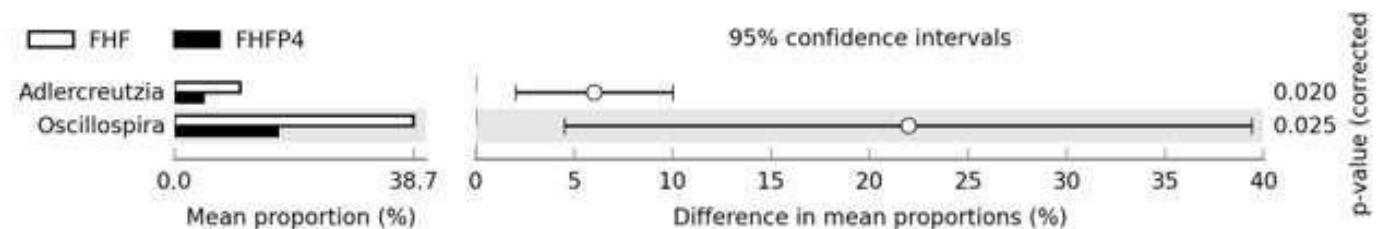
Dando seguimento as análises dos resultados desta pesquisa, foi possível detectar diferenças significativas (p - value 4.43^{-3} - 0,011) entre os gêneros bacterianos demonstrado na Figura 13. Foi notado uma maior abundância relativa no gênero *Adleucreutizia*, na comparação dos tratamentos FHFP4 vs CHFP4, FHF vs FHFP4 e CHF vs FHF (Figura 13 a b, c), respectivamente. Por outro lado, o gênero *Blautia* exibiu abundância relativa menor na comparação entre FHFP4 vs CHFP4 (Figura 13 a).

Em contrapartida, menores abundâncias relativas foram exibidas pelos gêneros *Aggregatibacter*, *Erwinia*, *Coproccoccus*, *Christensenella* na comparação entre os grupos FHFP4 vs CHFP4 (Figura 13 a). Com relação ao gênero *Lactobacillus* observou-se maior proporção em FHFP4 vs CHFP4 e menor em CHF vs FHF (Figura 13 a c). O genêro *Oscillospira* apresentou maior abundância na comparação entre os grupos FHF vs FH e menor na comparação CHF vs FHF (Figura 13 b, c). Já o genêro *Ruminococcus* apresentou maior proporção na comparação entre os grupos CHF vs FHF (Figura 13 c). Em se tratando do *Paenibacillus* a abundância foi menor comparando-se CHF vs CHFP4 (Figura 13 d).

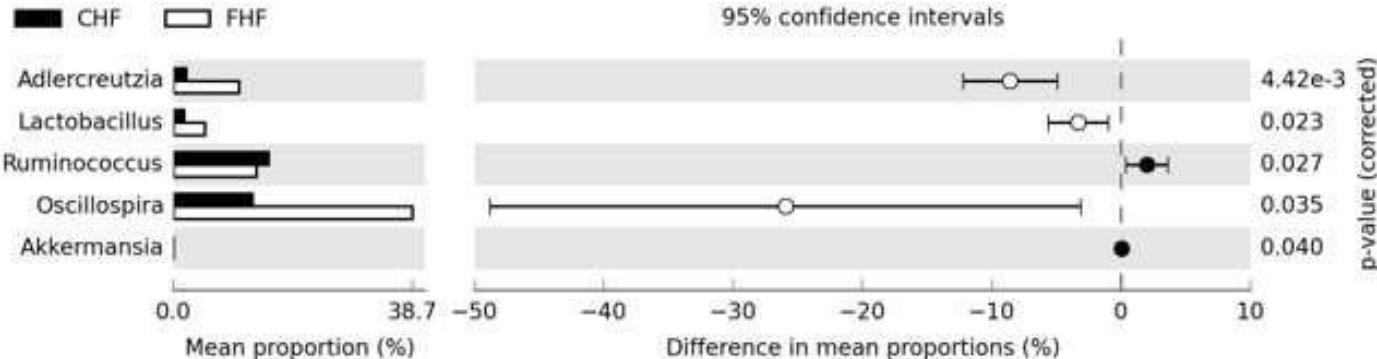
A



B



C



D

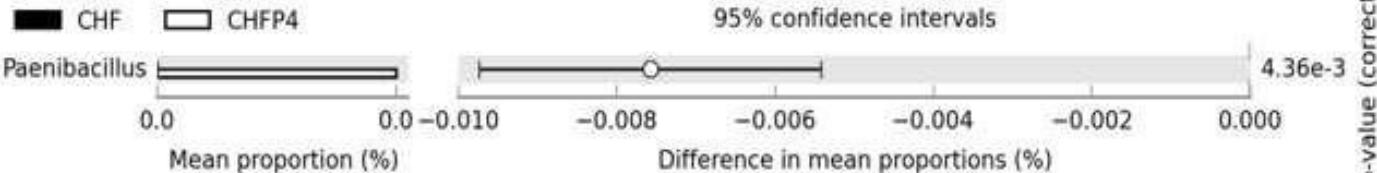


Figura 13: Proporção relativa de abundância referente a gêneros bacterianos. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por último o *p*-value indicando se a proporção média é igual para um determinado par. CS: controle sham, FS: sham final, CHF: controle *high fat*, FHF: *high fat* final, CHFP4: *high fat* polpa 4% controle, FHFP4: *high fat* polpa 4% final.

