

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e suco de laranja Moro na microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade.

Aline Alves de Santana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos – Área de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e suco de laranja Moro na microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade.

Aline Alves de Santana

Versão corrigida

Orientador: Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S231e Santana, Aline Alves de
Efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e suco de laranja Moro na microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade.
/ Aline Alves de Santana. - São Paulo, 2021.
138 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. laranja. 2. compostos bioativos. 3. microbiota intestinal. 4. inflamação. 5. obesidade.
I. T. II. Lajolo, Franco Maria, orientador.

Aline Alves de Santana

Efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e suco de laranja Moro na microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade.

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo (Orientador/ Presidente)

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____, _____, 2021.

DEDICATÓRIA

À Deus pela oportunidade e pela sua
sustentação ao longo deste caminho. Aos meus pais
pelo incentivo e apoio. À memória da minha avó Ilda e
por seu amor incondicional. Ao meu marido pelo seu
amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me apresentou com muitas oportunidades de aprendizado e crescimento ao longo desta jornada e me capacitou para sua realização.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Franco Lajolo por aceitar a realização deste projeto e participar na execução de todas as etapas, o seu apoio e entendimento foi essencial para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

À Profa. Neuza que participou ativamente deste projeto desde o seu início e me ajudou em muitos momentos contribuindo para a sua execução e conclusão.

Ao Prof. Ronaldo Thomatielli (Unifesp) que gentilmente concedeu o seu laboratório durante a coleta e nos forneceu todo o suporte nesta e em outras etapas e à toda equipe de técnicas da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), em especial à Diva por sua ajuda diária.

Ao Food Research Center (FoRC) pelo suporte científico e financeiro.

À Cristiane Kovacs e o Daniel Magnoni do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia por acreditarem neste projeto e permitirem que ele fosse realizado.

À Profa. Carla Taddei e o seu aluno Gustavo pela ajuda na análise da microbiota intestinal.

Aos meus superiores, Andreia Madruga e Marina Magno da Universidade Nove de Julho por acreditarem no meu trabalho e me apoiarem nesta trajetória acadêmica.

Aos meus amigos do “Sushibar”: Jéssica, Alessandra, Sara, Jacqueline, Karina, Layane e Eric que me apoiaram e me ajudaram em muitas etapas.

Agradeço especialmente à minha parceira de projeto Karina do Dante Pazzanese pela amizade e por sua participação essencial em todas as etapas do protocolo e na realização das análises.

Aos meus amigos Edgar Tavares e Aline Caris da Universidade Federal de São Paulo pela amizade demonstrada e pela ajuda fornecida durante as análises laboratoriais.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento que contribuíram de alguma forma e permitiram que essa tese que se concretizasse.

Aos meus pais, Adelina e Wilson por todo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida especialmente naqueles dias de maior dificuldade.

À memória da minha vó Ilda que não pôde estar presente fisicamente na conclusão deste projeto, mas através do seu amor me guiou e me fortaleceu para que eu pudesse concluí-lo.

Ao meu irmão Willian, minha cunhada Aline e os meus queridos sobrinhos, André e João que me trouxeram leveza, alegria e carinho durante este processo.

Aos meus familiares, Byanca, Humberto, Elaine e Elisângela que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a ser cada dia melhor.

Aos meus amigos, Camila, Fernanda, Italo, Paula, Fernando, Francisco, Marcelo, Miriam e Carlos pelas palavras de apoio que me sustentaram neste período.

Aos meus sogros, Margarete e Luis Augusto, a minha cunhada Stella, meu sobrinho Felipe por entenderem a minha ausência e por torcerem sempre para a realização deste sonho.

Às minhas amigas e colegas da Universidade Nove de Julho, especialmente à Jaqueline, Renata, Silvia, Patrícia, Elineides, Jane e Vanessa que me apoiaram na realização deste sonho.

Agradeço o incentivo do Food Research Center (FORC) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2013/07914-8, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projeto universal nº 43471/208-0 que contribuíram para a realização deste estudo.

A todos os meus alunos e ex-alunos que me incentivam a ser cada dia melhor.

Endereço o meu agradecimento a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton).

RESUMO

SANTANA, Aline Alves. **Efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e suco de laranja Moro na microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade.** 138 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A obesidade é uma doença complexa que está associada inflamação crônica de baixo grau que contribui para o desenvolvimento de diversos distúrbios metabólicos como a resistência à insulina e estudos recentes sugerem a influência da microbiota intestinal no desenvolvimento e manutenção da doença. Diversos estudos apontam para o benefício da ingestão de frutas e vegetais na prevenção e tratamento de doenças crônicas. O suco de laranja contém diversos compostos bioativos com ações anti-inflamatórias, antioxidantes com efeitos na composição da microbiota intestinal. Deste modo, o objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e Moro sobre a composição da microbiota intestinal e de parâmetros inflamatórios em voluntários com obesidade e resistência à insulina. Foi realizado um ensaio clínico crossover com suplementação de suco de laranja (400ml/dia) por 15 dias com um período de washout de 40 dias. As análises de sangue, fezes, urina, composição corporal, consumo alimentar foram realizadas antes e após cada intervenção. A comparação entre os tratamentos foi realizada utilizando equações de estimativas generalizadas e adotou-se um nível de significância de 5%. Em relação à microbiota intestinal, em ambos os tratamentos, os dois filos mais abundantes foram *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Dos gêneros analisados, observou-se maior abundância de *Bifidobacterium* após a suplementação com o suco de laranja Moro. O suco de laranja Pera promoveu uma diminuição da zonulina e o suco de laranja Moro contribuiu para redução de citocinas inflamatórias, diminuição da pressão arterial e aumento nos níveis de acetato nas fezes. Após a separação dos voluntários por grau de obesidade, observamos que o suco de laranja Moro contribuiu para o aumento na abundância de *Akkermansia*, *Alistipes*, *Bacteroides* e *Catenibacterium* em indivíduos com obesidade grau 3. Além disso, em ambos os sucos encontramos redução da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* e aumento da excreção de metabólitos de flavonoides após os tratamentos. Diante destes resultados, conclui-se que o suco de laranja Pera apresentou ações positivas sobre a permeabilidade intestinal e o suco de laranja Moro promoveu efeitos mais expressivos na modulação da inflamação associada à obesidade e da microbiota intestinal.

Palavras-chaves: Compostos bioativos, suco de laranja, microbiota intestinal, inflamação, obesidade.

ABSTRACT

SANTANA, Aline Alves. **Effect of Pera and Moro orange juice consumption on the gut microbiota and inflammatory parameters in volunteers with obesity.** 138 p. Thesis (Doctorate Degree) School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Obesity is a complex disease that is associated with low-grade chronic inflammation, and it contributes to the development of several metabolic disorders such as insulin resistance, and recent studies suggest the influence of the intestinal microbiota in the development and maintenance of the disease. Several studies have suggested the benefit of fruits and vegetables consumption in the prevention and treatment of chronic diseases. The orange juice contains some bioactive compounds with anti-inflammatory and antioxidant actions with effects in the composition of the gut microbiota. Thus, the main objective of this study was to evaluate the effects of Pera and Moro orange juice consumption on the composition of the gut microbiota and inflammatory parameters in volunteers with obesity and insulin resistance. A crossover clinical trial was carried out with orange juice supplementation (400ml/day) for 15 days with a washout period of 40 days. Blood, feces, urine, body composition, food consumption were analyzed before and after each intervention. Comparison between treatments was performed using generalized estimating equations and a significance level of 5% was adopted. In relation to gut microbiota, in both treatments, the two most abundant phyla were *Firmicutes* and *Actinobacteria*. In the analysis of bacterial genera, a greater abundance of *Bifidobacterium* was observed after supplementation with Moro orange juice. The Pera orange juice reduced zonulin and Moro orange juice contributed to a reduction on inflammatory cytokines, a decrease in blood pressure and an increase in acetate levels in the stool. After separating the volunteers by degree of obesity, we observed that Moro orange juice contributed to the increase in the abundance of *Akkermansia*, *Alistipes*, *Bacteroides* and *Catenibacterium* in individuals with grade 3 obesity. Furthermore, in both juices we found a reduction in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio and increased excretion of flavonoid metabolites after treatments. Therefore, we concluded that Pera orange juice had positive actions on intestinal permeability and Moro orange juice promoted more expressive effects on the modulation of inflammation associated with obesity and on the intestinal microbiota.

Keywords: Bioactive compounds, orange juice, gut microbiota, inflammation, obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Via de sinalização inflamatória dependente de MyD88 em macrófagos induzida pela ligação do LPS ao TLR4 com consequente ativação de IKKs e do NF- κ B e indução de citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β .	26
Figura 2.	Variação da concentração e composição da microbiota intestinal ao longo do trato gastrointestinal com maior concentração e diversidade microbiana no intestino grosso.	27
Figura 3A.	Classificação taxonômico do Reino Bactéria. Os níveis taxonômicos subsequentes são: Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.	29
Figura 3B.	Classificação taxonômico do Reino Bactéria. Os níveis taxonômicos subsequentes são: Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.	30
Figura 4.	Principais classes de polifenóis.	37
Figura 5.	Após a hidrólise dos flavonoides no intestino delgado, as agliconas passam pelo metabolismo de fase I e II no trato gastrointestinal e no fígado e pelo metabolismo microbiano no intestino grosso. A maior parte dos metabólitos produzidos sofrem excreção renal.	38
Figura 6.	Laranjas (<i>Citrus Sinensis</i> (L.) Osbeck), variedades Pera e Moro.	39
Figura 7.	Fluxograma de recrutamento dos voluntários.	49
Figura 8.	Delineamento do estudo.	50
Figura 9.	Concentração da citocina IL-6 no plasma antes e após a ingestão dos sucos de laranja Pera e Moro.	64
Figura 10.	Concentração da citocina TNF- α no plasma antes e após a ingestão dos sucos de laranja Pera e Moro.	64
Figura 11.	Citocinas e quimiocinas no sobrenadante de monócitos cultivados com LPS antes e após os sucos de laranja Pera e Moro.	65
Figura 12.	Excreção de metabólitos de flavonoides no suco de laranja Pera.	67
Figura 13.	Excreção de metabólitos de flavonoides no suco de laranja Moro.	67