6. DISCUSSÃO

6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

De acordo com os resultados do presente estudo, foi possível observar que a extração direta de DNA, avaliado por gel de agarose 0,8%, foi eficiente pois demonstrou a presença de DNA metagenômico nas amostras fecais. Essa técnica de eletroforese, tem como base a migração de fragmentos de DNA para o pólo positivo (ânodo), devido os ácidos nucléicos apresentarem grupo fosfato que são responsáveis pela carga negativa. Contudo, é de extrema importância aplicar a técnica de quantificação para um resultado mais fidedigno. Utiliza-se o equipamento de fluorímetro, QUBIT® 2.0, de alta sensibilidade, sendo 1 μ L suficiente para obter altos níveis de precisão (MANUAL DO USUÁRIO QUBIT 2010). Portanto, o resultado obtido com a variação de 11,2 a 130 ug/UL demonstra que as amostras estão aptas para o sequenciamento, devido a empresa terceirizada (GenOne) estipular um valor de 10 ug/UL como adequada para dar continuidade ao projeto.

6.2 MICROBIOTA INTESTINAL

Os modelos de camundongos são amplamente utilizados no estudo de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal (TGI), devido a sua aparente semelhança metabólica com os seres humanos (YANG, et al., 2015). Neste estudo foi aliado modelo animal com o estudo metagenômico, no intuito de avaliar se a fibra alimentar da polpa de Bocaiuva foi capaz de modular a microbiota intestinal de camundongos Swiss.

Dessa maneira, ao analisar esses resultados metagênicos, depara-se com estudos de alfa e beta diversidade. Ao se tratar de alfa diversidade (Figura 8) foi notório observar que a microbiota dos camundongos teve predominância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, porém a abundância de Firmicutes foi maior no grupo CHF comparando ao CS. O mesmo resultado foi encontrado por LIU et al (2019), mostrando que a dieta rica em gordura modificou a composição da microbiota intestinal.

Ao comparar o grupo FS em relação ao CS, o filo de maior abundância foi Actinobacteria, demonstrando que apesar de terem a mesma composição alimentar

(dieta AIN 93), o tempo de exposição à dieta foi determinante para modular a microbiota intestinal. Este resultado é corroborado por MAKKI et al (2018), pois refere que os padrões alimentares de longo prazo impulsionam alterações na população bacteriana. A idade também é um indicativo importante na alteração da microbiota intestinal, conforme ANGELAKIS et al (2012), que observaram em indivíduos jovens presença de bactérias possivelmente benéficas enquanto que no grupo de idosos, bactérias possivelmente maléficas. Sabe-se que muitos fatores interferem na modulação da microbiota intestinal (ambientais, hábitos alimentares, estado psicológico entre outros) (TOPPING *et al.*, 2001).

O grupo FHF apresentou maior abundância relativa do filo *Deferribacteres* quando comparado ao grupo CHF. Este filo, de acordo com BILAK et al. 2009, está diretamente relacionado a disbiose intestinal. Por esse motivo, uma maior exposição a dieta com alto teor de gordura, prejudicou a composição da comunidade bacteriana. Quando comparado os grupos FHF com FS, evidenciou-se a redução do filo *Actinobacteria* no grupo FHF. Um achado semelhante foi encontrado no estudo de LIU et al (2019) que demonstrou no grupo contendo alto teor de gordura uma redução significativa na diversidade da microbiota quando comparado aos grupos que receberam dieta com baixo teor de gordura. Portanto, a dieta gordurosa desequilibra a diversidade da comunidade bacteriana (PEREZ et al., 2015).

A dieta rica em gordura é suficientemente capaz de induzir a obesidade, gerar o processo inflamatório e promover a síndrome metabólica (WHITE et al., 2012). Assim como demonstrado por Faith et al (2013) que o processo inflamatório (Fator de necrose tumoral, Interleucina-6, Adipocinas) está diretamente ligado a uma comunidade bacteriana desequilibrada.

Ao analisar o grupo FHFP4 foi observado uma redução do filo *Proteobacteria* quando comprado ao grupo CHFP4, demonstrando que a presença da polpa de Bocaiuva foi eficiente na melhora da composição da microbiota intestinal. Em desacordo com o nosso resultado, Liu et al (2019), observou um aumento do filo *Proteobacteria* na dieta gordurosa com adição de mirtilo, que também é um alimento funcional. Sabe-se que maior abundância de *Proteobactéria* no intestino está diretamente associado a um desequilíbrio na homeostase intestinal (FILIPPO et al., 2010). Em um estudo realizado com crianças europeias que consumiram dieta rica

em gordura e pobre em fibra, apresentaram uma maior concentração de Proteobactéria quando comparado as crianças que consumiram pouca gordura e alta quantidade de fibra. Outro fator que eleva a concentração e ou proliferação de Proteobacterias e prejudica o controle glicêmico, é o consumo de adoçantes e emulsificantes artificiais não calóricos (CHASSAING *et al.*, 2015). Daí a importância de utilizar alimentos funcionais como meio de modular a microbiota intestinal, uma vez, que as bactérias possuem enzimas que são essências para desprender nutrientes de compostos dietéticos complexos, tal como a fibra alimentar (MENG *et al.*, 2016).

Considerando o término do período experimental, ao comparar os grupos FHF e FHFP4, observou-se que houve maior abundância de *Deferribacteres*, o que pode acarretar em desequilíbrio intestinal. De acordo com Yang *et al* (2015), a disbiose também ocorre pelo fato do filo *Deferribacteres* produzir energia a partir da redução de ferro e manganês do hospedeiro. Já no grupo FHFP4, foi observado uma menor abundância deste filo, demonstrando mais uma vez que a fibra presente na polpa da Bocaiuva, modulou beneficamente a microbiota intestinal. Tal achado vai de encontro com Brownawell *et al* (2012), que demonstrou que a fibra solúvel devido a sua característica química, apresenta uma maior fermentabilidade, diminuição do pH, redução do crescimento de patógenos e bactérias putrefatativa, beneficiando assim o hospedeiro.

No que tange a quantidade de OTUs em cada grupo (Figura 9), o grupo CHFP4 revelou uma maior riqueza (500.000) de OTUs, quando comparado aos demais grupos, devido ao acréscimo de polpa de bocaiuva. Acredita-se que este resultado tenha ocorrido devido ao menor tempo de exposição à dieta gordurosa, uma vez que, no tempo inicial, os grupos ficaram expostos as diferentes dietas por um breve período de tempo. Ainda assim, é importante ressaltar, que o grupo FHFP4 teve maior tempo de exposição a dieta gordurosa em relação ao grupo CHFP4, ressaltando que 4% de polpa de bocaiuva foi determinante para modular beneficamente a comunidade bacteriana, já que o grupo FHFP4 ficou relativamente bem próximo dos grupos CS e FS. Demonstrando que mesmo a dieta sendo rica em gordura a polpa manteve a quantidade de OTUs, semelhantes aos grupos CS, FS que receberam dieta AIN-93 e CHF que recebeu dieta gordurosa, porém no tempo inicial. Reforçando mais uma vez, que a fibra alimentar, presente na polpa de bocaiuva, manteve o grupo FHFP4

semelhante aos números de OTUs mesmo com dieta gordurosa. Os resultados de MAKKI et al (2018) corroboram com o nosso, uma vez que constataram que dieta rica em fibras contribuiu para a manutenção da microbiota intestinal saudável.

Ao analisar a β -diversidade, PCoA (Análise de Coordenada Principal), foi notório observar que os grupos FHF e FS demonstraram similaridade entre si. Um resultado não esperado, uma vez que a composição dietética recebida pelos grupos foi diferente. Porém, como anteriormente já mencionado, a manutenção da dieta por um longo período de tempo foi um fator decisivo no desequilíbrio da comunidade bacteriana. É possível que o grupo FS tenha permanecido semelhante ao grupo FHF no final do experimento, por causa do excesso de carboidratos na dieta AIN 93 (SANTOS et al., 2015). Entretanto o grupo CHFP4 apresentou similaridade de OTUs em relação ao grupo CHF e CS, uma vez que ambos estão no tempo inicial. Apesar das diferentes composições dietéticas, possivelmente o tempo tenha sido insuficiente para não causar diferença entre os grupos. O FHFP4 foi o único grupo que permaneceu semelhante em número de OTUs.

Sabe-se que o mecanismo de barreira física, resposta imune e exclusão de metabólitos são as principais funções do epitélio gastrintestinal. Estas funções são influenciadas através de uma relação complexa entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, portanto a compreensão da variabilidade da comunidade bacteriana intestinal é de suma importância para entender as doenças (BRETON et al., 2013).

Ainda na β -diversidade, foi feito um estudo onde demonstrou que os filos Deferribacteres, TM7, Proteobacteria e Firmicutes, apresentaram maior abundância relativa entre os grupos (FHF, CHF, CS e CHF) respectivamente. Em contrapartida a este estudo, o autor LIU et al (2019), demonstrou que ao comparar a comunidade bacteriana entre diferentes dietas, com ratos alimentados com dieta de baixo teor de gordura (*low-fat*), as alterações da microbiota induzidas por dieta de alto teor de gordura (*high fat*) foram representadas por Firmicutes e Proteobactéria em maior quantidade.

Ainda no presente estudo, foram observadas variações importantes em nível de gênero, sugerindo que 4% de polpa de bocaiuva foi relevante na modulação da microbiota intestinal. Neste contexto, a administração da dieta *high fat* acrescida de 4% de polpa no tempo final (FHFP4), induziu o aumento da população de *Lactobacillus* (Figura 12, B). Esse gênero é considerado um componente subdominante da microbiota intestinal, pois não estimula o sistema imunológico e não causa reações

patogênicas (O'CALLAGHAN J et al., 2013). O gênero *Lactobacillus* ainda mantém a função da barreira nas células epiteliais intestinais (KIRPICH et al., 2016).