Figura 14.	Concentração de zonulina no plasma antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	68
Figura 15.	Concentração de LPS no plasma antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	69
Figura 16.	Alfa-diversidade nas amostras fecais antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro de acordo com os índices de diversidade.	70
Figura 17.	Beta-diversidade entre os sucos de laranja Pera e Moro e os diferentes períodos do estudo.	70
Figura 18.	Histograma da composição da microbiota intestinal no nível taxonômico filo.	72
Figura 19.	Histograma da composição da microbiota intestinal no nível taxonômico gênero.	73
Figura 20.	Abundância relativa do gênero <i>Bifidobacterium</i> antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	76
Figura 21.	Projeção dos participantes na análise PLS-DA de dois componentes no grupo SLP.	77
Figura 22.	Projeção dos participantes na análise PLS-DA de dois componentes no grupo SLM.	78
Figura 23.	Gráfico de variáveis do grupo SLP para a construção do modelo PLS-DA.	78
Figura 24.	Gráfico de variáveis do grupo SLM para a construção do modelo PLS-DA.	79
Figura 25.	Abundância relativa do gênero <i>Akkermansia</i> antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade.	80
Figura 26.	Abundância relativa do gênero <i>Alistipes</i> antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade.	80
Figura 27.	Abundância relativa do gênero <i>Bacteroides</i> antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade.	81
Figura 28.	Abundância relativa do gênero <i>Catenibacterium</i> antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade.	81
Figura 29.	Abundância relativa do filo <i>Bacteroidetes</i> antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade.	82

Figura 30. Influência do grau de obesidade e do tratamento com os sucos de laranja Pera e Moro na razão <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> .	82
Figura 31. Determinação do pH fecal antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	83
Figura 32. Principais resultados do estudo após o consumo com o suco de laranja Pera e Moro.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição nutricional e composição físico-química em 100 mL do suco de laranja Pera e Moro.	57
Tabela 2.	Conteúdo de flavanonas e antocianinas nos pellets e sobrenadantes em 100mL dos sucos de laranja Pera e Moro, obtido por CLAE-DAD.	58
Tabela 3.	Características basais dos voluntários.	58
Tabela 4.	Ingestão de calorias e nutrientes antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	61
Tabela 5.	Parâmetros antropométricos e bioquímicos antes e após intervenção com os sucos de laranja Pera e Moro.	62
Tabela 6.	Pressão arterial antes e após intervenção com suco de laranja Pera e Moro.	62
Tabela 7.	Citocinas e quimiocinas no plasma antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	63
Tabela 8.	Excreção de metabólitos na urina antes e após os sucos de laranja Pera e Moro.	66
Tabela 9.	Abundância relativa (%) no nível taxonômico filo antes e após os sucos de laranja Pera e Moro	71
Tabela 10.	Abundância relativa (%) dos gêneros mais abundantes antes e após os sucos de laranja Pera e Moro.	74
Tabela 11.	Concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µIU	Microunidade internacional
µm	Micrômetro
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
Ca	Cálcio
CA	Circunferência abdominal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHO	Carboidratos
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CT	Colesterol total
DAMPs	Padrões moleculares associado à danos
dL	Decilitro
DM2	Diabetes Mellitus do tipo 2
DRIs	Ingestão dietética recomendada
EU	Unidades de endotoxinas
F/B	Firmicutes/Bacteroidetes
Fe	Ferro
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
g	Gramas

GJ	Glicemia de jejum
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i>
HOMA1-%B	<i>Homeostatic Model Assessment b-Cell Function</i>
HOMA1-IR	<i>Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance</i>
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelular- 1
IJ	Insulina de jejum
IL	Interleucinas
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Interferon- γ	Interferon-gama
I κ B	Inibidores de Kappa Beta
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LIP	Lipídios
LPS	Lipopolissacarídeos
m ²	Metros quadrados
MCP1	Proteína quimioatraente de monócitos
Mg	Magnésio
mg	Miligramas
min	Minutos

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
NFκB	Fator Nuclear Kappa Beta
nm	Nanômetro
NRF2	Fator Nuclear Eritroide 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTUs	Unidades operacionais taxonômicas
PAD	Pressão arterial diastólica
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PAS	Pressão arterial sistólica
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PTN	Proteínas
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
s	Segundos
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SLM	Suco de laranja Moro
SLP	Suco de laranja Pera
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG	Triglicérides
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	Receptores do tipo toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSS	Sólidos Solúveis Totais
V	Volt
VLDL-c	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Obesidade e disfunção do tecido adiposo	23
2.2 Microbiota intestinal.....	27
2.3 Microbiota intestinal e obesidade	34
2.4 Microbiota intestinal e polifenóis	36
2.5 Polifenóis da laranja e efeitos à saúde.....	39
3 JUSTIFICATIVA.....	42
4 OBJETIVOS	44
4.1 Objetivo geral	44
4.2 Objetivos específicos	44
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5.1 Caracterização físico-química dos sucos de laranja	45
5.1.1 Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix (°Brix)	45
5.1.2 Determinação do pH	45
5.1.3 Açúcares totais.....	45
5.1.4 Determinação de fenólicos totais	45
5.1.5 Identificação dos ácidos orgânicos.....	46
5.1.6 Determinação das fibras alimentares nos sucos	46
5.1.7 Identificação e caracterização de flavonoides	46
5.2 Aprovação do comitê de ética	47
5.3 Seleção dos voluntários.....	48
5.4 Delineamento da pesquisa	49

5.5 Descrição das variáveis.....	51
5.5.1 Variáveis relacionadas ao consumo alimentar	51
5.5.2 Variáveis relacionadas aos indicadores antropométricos	51
5.5.3 Coleta de sangue.....	52
5.5.4 Coleta de urina casual.....	52
5.5.5 Coleta de fezes	52
5.5.6 Análise da microbiota intestinal (Sequenciamento de Nova Geração)	52
5.5.7 Análise de bioinformática.....	53
5.5.8 Análise do pH fecal	53
5.5.9 Análise dos ácidos graxos de cadeia curta.....	52
5.5.10 Isolamento de monócitos e tratamento com LPS	54
5.5.11 Determinação dos parâmetros plasmáticos	55
5.5.11.1 Glicose, insulina e perfil lipídico	55
5.5.11.2 Citocinas e quimiocinas	55
5.5.11.3 Lipopolissacarídeos.....	55
5.6 Análise estatística	55
6 RESULTADOS.....	56
6.1 Composição do suco de laranja.....	56
6.2 Características dos voluntários.....	58
6.3 Análise das citocinas e quimiocinas no plasma	63
6.4 Produção de citocinas no sobrenadante de monócitos.....	65
6.5 Metabólitos de flavonoides na urina.....	66
6.6 Avaliação de marcadores de permeabilidade intestinal	68
6.7 Análise das diversidades (alfa e beta diversidade).....	69

6.7.1 Alfa-diversidade segundo os Índices de Shannon, Chao1 e Simpson.....	69
6.7.2 Beta-diversidade.....	70
6.8 Efeito das intervenções sobre a microbiota intestinal.....	71
6.8.1 Composição da microbiota intestinal nos níveis taxonômicos filo e gênero	71
6.9 Correlações com a microbiota intestinal.....	77
6.10 Análise multivariada	
_Toc806155356.11 Efeito das intervenções na microbiota intestinal nos diferentes graus de obesidade.....	79
6.11.1 Abundância relativa no nível taxonômico filo e gênero.....	79
6.12 Ácidos graxos de cadeia curta e pH fecal.....	83
7 DISCUSSÃO.....	84
7.1 Suco de laranja e composição corporal.....	84
7.2 Efeitos do suco de laranja em parâmetros bioquímicos e na pressão arterial.....	84
7.3 Ingestão dos sucos de laranja e consumo alimentar.....	85
7.4 Efeitos do suco de laranja em mediadores inflamatórios.....	86
7.5 Suco de laranja e permeabilidade intestinal.....	89
7.6 Efeitos dos sucos de laranja na microbiota intestinal.....	91
7.7 Influência do grau de obesidade e dos sucos de laranja na microbiota intestinal.....	94
7.8 Compostos bioativos das laranjas e metabólitos na urina.....	96
8 CONCLUSÃO	100
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	121
ANEXO 1. PARECER DO CEP	121
ANEXO 2 - TCLE	123

ANEXO 3 - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	125
ANEXO 4 – RECORDATÓRIO DE 24 HORAS.....	128
ANEXO 5 – FICHA DO ALUNO (JANUS)	129
ANEXO 6 – CURRÍCULO LATTES.....	131

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem 1,9 bilhão (39%) de adultos com sobrepeso no mundo. Destes, 650 milhões (13%) apresentam obesidade, sendo considerada a pandemia do século 21 (WHO, 2020). Em 2025, a estimativa é de que a prevalência global de obesidade atingirá 18% nos homens e ultrapassará 21% nas mulheres. Já a obesidade grave ultrapassará 6% nos homens e 9% em mulheres (DI CESARE *et al.*, 2016). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde de 2019, existem 41,2 milhões de indivíduos acima de 18 anos (25,9%) com obesidade e 60,3% apresentam excesso de peso. Este percentual de indivíduos com obesidade mais do que dobrou em 17 anos no país representando um importante problema de saúde pública (IBGE, 2019).

A obesidade é uma doença crônica de difícil controle que apresenta etiologia multifatorial e é resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais que contribuem para um aumento no risco de desordens metabólicas (diabetes mellitus do tipo 2 e esteatose hepática), doenças cardiovasculares (hipertensão e infarto agudo do miocárdio), doenças musculoesqueléticas (osteoartrite), doença de Alzheimer, depressão e alguns tipos de câncer (mama, ovário, próstata, fígado, rins e cólon). Além disso, a obesidade prejudica a qualidade de vida, pode levar ao desemprego, menor produtividade e desvantagens sociais (BLÜHER, 2019).

Muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da obesidade incluindo um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal que contribui para maior suscetibilidade a doença, ao estabelecimento da inflamação sistêmica e ao desenvolvimento de disfunções metabólicas (ESCOBEDO; LÓPEZ-ORTIZ; TORRES-CASTRO, 2014). Por esta razão, nos últimos anos tem havido grande interesse da comunidade científica em buscar novas estratégias nutricionais preventivas e terapêuticas com a finalidade de melhorar a composição da microbiota intestinal de indivíduos com obesidade e evitar o surgimento de comorbidades.