Já o gênero *Blautia* apresentou maior abundância relativa no grupo CS em relação aos demais grupos. O papel desse gênero na microbiota intestinal ainda é obscuro, porém sabe-se até o momento, que é uma bactéria estritamente anaeróbica e gram positiva (SHIN et al., 2018), além de utilizar carboidratos como substrato

fermentáveis e produzir lactato e acetato como os principais produtos finais da fermentação (PARK et al., 2013). Em um estudo realizado em crianças diabéticas houve redução de *Blautia* (MURRI et al., 2013). O mesmo resultado foi encontrado

por CHEN et al (2012) com indivíduos acometidos de câncer colorretal. Por essas razões, é possível que este gênero pode desempenhar funções importantes na saúde.

Os gêneros *Oscillospira*, *Ruminococcus* e *Paenibacillus* foram significantemente mais abundantes, em relação aos demais gêneros presentes nos diferentes grupos.

O gênero *Ruminococcus* foi mais abundante no grupo CHF, sendo associado a uma microbiota intestinal disbiótica, por estar relacionado ao estresse oxidativo em pacientes com doença inflamatória intestinal (HALL et al., 2017). Em contrapartida o estudo de Crost et al (2013), demonstrou que o gênero *Ruminococcus* é abundante no intestino grosso humano (10-40%), e estão correlacionados com a degradação de fibra vegetal no lúmen por serem microrganismos celulolíticos.

Já os achados de Tims et al (2013) e Konikoff et al (2016) sobre *Oscillospira*, mostram associação positiva ao estado de magreza e saúde. Acredita-se que o gênero *Oscillospira* está envolvido na produção de energia derivada de dieta rica em glicoproteínas animal, além da produção de butirato derivado de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). No entanto, esse gênero foi identificado com maior abundância, no grupo que recebeu dieta gordurosa (FHF) no nosso estudo.

E por fim, o gênero *Paenibacillus* foi mais abundante no grupo CHFP4. Vale ressaltar que em estudo realizado com crianças africanas saudáveis, *Paenibacillus*, que consiste em bacilos móveis Gram-variáveis, formadores de esporos e fixadoras de nitrogênio, não apresentou efeito patogênico (ZHANGA et al., 2019).

Assim sendo, a microbiota intestinal por representar uma inovação preventiva e terapêutica de várias doenças, especialmente cardiometabólica, inflamatórias e cânceres, é de fundamental importância compreender o impacto das intervenções dietéticas na homeostase intestinal.

Portanto, a abordagem de técnicas moleculares que caracterizou as comunidades bacterianas intestinais, foi possível demonstrar que um alimento funcional (4% de polpa de bocaiuva), mesmo diante de uma dieta *high fat*, foi capaz de modular a microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANA, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998.

ANGELAKIS, E.; ARMOUGOM, F.; MILLION, M. RAOULT D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 91-109, 2012.

ARRUDA, H. S.; CRUZ, R. G.; ALMEIDA, M. E. F. Caracterização química, funcionalidade e toxicidade do pequi. **Nutrição Brasil**. São Paulo, v. 11, n. 5, p. 315-319, 2012.

ANJOS, L. A.; TEIXEIRA, F. C.; WAHRLICH, V.; VASCONCEL, L. O. S.; M. T. L.; GOING, S. B. Percentage body fat and body mass index in a urban Brazilian adult probability sample. **Cad Saúde Pública**, v. 29, p. 73-81, 2013. 29:73-81.

ATHYROS, V. G.; TZIOMALOS, K.; KARAGIANNIS, A.; ANAGNOSTIS, P.; MIKHAILIDIS, D. P. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? **Current drug targets**, v. 11, n. 1, p. 122-135, jan. 2010.

AZCARATE-PERIL, M.A.; RITTER, A.J.; SAVAIANO, D.; MONTEAGUDO-MERA, A.; ANDERSON, C.; MAGNESS, S.T.; KLAENHAMMER, T.R. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.114, p.367-375, 2017.

BÄCKHED, F.; MANCHESTER, J. K.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germfree mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, n. 3, p. 84-979, 2007.

BARBOSA, F. et al. Microbiota indígena do trato gastrintestinal. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Aracaju, v. 10, n. 1, p. 78-93, 2010.

BAURHOO, B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C.A. Cecal populations of Lactobacilli and Bifidobacteria and Escherichia coli after In Vivo Escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligo-saccharides. **Poult. Sci**, v. 86, p. 2509-2516, 2007.

BERDANI, R.; ROSSI, E. Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastroenterologia**, Lisboa, v. 15, p. 19-28, jan. / fev. 2009.

BERNAUD, F.; S.; R. RODRIGUES, T.; C. Rodrigues^{1,2} Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.57, p. 397-405, 2013.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee Index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, p. 527–528, 1968.

BESTEN, G. D. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, 2013.

BILAK, E.; J. ROUDIE, L. MARCHANDIN, H. Description of ‘Synergistetes’ phyl. nov. and emended description of the phylum ‘Deferribacteres’ and of the family Syntrophomonadaceae, phylum ‘Firmicutes’. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p. 1028- 1035, 2009.

BINNS, N. **Probiótico, prebióticos e a microbiota intestinal**. Bruxelas: Ilse Europa, 2014.

BOLINA, I.; C. CREN, E.; C. - ESTUDO DA MORFOLOGIA E DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS DAS FIBRAS ALIMENTARES EXTRAÍDAS POR ROTA QUÍMICA E ENZIMÁTICA DOS FARELOS DA POLPA E AMÊNDOA DA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*), XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016.

Brasil. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – VIGITEL**, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: obesidade**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: obesidade**. Brasília, DF, 2014.

BRETON, J.; MASSART, S.; VANDAMME, P.; DE BRANDT, E.; POT, B.; FOLIGNÉ, B. BRETON, Jérôme et al. Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 62, 2013.

BROWNAWELL, A. M.; CAERS, W.; GIBSON, G. R.; KENDALL, C. W. C.; LEWIS, K. K. D.; RINGEL, Y.; SLAVIN, J. L. Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals^{1,2}. **The Journal of Nutrition Supplement. J. Nutr**, v. 142, p. 962–974, 2012. (AMY)

BUTTRISS, J. L.; STOKES, C. S. Dietary fibre and health: an overview. **Nutr Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 186-200, 2008.

CAMACHO, P. D.; HENRIQUES, P.; ANJOS, L. A.; BURLANDY, L. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cad. Saúde Pública**, v. 33, n. 7, 2017.

CANI, P.D.; POSSEMIERS, S.; VAN, D. W. T.; GUIOT, Y.; EVERARD, A.; ROTTIERO, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p.1091-103, 2009.

CARVALHO, B. M.; GUADAGNIN, D.; TSUKUMO, D. M.; SCHENKA, A. A.; LATUF-FILHO, P.; VASSALLO J.; et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2823-34, 2012.

CETEC. CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: Estudo das oleaginosas nativas de Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG, 1983.

CHAMBERS, E. S.; VIARDOT, A.; PSICHAS, A.; MORRISON, D. J.; MURPHY, K. G.; ZAC-VARGHESE, S. E. ET AL. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut**, 2014.

CHEN, W.; LIU, F.; LING, Z.; TONG, X.; XIANG, C. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. **Plos One**. v. 7, n. 6, p. e39743, 2012.

CLASSAING, B. KOREN, O. GOODRICH J.; K. POOLE, A.; C. SRINIVASAN, S. LEY R.; E. GEWIRTZ, A.; T. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, p.92-96, 2015.

CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M.J. Prebiotics. In *Handbook of Probiotics and Prebiotics*; Lee, Y.K., Salminen, S., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, p. 535–561, 2009.

CROST, E.; H. TAILFORD, L.; E. GALL, G.; L. FONS, M. HENRISSAT, B. JUGE, N. Utilisation of Mucin Glycans by the Human Gut Symbiont *Ruminococcus gnavus* Is Strain-Dependent. **PLOS ONE**, v.8, p.1-13,2013.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; PAOLA M. D.; RAMAZZOTTI,M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACINI G.; LIONETTI, P. **PNAS**, v. 107, p. 14691–14696, 2010.

DEVARAJ, S.; HEMARAJATA, P.; and VERSALOVIC, J. The Human Gut Microbiome and Body Metabolism: Implications for Obesity and Diabetes. **Clin Chem**, v. 59, n. 4, p. 617-628, 2013.

DUNCAN, S. H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G.; INCE, J.; JOHNSTONE, A. M.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **Int J Obes**, v. 32, n. 11, p. 1720-4, 2008.

DUNMORE S. J.; BROWN J. E. P. The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. **Journal of Endocrinology**. v. 216, n. 1, p. 37-45, jan. 2013.

EFSA. (2010b). Outcome of the public consultation on the draft opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition, and allergies (NDA) on dietary reference values for carbohydrates and dietary fibre. EFSA Journal, 8(5), 1508. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1508>.

FERNANDES, M.; PAES, C.; NOGUEIRA, C.; SOUZA, G.; AQUINO, L.; BORGES, F.; RAMALHO, A. Perfil de consumo de nutrientes antioxidantes em pacientes com síndrome metabólica. **Revista de Ciências Médicas**, v. 16, n. 4-6, p. 209-219, 2007.

FERNANDES, M.; R. IMPACTO METABÓLICO E FUNCIONAL DA POLPA LIOFILIZADA DE BOCAIUVA EM ANIMAIS COM OBESIDADE, v.1, p.1-94, 2018

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise – Sociedade Portuguesa de Bioanalistas da Saúde**, ano 4, n. 2, p. 32-39, 2007.

FAITH, J.; J. GURUGE, J.; L. CHARBONNEAU, M. SUBRAMANIAN, S. SEEDORF, H. GOODMAN, A.; L. CLEMENTE, J.; C. KNIGHT R. HEATH A.; C. LEIBEL, R.; L. ROSEANBAUM, M. GORDON, J.; I. The long-term stability of the human gut microbiota. **National of health institutes**, v. 341, p. 1-19, 2013.

FRANASIAK, J.M.; WERNER, M. D.; JUNEAU, C. R.; TAO, X.; LANDIS, J. N.; ZHAN, Y.; TREFF, N. R.; SCOTT, R. T. Microbiome at the time of embryo transfer: next generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 3, p. e54-e55, 2015.

FRANÇA, F. C. O.; MENDES, A. C. R.; ANDRADE, I. S.; RIBEIRO, G. S.; PINHEIRO, I. B. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. **Anais do I Seminário Alimentação e Cultura na Bahia**, 2012.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139-147, 2014.

GOEL, A.; GUPTA, M.; AND AGGARWAL, R. Gut microbiota and liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 29, p. 1139–1148, 2014.