O suco de laranja contém compostos bioativos que apresentam propriedades benéficas à saúde tais como a manutenção da integridade intestinal, modulação da microbiota intestinal, modulação do metabolismo lipídico, regulação da pressão arterial, redução da inflamação e estresse oxidativo através de mecanismos genéticos e epigenéticos (NISHIOKA *et al.*, 2021; WAN *et al.*, 2018; ANACLETO *et al.*, 2020; BRASILI *et al.*, 2019; CHAVES *et al.*, 2017). Neste contexto, poucos estudos clínicos avaliaram o impacto do suco de laranja na microbiota intestinal e nos parâmetros

inflamatórios em indivíduos com obesidade e resistência à insulina, o que consideramos oportuno para elucidar os efeitos dos compostos bioativos do suco de laranja nesta população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade e disfunção do tecido adiposo

A obesidade é definida como uma condição de excesso de gordura corporal que é refletida por um índice de massa corporal (IMC) superior à 30 kg/m² como o resultado de um balanço energético positivo, ou seja, devido ao aumento na ingestão de energia e/ou por uma diminuição do gasto energético. Este balanço energético positivo está normalmente relacionado a um estilo de vida não saudável com hábitos alimentares inadequados, especialmente com o consumo calórico acima do recomendado, alterações na composição da dieta e um comportamento sedentário tanto na atividade ocupacional quanto na prática de atividade física (MURALIDHARA, 2016).

O tecido adiposo é um órgão complexo e o principal local de armazenamento de gordura no organismo e apresenta um importante papel no controle da homeostase energética e no influxo de ácidos graxos para a circulação sistêmica (GOOSSENS, 2017). Existem três principais depósitos de tecido adiposo no organismo: o tecido adiposo branco (TAB) que representa mais do que 95% da massa adiposa e o tecido adiposo marrom (TAM) que representa 1 a 2% de gordura e está presente nas regiões cervicais, axilares e paraespinais. A principal célula dos depósitos do tecido adiposo é o adipócito e de acordo com o tipo de tecido adiposo, sendo descritos dois tipos de adipócitos: os adipócitos brancos caracterizados por uma gotícula lipídica unilocular e os adipócitos marrons que apresentam gotículas lipídicas multiloculares e com uma grande densidade mitocondrial para a dissipação de energia através da respiração celular. Um terceiro tipo de adipócito foi identificado e denominado como adipócito bege, este tipo de adipócito pode ser encontrado nos diferentes depósitos de tecido adiposo branco, e se origina a partir da transdiferenciação de células progenitoras com características de adipócito marrom, pela grande densidade de mitocôndrias (CYPESS e KAHN, 2010; NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2011).

O TAB pode ser dividido em depósito visceral e subcutâneo. O depósito visceral está localizado na região intra-abdominal e é uma característica da obesidade central. Este depósito está relacionado a um maior risco de doenças metabólicas. Por outro lado, o tecido adiposo subcutâneo é

encontrado na região dos quadris e não tem sido associado a efeitos deletérios ao organismo (KAHN; WANG, 2019).

O TAB é dinâmico com uma grande atividade metabólica devido a presença de diferentes células do sistema imunológico (linfócitos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos) que são capazes de secretar uma elevada quantidade de proteínas (adipocinas) envolvidas na regulação do apetite, função inflamatória e imunológica, metabolismo da glicose e dos lipídios, homeostase cardiovascular e reprodução, além de interferir em outras funções fisiológicas (EXLEY *et al.*, 2014).

Na obesidade, o TAB está severamente alterado para se adaptar a ingestão calórica excessiva e apresenta um remodelamento de processos estruturais e celulares como: a) expansão do tecido adiposo através da hiperplasia (aumento no número de células) e hipertrofia (aumento no tamanho das células); b) infiltração de células do sistema imunológico no tecido adiposo; c) remodelamento da matriz extracelular para a expansão adequada do tecido adiposo (UNAMUNO *et al.*, 2018). Diversos efeitos prejudiciais estão associados a esta expansão do TAB como inflamação, fibrose, hipóxia, disfunção mitocondrial e alterações na secreção de adipocinas (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

Muitos trabalhos apontam o papel da resposta imunológica inata no surgimento e na manutenção da inflamação crônica subclínica associada à obesidade. O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa em resposta a lesões ou patógenos. Este sistema compreende células de linhagens mieloides como os monócitos e os macrófagos que estão presentes na fração do estroma vascular do tecido adiposo em maior proporção e apresentam efeitos importantes na sinalização inflamatória (LUMENG, 2013).

Os macrófagos são as principais células relacionadas à inflamação na obesidade devido a sua infiltração no TAB. De acordo com o seu perfil de secreção de citocinas, os macrófagos são divididos em dois tipos: M1 ou macrófagos “classicamente ativados” e M2 ou macrófagos “alternativamente ativados”. Os macrófagos M1 são a primeira linha de defesa contra patógenos e são estimulados por mediadores inflamatórios como interferon- γ e lipopolissacarídeos (LPS). Por outro lado, os macrófagos M2 estão envolvidos no reparo celular, na resolução da inflamação e na síntese de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas (IL) 4 e 13 (UNAMUNO *et al.*, 2018).

Os macrófagos M1 secretam citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 β , proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que apresentam efeitos locais nos adipócitos e nas células imunológicas

residentes (neutrófilos, células B, células T) e induzem a ativação da cascata de sinalização inflamatória principalmente através da ativação da via do Fator Nuclear Kappa Beta (NFκB) (ZATTERALE *et al.*, 2020).

Em condições fisiológicas, o NFκB está retido no citoplasma devido a uma família de inibidores chamados de Inibidores de Kappa B (IκBs). A ativação do complexo kinase IKK (que contém as subunidades IKKα e IKKβ) induz a degradação do IκBα levando a translocação do NFκB para o núcleo da célula perpetuando a inflamação e a disfunção do TAB (EXLEY *et al.*, 2014).

Os mecanismos de ação que levam a este processo não são completamente elucidados, mas acredita-se que seja devido à lipotoxicidade, ao estresse do retículo endoplasmático devido ao excesso de lipídeos, à hipóxia resultante da redução da difusão de oxigênio nos adipócitos hipertrofiados e através da ativação de receptores do tipo toll (TLRs) (REILLY; SALTIEL, 2017).

A ativação dos TLRs parece ser um dos principais mecanismos que contribuem para o estado inflamatório crônico na obesidade e na síndrome metabólica (JIALAL; KAUR; DEVARAJ, 2014). Os TLRs são receptores de reconhecimento padrão expressos em diferentes tecidos e divididos em cinco diferentes famílias com um papel importante no reconhecimento de patógenos e no início da resposta inflamatória após o reconhecimento de ligantes como: 1) os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) incluindo o LPS; 2) sinais relacionados a dano tecidual como os padrões moleculares associado à danos (DAMPs) e 3) outros ligantes incluindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), proteínas de choque térmico, produtos da degradação da matriz extracelular. O reconhecimento destes ligantes ocorre principalmente através do TLR2 e do TLR4 que induzem a resposta inflamatória por meio da produção de várias citocinas inflamatórias (JIALAL; KAUR; DEVARAJ, 2014).

O LPS derivado da microbiota intestinal também contribui para iniciar a cascata inflamatória. O LPS é um componente de membrana das bactérias gram-negativas que pode atingir a circulação sistêmica através da indução da inflamação intestinal local e da alteração na microbiota associada a perda da função de barreira no intestino. Após este processo, o LPS ativa o TLR4 em macrófagos e adipócitos e favorece o ambiente inflamatório através da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (VILLARROYA *et al.*, 2018). Além da produção de citocinas pelos macrófagos após a interação com o LPS, estas células promovem a ativação de diferentes mediadores biológicos como o fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas, enzimas, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio como o ânion superóxido e o óxido nítrico (ROGERO e CALDER, 2018). Esta inflamação local e

sistêmica em resposta ao LPS tem o potencial de desencadear alterações na microbiota intestinal que resulta em ativação do sistema imunológico e contribui para o estabelecimento da inflamação subclínica crônica e favorece o desenvolvimento de doenças associadas à obesidade como o diabetes mellitus e as doenças cardiovasculares (COX; WEST; CRIPPS, 2015).

O padrão alimentar ocidental caracterizado pelo alto consumo de gorduras especialmente de origem animal e baixo consumo de fibras está frequentemente relacionada aos indivíduos com diversas doenças metabólicas como a obesidade e é um dos principais mecanismos associados ao desequilíbrio da microbiota intestinal, alterações da permeabilidade intestinal e inflamação sistêmica. Deste modo, os hábitos alimentares inadequados e o estilo de vida têm sido considerado responsáveis por modificações da resposta inflamatória e alterações da microbiota intestinal.

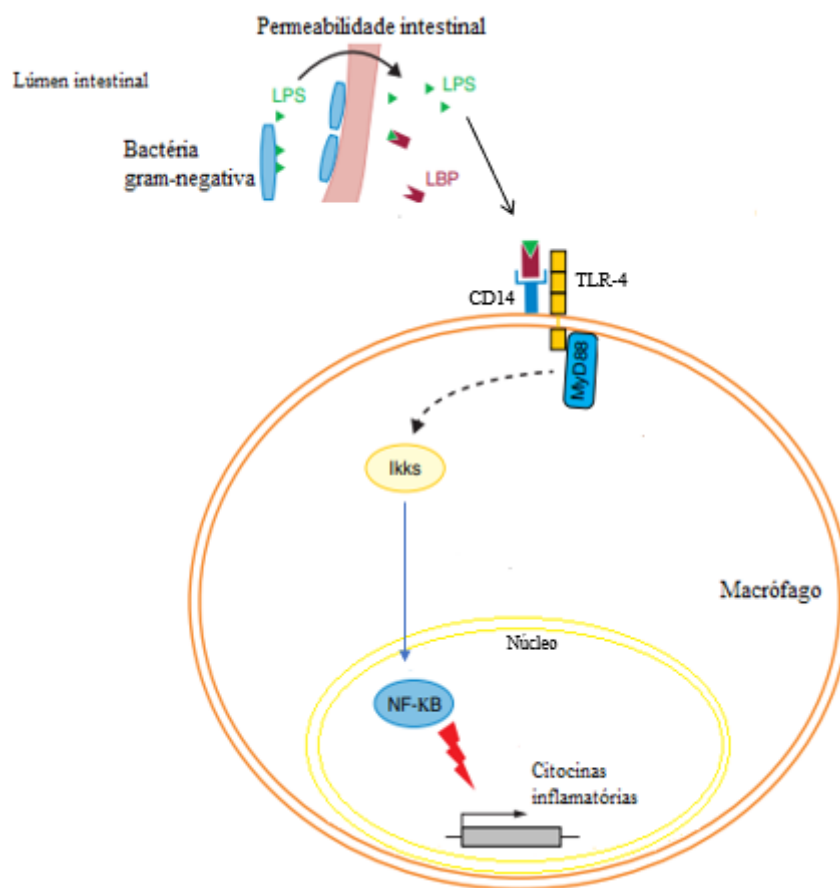


Figura 1. Via de sinalização inflamatória dependente do gene de resposta primária de diferenciação mieloide (MyD88) em macrófagos induzida pela ligação do LPS a proteína ligadora de LPS (LBP) que ativa a proteína CD14. Este complexo se liga ao TLR4 na membrana plasmática com consequente ativação de IKKs e do NF-κB e indução de citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Adaptado de BOULANGÉ *et al.*, 2016