GOMES, F.; TELO, D. F.; SOUZA, H. P.; NICOLAU, J. C.; HALPERN, A.; SERRANO, C. V. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 2, p. 273-279, 2010.

GIBSON, G.R.; et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **IFIS Functional Foods Bulletin**, v. 7, p. 1-19, 2011.

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.

GONNELLI, S.; CAFFARELLI, C.; NUTI, R. Obesity and fracture risk. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2014.

HALL, A.; B. YASSOUR, M. SAUK, J. GANNER, A. JIANG, X. ARTHUT, T. LAGOUDAS, G. VATANEN, T. FORNELO, N. WILSON, R. BERTHA, M. COHEN, M. GARBER, J. KHALILI, H. GEVERS, D. ANANTHAKRISHNAN, A.; N. KUGATHASAN, S. LANDER, E.; S. BLAINY, P. VLAMAKI, H. XAVIER, R. HUTTENHOWER, C. A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. **Genome Medicine**, v.9, p. 1-12, 2017.

HIANE, P.A.; MACEDO, M.L.R.; SILVA, G.M.; NETO, J.A.B. Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., em ratos wistar em crescimento. **Boletim CEPPA**, v. 24, n. 1, p. 191-206, 2006;

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Despesas, rendimentos e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

JUMPERTZ, R.; PETER, D. S. L.; CATHY, J. T.; CLIFTON, T.; JEFFREY, B. J.; KRAKOFF, I. G. J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 94, p. 58-65, 2011.

KENDLE, M.; MASLOWSKI, A.T.; VIEIRA, A. N. G.; KRANICH J.; SIERRO, F.; DI, Y. U.; C. SCHILTER, H. C.; ROLPH, M. S.; MACKAY, F.; ARTIS, D.; XAVIER, R. J.; TEIXEIRA M. M.; AND MACKAY, C. R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 29, n. 461, p. 1282-1286 2009.

KIRPICH, I. A.; PETROSINO, J.; AJAMI, N.; FENG, W.; WANG, Y.; LIU, Y.; BEIER, J. I.; BARVE, S. S.; YIN, X.; WEI, X.; ZHANG, X.; MCCLAIN, C. J. Saturated and Unsaturated Dietary Fats Differentially Modulate Ethanol-Induced Changes in Gut Microbiome and Metabolome in a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 4, p. 765-776, 2016.

KOBYLIAK, N.; CONTE, C.; CAMMAROTA, G.; HALEY, A. P.; STYRIAK, I.; GASPAR, L.; FUSEK, J.; RODRIGO, L.; and KRUZLIAK, P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & Metabolism**, p.13-14, 2016.

KOBYLIAK, N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutr J**, p. 15- 43, 2016.

KOLA, B. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. **J Neuroendocrinol**, v. 20, p. 51- 942, 2008.

KONIKOFF, T. GOPHNA, U. Oscillospira: A Central, Enigmatic Component of the Human Gut Microbiota. **Trends in Microbiology**, v.20, n.1-2 2016

KOPPER, A., SARAVIA, A. P., RIBANI, R., E LORENZI, G. M. "Utilização tecnológica da farinha de bocaiuva na elaboração de biscoitos tipo cookie". **Alimentos e Nutrição Araraquara** [online], v.20, n.3, p. 463-469, 2009.

LAYDEN, B.T.; ANGUEIRA, A.R.; BRODSKY, M.; DURAI, V.; AND LOWE, W.L.; JR. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. **Transl. Res.**, v. 161, p. 131–140, 2013.

LEITE, L. D.; ROCHA, E. D. M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez. 2009.

LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n. 31, p.11070-5, 2005.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p.1022- 3 2006.

LIU, H.; Y. WALDE, T. B.; CAI, D.; AHL, D.; BERTILSSON, S.; PHILIPSON, M.; NYMAN, M.; NYMAN, M.; HOLM, L. Dietary Fiber in Bilberry Ameliorates Pre-Obesity Events in Rats by Regulating Lipid Depot, Cecal Short-Chain Fatty Acid Formation and Microbiota Composition. **J.Nutrients**, v. 1350, p.1-17, 2019.

LORENZI, G.M.A.C. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. 2006. 154 p. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LUPP, C.; FINLAY, B. B. intestinal microbiota. **Curr Biol**, v.15, p. 235–236, 2005.

MACCFARLANE, G.T.; STEED, H.; MACCFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **J. Appl. Microbiol**, v.104, p. 305-3044, 2008. 104, 305–344.

MACHADO, J. B. A. Uso da biblioteca genômica RNA 16s como ferramenta para o estudo da microbiota fecal humana. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmácia) — Programa de pós-graduação em Farmácia Área Análises Clínicas, FCF/USP, São Paulo.

MENG, M.M.; TAI, H. M. Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. **Food Chemistry**, v. 194, p. 237–246, 2016.

MANDAL, R. S.; SAHA, S.; DAS, S. Metagenomic surveys of gut microbiota. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 13, n. 3, p. 148-158, 2015.