2.2 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal humana consiste de mais de 100 trilhões de microrganismos que existem em uma relação de simbiose com o hospedeiro humano (GOMES; HOFFMANN; MOTA, 2018). Atualmente, a microbiota intestinal tem sido alvo de muitas pesquisas devido a sua interação com muitos órgãos e o seu possível envolvimento em diferentes condições clínicas como as doenças inflamatórias intestinais, a síndrome do intestino irritável, doenças metabólicas (obesidade e diabetes) e doenças alérgicas (JANDHYALA *et al.*, 2015).

O trato gastrointestinal (TGI) é um sistema complexo com grande abundância de microrganismos, composto por microáreas com uma área de superfície total para colonização de 150-200m² (Figura 2), com uma densidade bacteriana menor nas porções iniciais do TGI como o estômago (10^3 a 10^4 bactérias/mL) e intestino delgado e maior abundância e diversidade no cólon (10^{11} a 10^{12} bactérias/mL) (Figura 2). Isto ocorre porque no estômago e no intestino delgado há um pH mais baixo, uma motilidade intensa e a presença de enzimas digestivas. Já no intestino grosso há um menor potencial redox e o tempo de trânsito intestinal é mais lento, o que favorece a colonização microbiana (LESER; MØLBAK, 2009).

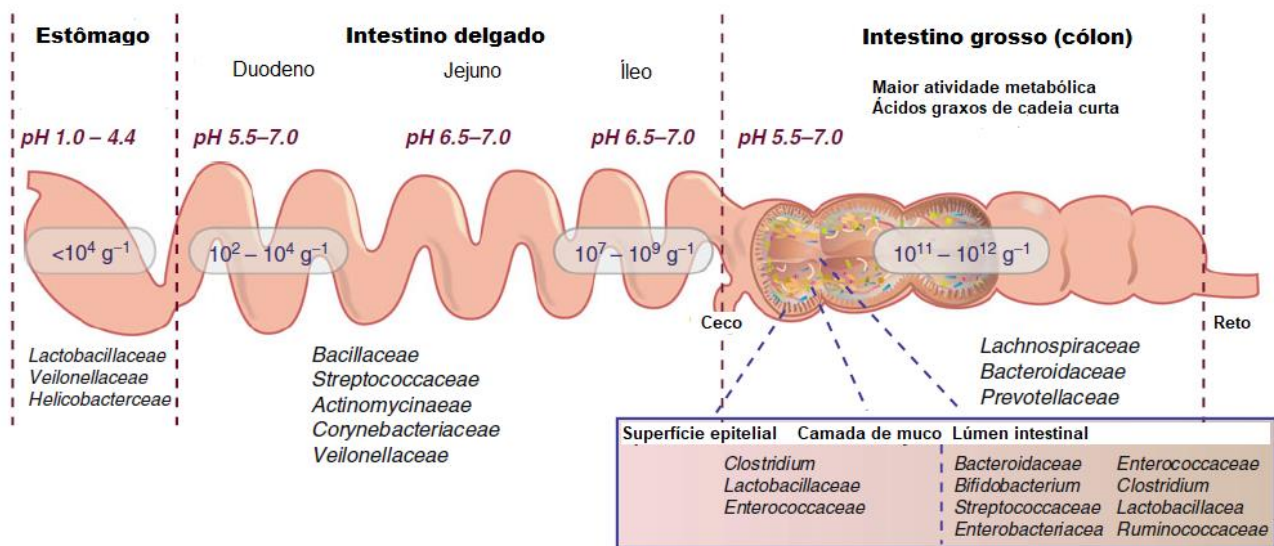


Figura 2. Variação da concentração e composição da microbiota intestinal ao longo do trato gastrointestinal com maior concentração e diversidade microbiana no intestino grosso. Adaptado de ROSENBERG *et al.*, 2013.

A microbiota intestinal saudável é constituída por bactérias, arqueias, vírus, fungos e protozoários. Embora não exista um padrão de microbiota intestinal devido à grande variabilidade

entre os indivíduos, a riqueza microbiana compreendida como diversidade microbiana é um indicador de status saudável (ARGENIO; SALVATORE, 2015).

Dentre os diferentes tipos de microrganismos residentes no intestino, as bactérias são consideradas as mais abundantes e variam na sua composição e funcionalidade ao longo do TGI, influenciada por uma série de fatores como genética, tipo de parto, idade gestacional, dieta, medicamentos e exercício físico. E ainda, com uma distribuição anatômica dependente da concentração de oxigênio luminal e do pH (HILLMAN *et al.*, 2017). Do ponto de vista taxonômico, as bactérias podem ser classificadas de acordo com o filo, classe, ordem, família, gênero e espécie (Figuras 3A e 3B).

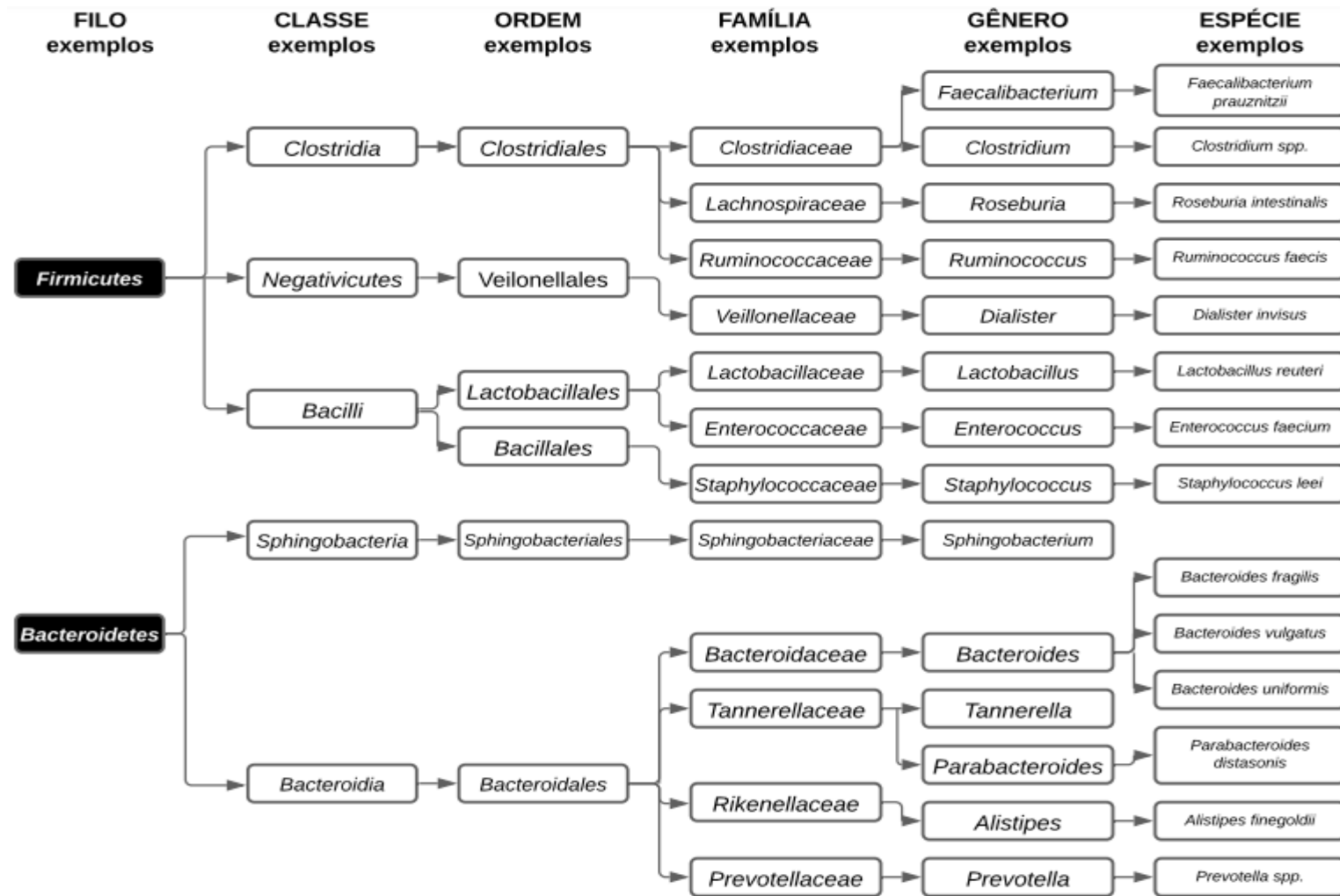


Figura 3A. Exemplo de classificação taxonômica do Reino Bactéria. Os níveis taxonômicos subsequentes são: Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. Adaptado de RINNINELLA *et al.*, 2019.

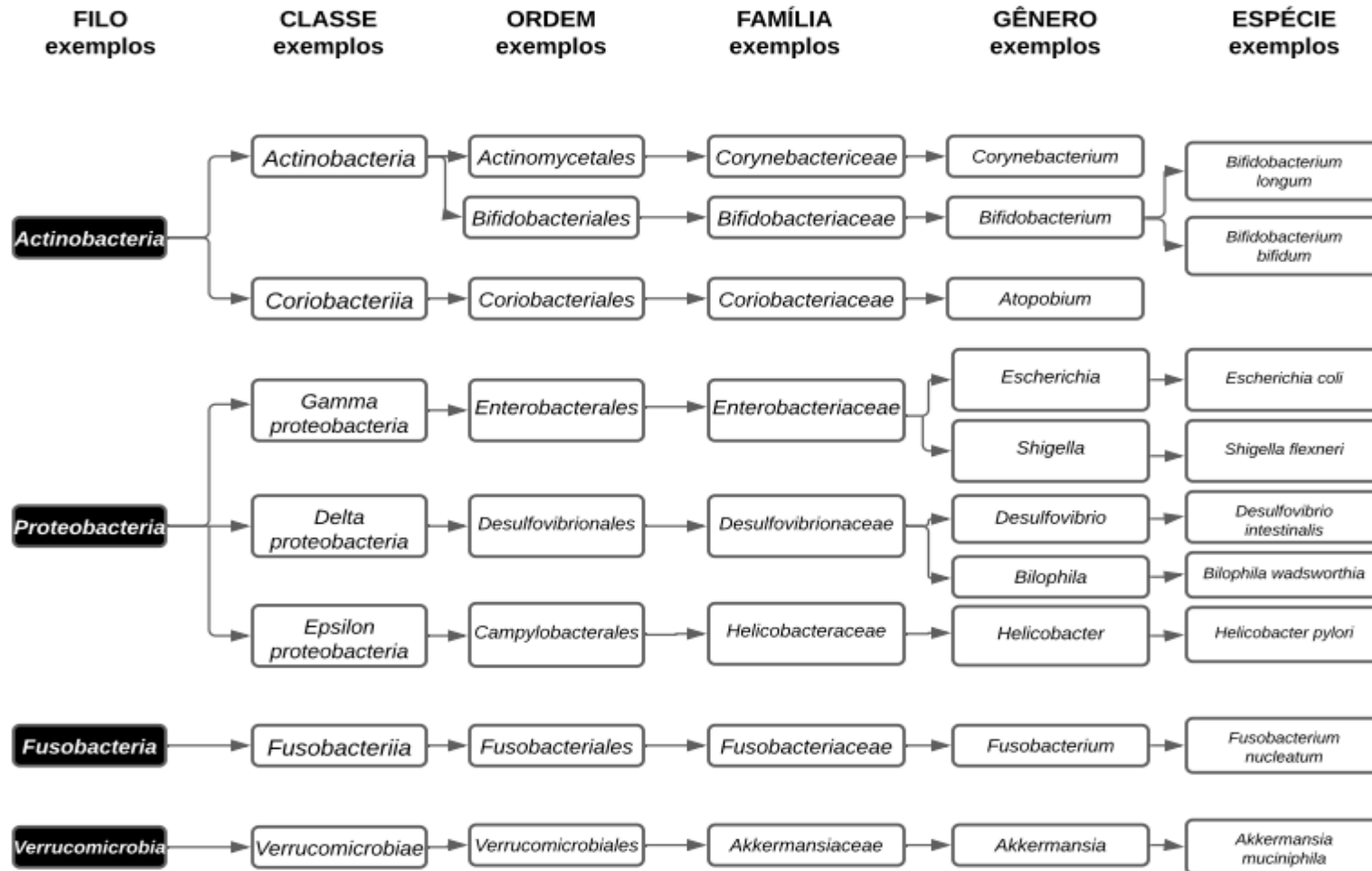


Figura 3B. Exemplo de classificação taxonômica do Reino Bactéria. Os níveis taxonômicos subsequentes são: Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. Adaptado de RINNINELLA *et al.*, 2019.

Os filos dominantes da microbiota intestinal são: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, sendo os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* os mais abundantes, representando 60-80% de uma microbiota intestinal saudável (KANG; CAI, 2017).

Muitas moléculas e produtos metabólicos derivados da microbiota intestinal são capazes de influenciar diferentes funções intestinais como: motilidade, digestão, permeabilidade, captação de energia, imunidade da mucosa e efeito de barreira (IEBBA *et al.*, 2016). Além disso, a microbiota intestinal contribui com outras funções como a produção de vitaminas (K, B2, B7, B9 e B12), absorção de íons (Ca, Mg e Fe), proteção contra patógenos, formação e manutenção do sistema imunológico e produção de energia através da fermentação de polissacarídeos, oligossacarídeos e outros carboidratos não-digeríveis constituintes da fibra alimentar (FA) (JANSSEN; KERSTEN, 2015). Os gêneros envolvidos neste processo de fermentação incluem os *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* e *Roseburia* (DAVILA *et al.*, 2013). Ainda, os metabólitos derivados da microbiota podem acessar a circulação e serem transportados para muitos órgãos afetando a sua funcionalidade, por exemplo, no cérebro alterando a função cognitiva, no fígado afetando o metabolismo lipídico e de fármacos, no pâncreas interferindo no metabolismo da glicose. Deste modo, manter uma microbiota intestinal saudável é essencial para promover a saúde do hospedeiro (IEBBA *et al.*, 2016).

O filo *Firmicutes* apresenta 12 ordens, 42 famílias e 479 gêneros e é composto por bactérias gram-positivas. É considerado o filo de maior diversidade quando comparado ao filo *Actinobacteria* (1 classe, 10 ordens, 56 famílias e 330 gêneros) e ao filo *Bacteroidetes* (4 classes, 4 ordens, 21 famílias e 324 gêneros) (SEONG *et al.*, 2018). Os principais gêneros presentes no filo *Firmicutes* são os *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus* (RINNINELLA *et al.*, 2019). Destes, o gênero *Lactobacillus* está entre os microrganismos mais abundantes no TGI, presente na cavidade oral, pele, vagina e nas fezes. Estima-se que este gênero constitui 6% do número de bactérias totais no duodeno humano e de aproximadamente 0,3% de todas as bactérias no cólon (HEENEY; MARCO; BIOLOGY, 2019). Em indivíduos saudáveis já foram detectadas mais de 50 espécies de *Lactobacillus*, sendo os *Lactobacillus* mais abundantes: *L. casei*, *L. delbruckeii*, *L. murinus*, *L. plantarum* e *L. ruminus* (ROSSI *et al.*, 2016).

O filo *Bacteroidetes* inclui principalmente bactérias gram-negativas do gênero *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* e *Alistipes* e representa 20-30% da microbiota intestinal. Este filo está presente principalmente no intestino grosso participando do fornecimento de energia ao hospedeiro a partir da fermentação de polissacarídeos não-digeríveis. Em populações com padrão alimentar

ocidental, ou seja, com consumo elevado de alimentos de origem animal (ricos em gordura e proteína) e baixo consumo de vegetais (ricos em FA) há uma predominância do gênero *Bacteroides*, aproximadamente 40-60% (JOHNSON *et al.*, 2017). Já o gênero *Prevotella* é mais comum em populações não-ocidentais que consomem uma dieta rica em vegetais (FILIPPO *et al.*, 2010).

O filo *Actinobacteria* contém bactérias gram-positivas com três principais famílias anaeróbias (*Bifidobacteria*, *Propionibacteria* e *Corynebacteria*) e uma família aeróbia (*Streptomices*), sendo o gênero *Bifidobacteria* predominante no intestino humano (BINDA *et al.*, 2018). Este gênero vem sendo discutido frequentemente na literatura devido aos seus possíveis efeitos na saúde humana tais como: manutenção da barreira intestinal através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); degradação de amido resistente e de outros carboidratos não-digeríveis derivados de plantas como os frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, xilooligossacarídeos, inulina ou arabinosilanos (EL-SHARKAWY *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019; VLASOVA *et al.*, 2017). Além disso, as Bifidobactérias apresentam um papel na modulação do sistema imunológico e na biossíntese de vitaminas (LIM; SHIN, 2020). Os efeitos metabólicos do filo Actinobactéria também tem sido descritos em alguns trabalhos que demonstraram uma correlação negativa entre este filo e o percentual de gordura corporal, os níveis de insulina e o índice HOMA - *Homeostatic Model Assessment*. Estudos prévios com indivíduos saudáveis encontraram aumento da abundância deste gênero após a ingestão de mirtilo (ricos em antocianinas) (VENDRAME *et al.*, 2011).

O filo *Proteobacteria* é composto por bactérias anaeróbias facultativas tais como *Escherichia* e *Enterobacteriaceae*. Em uma microbiota intestinal saudável, a abundância deste filo é baixa (<1%) (RINNINELLA *et al.*, 2019), no entanto, em situações de desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, ocorre um aumento de *Proteobacteria* provocando uma menor resistência à colonização por patógenos (SHIN; WHON; BAE, 2015). Por esta razão, alguns pesquisadores salientam que o aumento expressivo na abundância de *Proteobacteria* pode ser um indicador de disbiose (SHIN; WHON; BAE, 2015). Paralelamente, o aumento deste filo tem sido encontrado em quadros patológicos como nas doenças metabólicas (FEI; ZHAO, 2012) e na inflamação intestinal (MORGAN *et al.*, 2012). A disbiose é um termo bastante usado na literatura para descrever alterações na composição de bactérias intestinais comensais, mas esta definição permanece em discussão tendo em vista que inúmeros fatores como idade, localização geográfica, sexo e outras características pessoais estão relacionadas a variações na microbiota intestinal (PEREZ; DORSEN; SQUIRES, 2020).

O filo *Fusobactéria* contém bactérias anaeróbias, gram-negativas, sendo considerada rara na microbiota fecal, mas encontrada na biópsia da mucosa intestinal inflamada. O gênero *Fusobacterium*

é o principal representante deste filo e contém 14 espécies (STRAUSS *et al.*, 2008). Destas, a *Fusobacterium nucleatum* tem sido mais investigada devido a sua possível relação com o câncer colorretal (FUKUGAITI *et al.*, 2015; ZHANG; CAI; MA, 2018) e no seu envolvimento na fisiopatologia da colite ulcerativa (CHEN *et al.*, 2020). Embora a relação entre o filo *Fusobacteria* e a obesidade não tenha sido frequentemente investigada, maior abundância deste filo em indivíduos com obesidade já foi descrito na literatura (ANDOH *et al.*, 2016).