MANUAL DO USUÁRIO FLUORÍMETRO 2.0 QUBIT®. Rev. Date: 4 October 2010. 41 p. MAN0003231disponível em: <http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2_Fluorometer_UserManual.pdf>. Acesso em: 29 abril 2016

- MAKKI, K. DEEHAN, E.; C. WALTER, J. BEACKHED, F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. **CellPress**, v. 23, p. 705-715, 2018.
- MARIETTA, E.; RISHI, A.; TANEJA, V. Immunogenetic control of the intestinal microbiota. **Immunology**, v. 145, n.3, p. 313-322, 2015.
- MARKOWIAK, P.; SLI'ZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 30, 2017.
- MATTU, H. S; RANDEVA, H. S. Role of adipokines in cardiovascular disease. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 1, p. 17-36, jan. 2013.
- MEYER, D.; SENSUS, B. V.; ROOSEENDA, A. L. et al. The Netherlands Health Benefits of Prebiotic Fibers. **Elsevier Inc**, ISSN 1043-4526 All rights reserved.
- MIRAGLIA, F.; MELLO, E. D. Como avaliar o processo inflamatório em crianças com excesso de peso? **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 32, n. 3, p. 332-339, ago. 2012.
- MOOZ, E.D.; CASTELUCCI, M.H.; SPOTO, M.H.F. Potencial tecnológico e alimentício de frutos de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.3, n.2, p.86-89, 2012.
- MONTEAGUDO-MERA, A.; ARTHUR, J. C.; JOBIN, C.; KEKU, T.; BRUNO-BARCENA, J. M.; AZCARATE-PERIL, M. A. High purity galacto-oligosaccharides enhance specific *Bifidobacterium* species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. **Beneficial microbes**, v. 7, n. 2, p. 247-264, 2016.
- MORAES, A. C. F.; SILVA, I. T.; ALMEIDA-PITITOTO, B.; FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 4, p. 317-327, 2014.
- MOREIRA, A. P. B.; TEIXEIRA, T. F. S.; FERREIRA, A. B.; PELUZIO, M. C. G.; and ALFENAS, R. C. G. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 801-809, 2012.
- MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2016.
- MOTTA, N. A. V.; FUMIAN, M. M.; CASTRO, J. P.; BRITO, F. C. F. Inflamação e aterosclerose: novos biomarcadores e perspectivas terapêuticas. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 26, n. 5, p. 390-399, 2013.
- NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.
- NISTAL, E.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, N.; VIVAS, S.; OLCOZ, J. L. Factors determining colorectal cancer: the role of the intestinal microbiota. **Frontiers in oncology**, v. 5, 2015.

OLIVEIRA, B. M. G. B.; MEDEIROS, M. M. C.; CERQUEIRA, J. V. M.; QUIXADÁ, R. T. S.; OLIVEIRA, I. M. X. Síndrome metabólica em pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide acompanhados num hospital universitário do Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, 2016.

OTTAVIANI, E.; MALAGOLI, D.; FRANCESCHI, C. The evolution of the adipose tissue: An neglected enigma. **Gen Comp Endocrinol**, v.174, p. 1-4, 2011.

O'CALLAGHAN, J.; O'TOOLE P. W. Lactobacillus: Host–Microbe Relationships. **CT MICROBIOLOGY**, v. 358, p. 119-154, 2011.

PADDU, A. et al. Evidence for the Gut Microbiota Short-Chain Fatty Acids as Key Pathophysiological Molecules Improving Diabetes. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715-721, 2010.

PARK, S.; K. KIM, M.; S. BAE, J.; W. Blautia faecis sp. nov., isolated from human faeces. **Printed in Great Britain**, v. 63, p.599 – 603, 2013.

PAULINA, M.; KATARZYNA, S. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, p. 1021, 2017.

PENHA, F. M.; REZZADORI, K.; PRONER, M. C.; ZIN, G.; FOGAÇA, L. A.; PETRUS, J. C. C.; OLIVEIRA, J. V.; LUCCIO. Evaluation of permeation of macauba oil and n-hexane mixtures through polymeric commercial membranes subjected to different pre-treatments. **Journal of Food Engineering**, v. 155, p. 79-86, 2015.

PEREZ, M. A.; NEEF, A.; SANZ, Y. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 reduces obesity-associated inflammation by restoring the lymphocyte-macrophage balance and gut microbiota structure in high-fat diet-fed mice. **PLOS ONE**, v.10, p.1-28, 2015.

PINTO, W. J. A função endócrina do tecido adiposo. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111-120, out. 2014.

PI-SUNYER, X.; RUDERMAN, N.; CHISHOLM, D.; SCHNEIDER, S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. **Diabetes**, v. 47, p. 699- 713, 1998.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 1, p. 3–21, 2012.

PRADO, W. L.; LOFRANO, M. C.; OYAMA, L. M.; DAMASO, A. R. Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, set. /out. 2009.

RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. A. Qualidade nutricional da polpa de bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p.90-94, 2008.

REIMER, R. A.; MAURER, A. D.; ELLER L. K.; HALLAM, M. C.; SHAYKHUTDINOV, R.; VOGEL, H. J.; ET AL. Satiety hormone and metabolomic response to an intermittent high energy diet differs in rats consuming long-term diets high in protein or prebiotic fiber. **J Proteome Res**, v. 11, p. 4065–4074, 2012.

RICHARDS, L. B. et al. The effects of short-chain fatty acids on the cardiovascular system. **PharmaNutrition**, v. 4, n. 2, p. 68-111, 2016.