No filo *Verrucomicrobia*, somente duas espécies foram detectadas no TGI humano, a *Akkermansia muciniphila* e a *Prostheco bacter fluviatili* (RAJILI; VOS, 2014). A *A. muciniphila* é uma bactéria localizada na camada de muco intestinal e apresenta um importante papel na sua degradação e fornecimento de nutrientes para as bactérias residentes. Esta degradação de muco pela *Akkermansia* é possível devido a presença de mais de 60 enzimas incluindo glicosidades, sulfatases e sialidases (JI-CHAO; XIAO-WEI, 2019). Devido a este papel mucolítico, a *A. muciniphila* está envolvida na manutenção da barreira intestinal, que está intimamente relacionada ao transporte de nutrientes, desenvolvimento do sistema imunológico e a resistência à invasão por patógenos (GEERLINGS *et al.*, 2018). No colón de indivíduos saudáveis, esta bactéria está presente com uma abundância de aproximadamente 3% (PNG *et al.*, 2010). Por outro lado, na presença de doenças inflamatórias intestinais ou metabólicas (LOPEZ-SILES *et al.*, 2018) e/ou uma alimentação rica em gordura há uma redução significativa desta espécie de bactéria (HE *et al.*, 2018; IJAZ *et al.*, 2020). Algumas intervenções nutricionais com a administração de polifenóis (ANHÊ *et al.*, 2015; ROOPCHAND *et al.*, 2015; ZHU. *et al.*, 2018), frutooligossacarídeos (LIU *et al.*, 2016) e ômega 3 (MONK *et al.*, 2019) apontam para um efeito positivo destes compostos sobre a microbiota intestinal, especialmente relacionado ao aumento da abundância de *A. muciniphila*.

Deste modo, uma microbiota intestinal saudável com equilíbrio entre estes principais filos é necessária para a manutenção de diversas funções fisiológicas do intestino e de outros órgãos com intensa comunicação com a microbiota. As modificações qualitativas e quantitativas em diferentes níveis taxonômicos podem desencadear doenças intestinais específicas como Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e podem contribuir para o desenvolvimento de doenças extra-intestinais como a obesidade (ARGENIO; SALVATORE, 2015).

2.3 Microbiota intestinal e obesidade

A microbiota intestinal apresenta uma grande interação com o ambiente, o sistema imunológico e está envolvida na regulação de funções metabólicas, no desenvolvimento da inflamação subclínica e na regulação do balanço energético (CORNEJO-PAREJA *et al.*, 2019).

Alterações na sua composição podem desencadear um desequilíbrio ecológico no intestino e favorecer o desenvolvimento de uma série de doenças (CUEVAS-SIERRA *et al.*, 2019). Nos últimos anos, diversos trabalhos científicos sugeriram que a microbiota intestinal, mas especificamente variações na sua composição e diversidade (CUEVAS-SIERRA *et al.*, 2019) tem um papel fundamental na manifestação de doenças metabólicas como o diabetes mellitus e a obesidade (CORNEJO-PAREJA *et al.*, 2019). Existem diferentes mecanismos que relacionam a microbiota intestinal e a predisposição à obesidade como: 1) maior extração energética dos alimentos (TURNBAUGH *et al.*, 2006); 2) alteração da integridade da barreira intestinal (DAO; CLÉMENT, 2018); 3) inflamação sistêmica causada pela translocação de LPS (SAAD; SANTOS; PRADA, 2016); 4) produção de metabólitos (DEN BESTEN *et al.*, 2013) e 5) mecanismos hormonais (ativação dos receptores de proteína G e controle do apetite) (KHAN *et al.*, 2016). Além do envolvimento dos fatores genéticos, epigenéticos (CUEVAS-SIERRA *et al.*, 2019) e outros processos incluindo a termogênese (ZIEŹTAK; CHABOWSKA-KITA; KOZAK, 2017) e sensores de sabor, no entanto, alguns destes mecanismos continuam sendo investigados (VAN DE WOUW *et al.*, 2017).

A obesidade está relacionada a alterações na composição da microbiota intestinal apresentando uma maior abundância do *Filo Firmicutes* em detrimento dos filos *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (FONTANÉ *et al.*, 2018). Alguns trabalhos apontaram para uma maior abundância de *Firmicutes* devido ao aumento de *Lactobacillus* (ARMOUGOM *et al.*, 2009). Especificamente, uma maior abundância de *L. reuteri* e menores níveis de *L. casei/parasei* e *L. plantarum* (MILLION *et al.*, 2012). Ainda, indivíduos com obesidade apresentam uma menor abundância do filo *Actinobacteria* (gênero *Bifidobacterium*) e do filo *Verrucomicrobia* (espécie *A. muciniphila*) (ARMOUGOM *et al.*, 2009; COLLADO *et al.*, 2008; KALLIOMÄKI *et al.*, 2008; SANTACRUZ *et al.*, 2010; SCHWIERTZ *et al.*, 2009). Estas alterações na microbiota intestinal podem reduzir a integridade da barreira intestinal, aumentar o estresse oxidativo e levar a maior degradação de muco contribuindo para o desenvolvimento de doenças (CHATELIER *et al.*, 2013).

Uma redução da riqueza e da diversidade microbiana também são características encontradas na microbiota fecal de humanos e animais com obesidade (ALMEIDA *et al.*, 2013; CHATELIER *et al.*, 2013; TURNBAUGH *et al.*, 2008). Estudos prévios encontraram uma baixa riqueza de genes

microbianos em 75% dos pacientes com obesidade severa e em 40% dos indivíduos com sobrepeso ou com obesidade moderada (ARON-WISNEWSKY *et al.*, 2020). Esta menor riqueza bacteriana em indivíduos com obesidade têm sido associada a uma maior adiposidade, resistência à insulina, dislipidemia e inflamação crônica subclínica (CHATELIER *et al.*, 2013). Mudanças histológicas e funcionais no intestino também foram descritas na obesidade tais como: alterações no comprimento das vilosidades; redução das junções firmes e da síntese de muco (NAGPAL *et al.*, 2018).

A associação entre biomarcadores metabólicos comuns na prática clínica e a abundância de determinadas bactérias na obesidade já foram observadas, como a elevação de ácido úrico, lipídios séricos e pressão arterial foram relacionados positivamente aos gêneros bacterianos *Clostridium* XIVa, *Bacteroides* e *Roseburia*. Já o aumento de circunferência da cintura, IMC, LDL-c, triglicérides (TG) e colesterol total (CT) foram relacionados positivamente aos gêneros *Blautia*, *Romboutsia*, *Ruminococcus*, *Clostridium sensu stricto* e *Dorea* (ZENG *et al.*, 2019).

Um dos principais fatores que influenciam na composição da microbiota intestinal é a alimentação e na obesidade observa-se frequentemente um padrão alimentar ocidental com alto consumo de alimentos ultraprocessados, ingestão elevada de açúcares, sódio e gordura especialmente saturadas e baixo consumo de frutas, legumes e verduras (CÂNDIDO *et al.*, 2018).

A quantidade de gordura e a composição de ácidos graxos, tem um impacto importante na composição microbiana do intestino e na inflamação subclínica associada à obesidade. A dieta hiperlipídica ou com elevado consumo de ácidos graxos saturados podem promover um aumento na abundância de bactérias gram-negativas desencadeando níveis elevados de LPS no intestino. Este desequilíbrio pode levar a um aumento da permeabilidade intestinal e a translocação do LPS para a circulação sanguínea através da sua incorporação nos quilomícrons durante a absorção de gordura e deste modo, a indução da inflamação sistêmica (CÂNDIDO *et al.*, 2018). Além disso, o aumento de gordura na dieta pode influenciar o filo *Actinobacteria* reduzindo o gênero *Bifidobacterium* já relacionado à melhora de parâmetros inflamatórios (CANI *et al.*, 2009). A bactéria *A. muciniphila*, um membro do filo *Verrucomicrobia*, também apresenta menor abundância após a ingestão de gordura (EVERARD *et al.*, 2013). Por outro lado, a dieta hiperlipídica está associada à maior abundância da bactéria *Desulfovibrio*, um patógeno oportunista, gram-negativo, produtor de endotoxinas e relacionado a danos à barreira intestinal e promoção da inflamação (TURNBAUGH *et al.*, 2009). Diante disso, evidencia-se que o consumo de uma dieta hiperlipídica promove alterações na composição da microbiota intestinal e na permeabilidade intestinal e como resultado favorece o quadro de endotoxemia metabólica, o que explica parcialmente a relação entre o padrão alimentar

observado na obesidade, o estado inflamatório e a resistência à insulina (CÂNDIDO *et al.*, 2018). A resistência à insulina está frequentemente associada a obesidade devido a muitos fatores como aumento da liberação de ácidos graxos livres, hormônios e citocinas inflamatórias que reduzem a sensibilidade à insulina e afetam as funções das células β -pancreáticas favorecendo o surgimento do diabetes mellitus do tipo 2 (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

A presença de polifenóis na dieta pode contribuir no manejo da obesidade através da modulação de genes inflamatórios, regulação da adipogênese e lipogênese no tecido adiposo e alterações da microbiota colônica e reduzir o risco de surgimento de comorbidades associadas à obesidade (CORRÊA *et al.*, 2019).

2.4 Microbiota intestinal e polifenóis

O consumo de uma dieta rica em polifenóis está relacionado à diminuição do risco de desenvolvimento de muitas doenças como o câncer, as doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas. Estima-se que a ingestão média de polifenóis seja de aproximadamente 900mg/dia através do consumo de frutas, vegetais, chá verde e castanhas, mas este consumo pode variar dependendo do padrão alimentar (PATTERN *et al.*, 2019).

Os polifenóis são metabólitos secundários sintetizados por plantas e tem a função de protegê-las contra radiação ultravioleta e agressão por patógenos. Nos alimentos, os polifenóis conferem características como cor, sabor, odor e o conteúdo destes compostos pode variar de acordo com as condições ambientais, como a localização da planta, o estágio de amadurecimento, o processamento, as condições de armazenamento e com fatores internos incluindo o estado fisiológico do alimento, a posição do alimento na árvore e o genótipo (PANDEY; RIZVI, 2009). No organismo humano, os polifenóis podem contribuir com a manutenção da saúde através das suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, anticarcinogênicas, antiadipogênicas e anti-diabéticas (SUN *et al.*, 2014; TRESSERRA-RIMBAU *et al.*, 2016; WEDICK *et al.*, 2012).

Os polifenóis são classificados em diferentes grupos de acordo com a sua estrutura química (Figura 4), são eles: ácidos fenólicos, taninos, lignanas, flavonoides, estilbenos, cumarinas e curcuminóides (MANACH *et al.*, 2005), sendo os flavonoides o grupo mais estudado. Os flavonoides são fitoquímicos polifenólicos que incluem os flavonóis (presentes na cebola, brócolis, no chá verde e em diversas frutas), flavonas (salsinha, aipo e chá de camomila), flavanonas (frutas cítricas), flavonóis (chá preto, chá verde), procianidinas (cacau, maçã, uvas, vinho tinto e chá), antocianidinas

(frutas vermelhas e vinho tinto) e isoflavonas (soja) (PANDEY; RIZVI, 2009). Estes diferentes flavonoides apresentam ações em vias metabólicas específicas e diferem em relação à sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (MOZAFFARIAN, DARIUSH; HY WU, 2018).

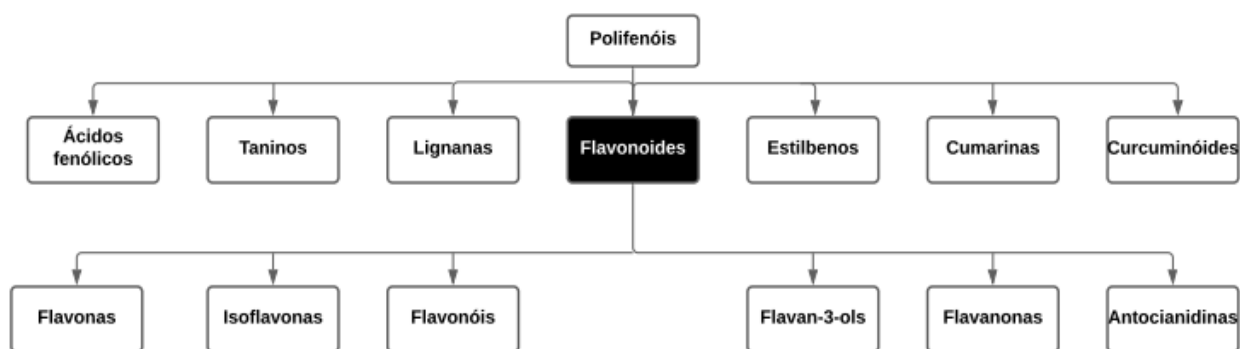


Figura 4. Principais classes de polifenóis. Adaptado de HARDMAN, 2014.

Os flavonoides estão presentes nos alimentos especialmente na forma conjugada e precisam ser degradados para serem utilizados pelo organismo (Figura 5) (VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2011; WILLIAMSON; CLIFFORD, 2010), processo que ocorre tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso dependendo do tipo de carboidrato associado ao flavonoide. No intestino delgado, as enzimas β -glicosidases, lactase florizina hidrolase que estão presentes na borda em escova e uma outra enzima, a β -glicosidase citosólica que está localizada no interior dos enterócitos rompem a ligação dos glicosídeos associados à flavanonas transformando-as em agliconas que estão prontas para serem absorvidas pelas células intestinais e transportadas posteriormente para a veia porta, no entanto, apenas uma parte dos flavonoides sofrem este processo, o restante chega ao cólon e a microbiota intestinal converte os flavonoides em ácidos fenólicos e outros metabólitos (DAY *et al.*, 1998, 2000). Após este processo, as agliconas e os metabólitos são transportados para o fígado e passam por metabolização (sulfatação, metilação) e múltiplos conjugados são produzidos através das enzimas de fase II. Em seguida, os metabólitos são direcionados aos tecidos-alvos ou são excretados na urina (MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018).

Durante a degradação dos flavonoides no cólon, os substratos produzidos pelas bactérias intestinais podem induzir a modificações na composição da microbiota intestinal por meio de efeitos prebióticos e agindo como agentes antimicrobianos contra microrganismos patogênicos. Além disso,

devido o envolvimento da microbiota intestinal na degradação destes compostos, acredita-se que a mesma pode influenciar na sua biodisponibilidade (MARÍN *et al.*, 2015).

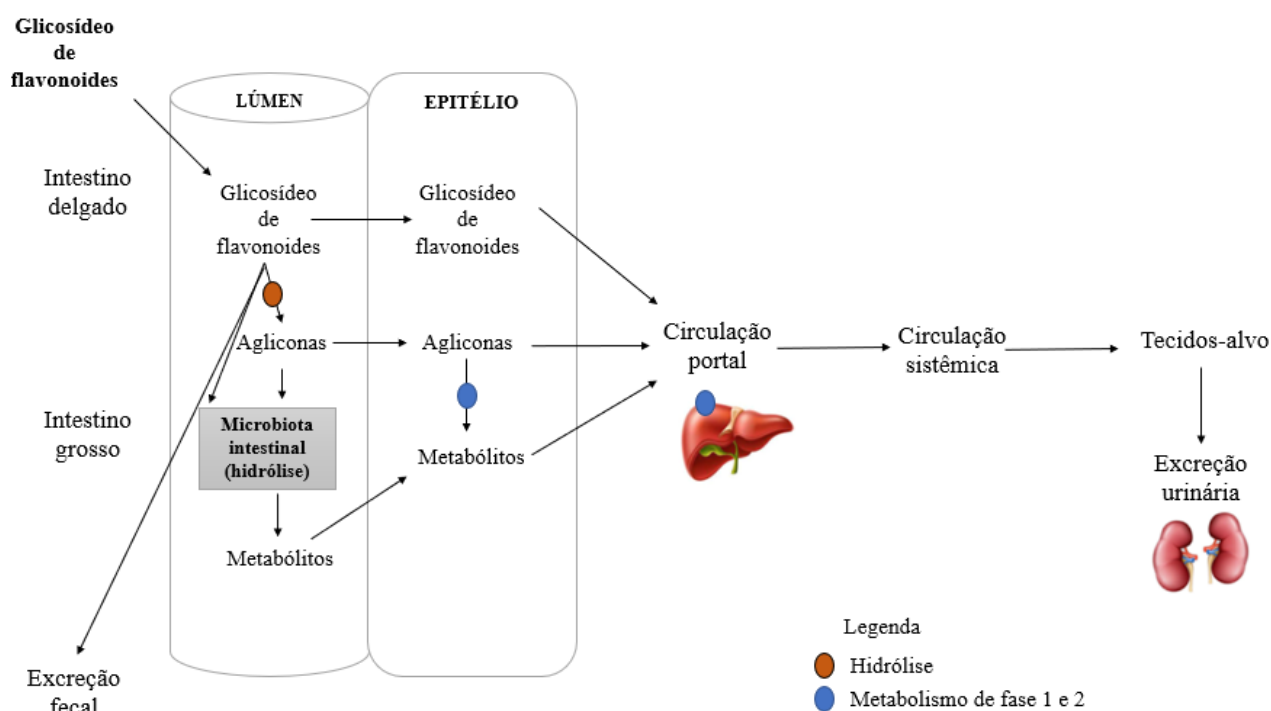


Figura 5. Após a hidrólise dos flavonoides no intestino delgado, as agliconas passam pelo metabolismo de fase I e II no trato gastrointestinal e no fígado e pelo metabolismo microbiano no intestino grosso. A maior parte dos metabólitos produzidos sofrem excreção renal. Adaptado de CASSIDY; MINIHANE, 2017.

Os polifenóis estão relacionados a modulação da microbiota intestinal através do aumento ou redução da abundância de bactérias específicas. O consumo de polifenóis está associado a maior abundância da espécie *A. muciniphila* e dos gêneros *Bacteroides*, *Blautia*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Alistipe* e *Desulfovibrio* (MOORTHY; SUNDRALINGAM, 2021). Por outro lado, um estudo clínico realizado com 10 homens saudáveis com intervenção com consumo de polifenóis do vinho tinto (272 ml/dia) por 4 semanas encontrou aumento de outros gêneros (*Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*) e espécies (*Eggerthella lenta*, *Blautia coccoides* e *Eubacterium rectale*) (QUEIPO-ORTUNO *et al.*, 2012). Um outro estudo com 22 indivíduos saudáveis que receberam bebida a base de coco rico em flavonóis (494 mg/dia) por 4 semanas encontrou aumento da abundância de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e redução de *Clostridium histolyticum* (TZOUNIS *et al.*, 2011).

Além destes efeitos na microbiota intestinal, os flavonoides são continuamente estudados devido as suas diversas ações biológicas principalmente as atividades antioxidantes e anti-

inflamatórias que podem trazer benefícios a muitos indivíduos portadores de doenças crônicas, já que estas condições comumente apresentam uma inflamação crônica subjacente (GARCÍA-BARRADO *et al.*, 2020).

2.5 Polifenóis da laranja e efeitos à saúde

A laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) está entre as frutas mais produzidas no Brasil, com uma produção aproximada de 992 mil toneladas em 2019-2020. Desta produção, uma grande parte é destinada para exportação principalmente de suco de laranja concentrado e congelado. O consumo de suco de laranja tem sido associado a muitos benefícios à saúde devido à sua composição nutricional com nutrientes e compostos bioativos que apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e podem ter efeitos potenciais na diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônicas como as doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer (MESQUITA; MONTEIRO, 2018). Considerando os dados de consumo alimentar da Pesquisa de Orçamentos Familiares de 2008-2009. CARNAUBA; HASSIMOTTO; LAJOLO, 2021 mostraram que a laranja e seu suco são a segunda e terceira fontes de polifenóis mais consumidas pela população brasileira, e os dois principais contribuintes para a ingestão de flavonoides.

Existem diversas variedades de laranja como Kozan, Navel, Moro, Tarocco, Sanguinello, Salustiana, Cara Cara, Bahia, Natal, Lima e Pera. Dentre estas, as variedades mais cultivadas no Brasil são: Bahia, Seleta, Sanguínea e Pera. Destas, a variedade Pera é a principal representante na produção de sucos de laranja no Brasil (MESQUITA; MONTEIRO, 2018). As laranjas sanguíneas (Moro, Tarocco e Sanguinello) são variedades de laranjas produzidas e consumidas em países mediterrâneos tais como o Sul da Itália e a Espanha (Figura 6) (HOLLANDS *et al.*, 2018).



Figura 6. Laranjas (*Citrus Sinensis* (L.) Osbeck), variedades Pera e Moro.