RÍOS-COVIÁN, D. et al. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 185, 2016.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I., et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 1-63, 2010. (Suppl. 2), S1–S63. (2010).

SÁEZ-LARA, M.J.; ROBLES-SANCHEZ, C.; RUIZ-OJEDA, F.J.; PLAZA-DIAZ, J.; GIL, A. Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: **A review of human clinical trials**. **Int. J. Mol. Sci.**, v.17, p.928, 2016.

SALENEN, A.; DE VOS, W. M. Impact of Diet on Human Intestinal Microbiota and Health. **Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 239-262, 2014.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J.; CHUBA, C.A.M. Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n.3, p. 1023-1028, 2011.

SANTOS, J.; F. SURUAGY, M.; A. OLIVEIRA, S.; L. BARBOSA, P. CABRAL, C.; R. MELO, I.; S. BUENO, N.; B. FREITAS, J.; D.; SANTANA, A.; ATAÍDE, T.; R. Dietary intake of AIN-93 standard diet induces fatty liver with altered hepatic fatty acid profile in Wistar rats. **Nutrición Hospitalaria**, v.31, p. 2140 – 2146, 2015.

SERDOURA, S. V. Microbiota intestinal e Obesidade. 2017. (Tese de Licenciatura) — Ciências da Nutrição, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859- 904, 2010.

SHEN, X. J.; RAWLS, J. F.; RANDALL, T. BURCAL, L.; MPANDE, C. N.; JENKINS, N.; JOVOV, B.; ABDO, Z.; SANDLER, R. S.; KEKU, T. O. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. **Gut Microbes**, v. 1, n.3, p. 138-147, 2010.

SIPPEL, C.; BASTIAN, R. M. A.; GIOVANELLA, J.; FACCIN, C.; CONTINI, V.; DAL BOSCO, S. M. Processos inflamatórios da obesidade. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 12, n. 42, p. 48-56, 2014.

SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. G. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, p. 61-69, 2014.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: recente findings and future perspectives. *Nutrition, metabolismo and cardiovascular diseases*, v. 23, p. 160-168, 2013.

TIMS, S.; DEROM, C.; JONKERS, D. M.; VLIETINCK, R.; SARIS, W. H.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M.; ZOETENDAL, E. G. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME Journal*, v. 7, p. 707–717, 2013.

TOJO, R.; SUAREZ, A.; CLEMENTE, M. G.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 41, p. 15163-76, 2014.

TOLHURST, G.; HEFFRON, H.; LAM, Y. S.; PARKER, H. E.; HABIB, A. M.; DIAKOGIANNAKI, E. ET AL. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. **Diabetes**, v. 61, p. 364-371, 2012.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonicfunction: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 31-60, 2001.

TORRES-FUENTES, C.; SCHELLEKENS, H.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. **A review. Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 49-65, 2015.

VAN ARKEL, J.; VERGAUWEN, R.; SE'VENIER, R.; HAKKERT, J. C.; LAERE, A.; BOUWMEESTER, H. J. et al. Sink filling, inulin metabolizing enzymes and carbohydrate status in field grown chicory (*Cichorium intybus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1520–1529, 2012.

VIGITEL BRASIL, VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**, v. 1º EDIÇÃO, p. 1-132, 2017

VILLELA, N. B.; NETO, O. B.; CURVELLO, K. L.; PANEILI, B. E.; SEAL, C.; SANTOS, D.; CRUZ, T. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición hospitalaria**, v. 19, n. 6, p. 367-371, 2004.

VULEVIC, J.; DRAKOULARAKOU, A.; YAQOOB, P.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G.R. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel transgalactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. **Am. J. Clin. Nutr**, v.88, p. 1438- 1446, 2008.

WALKER, A.W.; INCE, J.; DUNCAN, S.H.; WEBSTER, L.M.; HOLTROP, G.; ZE, X. et al. (2011) Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. **ISME J**, v. 5, p. 220–230, 2011.

WENSVEEN, F. M.; VALENTIC, S.; SESTAN, M.; WENSVEEN, T. T.; POLIC, B. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **Eur. J. Immunol**, v.45, p. 2446-2456, 2015.

WHITE, P. A. S.; CERCATO, L. M.; ARAÚJO, J. M. D.; SOUZA, L. A.; SOARES, A. F.; BARBOSA, A.O.; NETO, J. M. R.; MARÇAL, A. C.; MACHADO, U. F.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, M. R. V.; BRITO, L. C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 57, n. 5, p. 339-345, 2013.

WONG, J. M.; JENKINS, D. J. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. **J Nutr**, v. 137, n. 11, p. 46-253, 2007.

YANG, Y.; W. CHEN, M.; K. BING, Y.; Y. HUANG, X.; J. ZHANG, X.; R. HE, L.; Q. JING, Z.; Z.; H. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for RealTime PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p. 6749- 6756, 2015.

ZE, X.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; FLINT, H.J. Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. **ISME J**, v. 6, p. 1535-1543, 2012.

ZHANGA, W.; M. YUB, C. WANGA, X. HAI, L. Increased abundance of nitrogen transforming bacteria by higher C/N ratio reduces the total losses of N and C in chicken manure and corn stover mix composting. **Bioresource Technology**, v. 12, p. 1-39, 2019