De modo geral, as laranjas apresentam diversos compostos bioativos em sua composição principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. A quantidade de flavonoides nas laranjas varia de

acordo com a maturação da fruta, condições climáticas, sistema de cultivo, condições de pós-colheita e processamento (BRASIL *et al.*, 2017; GATTUSO *et al.*, 2007). Os flavonoides mais abundantes em frutas e sucos de frutas do gênero *Citrus* são as flavanonas que estão presentes na polpa das frutas e no albedo (parte branca), os níveis de flavanonas variam bastante, mas concentrações entre 35 e 147mg/100g de laranja brancas e 44 e 106mg/100g da laranja vermelha (toranja ou *grapefruit*) já foram encontrados (PETERSON *et al.*, 2006). Avaliando o efeito do processamento no conteúdo de flavonoides de suco de laranja das variedades Bahia e Cara Cara, foi observada uma variação de 180,70 a 223,80 mg/L no conteúdo total de flavonoides, com variações decorrentes do processo de pasteurização (BRASIL *et al.*, 2017).

O suco de laranja é uma boa fonte destes compostos bioativos, principalmente a hesperidina e a narirutina, sendo a hesperidina a flavanona mais abundante na laranja representando aproximadamente 90% do seu conteúdo. As principais ações da hesperidina no organismo estão relacionadas a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e ocorrem através de diversos mecanismos como: a) redução da expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1); b) supressão da expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6); c) aumento da expressão do fator nuclear eritroide 2 (NRF2), um regulador da expressão de enzimas com uma potente atividade antioxidante como a glutathione-S- transferase e a quinona redutase.; d) aumento da produção de óxido nítrico; e) inibição da Janus kinase (grupo de proteínas ativadas por estresse e citocinas); e) inibição da produção de espécies reativas de oxigênio. A narirutina também está presente na laranja, mas em menores concentrações do que a hesperidina. Várias atividades anti-inflamatórias são atribuídas a este composto através de alguns mecanismos incluindo: a) inibição da resposta inflamatória induzida por LPS; b) inibição da secreção de citocinas; c) inibição do NF- κ B. Além das flavanonas, a vitamina C também contribui para estes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (ANACLETO *et al.*, 2020; CHAVES *et al.*, 2017; CRISTINA *et al.*, 2013)

Além disso, as flavanonas possuem outras atividades biológicas incluindo melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, efeitos sobre o metabolismo lipídico, redução da inflamação, apoptose e melhora da disfunção endotelial (BARRECA *et al.*, 2017; PARHIZ *et al.*, 2014). O conhecido estudo epidemiológico *Nurses Health Study* com aproximadamente 70.000 mulheres encontrou uma correlação inversa entre a ingestão de flavanonas e risco de isquemia cerebral considerando mulheres com alta ingestão de flavanonas (>63mg/dia) quando comparado aquelas com baixa ingestão (<13,7mg/dia) (CASSIDY *et al.*, 2013). Um outro estudo realizado com aproximadamente 10.000 homens e mulheres encontraram uma redução de 20% de doenças

cerebrovasculares nos voluntários com elevado consumo de flavanonas (hesperidina e narirutina) (4,7-26,8mg de aglicona/dia) (KNEKT *et al.*, 2002). Ainda, outros estudos com consumo habitual de frutas cítricas encontraram uma redução da incidência de doenças cardiovasculares e hipertensão. (REILLY, J. O. *et al.*, 2011; YAMADA *et al.*, 2011).

Já que as flavanonas encontram-se na maioria dos vegetais na forma glicosilada (hesperetina-7-O-rutinosídeo) e narirutina (naringenina-7-O-rutinosídeo), conhecidas como hesperidina e narirutina, estes compostos precisam ser metabolizados pela microbiota intestinal em agliconas (hesperitina e naringenina) para exercerem as suas funções (TSAO, 2010). Devido a interação entre as flavanonas e a microbiota intestinal, estes compostos vêm sendo investigados em relação a manutenção da saúde intestinal (STEVENS *et al.*, 2019).

No intestino, os efeitos benéficos das flavanonas ocorrem através de diferentes ações como: controle da permeabilidade intestinal, proteção da camada muco, regulação da imunidade intestinal, defesa contra o estresse oxidativo e interação com a microbiota intestinal (WANG, M. *et al.*, 2021a). Em relação a microbiota intestinal, os efeitos das flavanonas estão relacionados ao estímulo do crescimento de bactérias benéficas e/ou impedindo o crescimento de patógenos. Em ratos Lewis, a suplementação por gavagem com hesperidina (200mg/kg) por 4 semanas aumentou o número total de bactérias no colón e provocou uma elevação na abundância de *Lactobacillus* (ESTRUEL-AMADES *et al.*, 2019). Similarmente, o estudo clínico com 10 mulheres eutróficas que consumiram 300ml/dia de suco de laranja por 2 meses encontrou níveis elevados de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*. Acrescentando-se que estas mulheres após o tratamento apresentaram uma melhora dos parâmetros bioquímicos como perfil lipídico, glicemia e sensibilidade à insulina (LIMA, A. C. D. *et al.*, 2019).

A principal diferença entre as laranjas brancas (*Pera*, *Bahia*, *Lima*) e as laranjas sanguíneas (*Moro*, *Tarocco*, *Sanguinello*) é a presença de antocianinas (HOLLANDS *et al.*, 2018). As antocianinas são pigmentos naturais presentes em muitas frutas e vegetais, sendo as frutas vermelhas uma das principais fontes incluindo as uvas, morango, amora e cereja. Nos alimentos, as antocianinas são encontradas tanto na forma glicosídica quanto na forma de aglicona (antocianidinas) (LICCIARDELLO *et al.*, 2018).

A laranja sanguínea da variedade Moro tem sido intensamente investigada devido ao seu alto teor de antocianinas e pelos seus potenciais efeitos à saúde humana com ações metabólicas e anti-inflamatórias (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Existem muitos estudos clínicos que avaliaram os efeitos biológicos da suplementação de antocianinas isolada ou de alimentos ricos neste composto como as

frutas vermelhas e a laranja moro. Os principais achados encontrados nos parâmetros inflamatórios e metabólicos foram: redução de marcadores inflamatórios incluindo IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-1 β e NF- κ B, diminuição de determinados parâmetros bioquímicos como a glicemia, colesterol, insulina e triglicérides (CHAVES *et al.*, 2017; YEUM, 2017) melhora na função endotelial (LI *et al.*, 2020) e redução do IMC (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

A microbiota intestinal participa do metabolismo de antocianinas já que muitas espécies e gêneros bacterianos possuem enzimas que catalisam as antocianinas. As principais enzimas envolvidas neste processo são aquelas que possuem atividade β -glicosidase, presente em bactérias como as *Bifidobacterium spp.* e os *Lactobacillus spp.* (FARIA *et al.*, 2014). Por esta razão, muitos trabalhos com diferentes fontes alimentares de antocianinas observaram um aumento na abundância destas bactérias (GUERGOLETTTO *et al.*, 2016; HIDALGO *et al.*, 2012; ZHU, YONGSHENG *et al.*, 2018).

Estas espécies bacterianas (*Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*) são associadas a efeitos benéficos no intestino através da sua participação na função de barreira intestinal, modulação da resposta imunológica, antagonismo com patógenos através da produção de compostos antimicrobianos e pela competição por sítios de adesão (TURRONI *et al.*, 2014). Além disso, ambas estão relacionadas a melhora da inflamação e da obesidade através de mudanças da composição da microbiota intestinal (WANG, J. *et al.*, 2015). Um estudo clínico com 9 homens adultos entre 45-50 anos tratados com vinho tinto com ou sem álcool que contém principalmente as antocianinas encontraram efeito sobre a microbiota intestinal com aumento na concentração fecal de *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Eggerthella lenta* (BOTO-ORDÓÑEZ *et al.*, 2014).

Existem muitos trabalhos científicos com compostos bioativos de diferentes alimentos e os seus efeitos sobre a composição da microbiota intestinal e a inflamação crônica subclínica, no entanto, o efeito da ingestão do suco de laranja e os seus mecanismos de ação na obesidade e resistência à insulina precisam ser mais estudados. Neste contexto, o grupo de pesquisa de compostos bioativos do FORC/Fapesp/Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, no qual o presente trabalho se insere, vem realizando estudos que visam compreender melhor o processo de metabolização dos compostos bioativos de suco de laranja e identificar os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos já realizados ao consumo de suco, que podem acarretar na promoção e na manutenção da saúde, além da redução do risco de desenvolvimento de DCNT.

3 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um importante problema de saúde pública influenciada por diversos fatores como o estilo de vida e a predisposição genética, o que a torna de difícil controle. No contexto da sua etiologia, sabe-se que a inflamação do tecido adiposo e o desequilíbrio da microbiota intestinal apresentam uma importante contribuição. Para o controle deste problema de saúde pública, já existem algumas estratégias recomendadas sendo elas divididas entre principais e coadjuvantes. As estratégias coadjuvantes podem ser categorizadas como exploração de possíveis tratamentos que tenham como alvo a modulação: (a) da inflamação e (b) da microbiota intestinal. Tratamento estes que podem auxiliar no manejo da doença, visto que, estas alterações podem levar ao desenvolvimento de outras condições clínicas como o diabetes mellitus e a resistência à insulina. Contudo, as principais estratégias para a redução do risco de desenvolvimento da obesidade e o tratamento da doença ainda continuam sendo (a) prática de atividade física e (b) alimentação balanceada devido aos efeitos positivos no metabolismo energético, lipídico e glicídico.

Neste sentido, muitos estudos científicos atuais destacam a importância do consumo de alimentos in natura, como as frutas e os vegetais, que são ricos em compostos bioativos e micronutrientes com efeitos benéficos na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis como: doenças cardiovasculares, câncer, síndrome metabólica, diabetes do tipo 2 e obesidade.

A laranja é um alimento consumido mundialmente e uma fonte importante de flavanonas, compostos bioativos com propriedades benéficas à saúde humana. O suco de laranja também é uma excelente fonte destes compostos bioativos com alta concentração de flavonoides e carotenoides que apresentam efeitos diretos e indiretos em vias metabólicas associadas a fisiopatologia da obesidade incluindo o estresse oxidativo, a inflamação subclínica e nos últimos anos têm sido investigados devido a sua ação sobre a composição da microbiota intestinal.

Nosso grupo, nos últimos anos vem pesquisando os efeitos do suco de laranja em diferentes contextos clínicos em modelos animais e humanos a fim de compreender os benefícios da ingestão dos compostos bioativos presentes na laranja que forneceram subsídios para o planejamento da intervenção no presente estudo.

Diante do exposto, notou-se a necessidade de investigar se os benefícios do suco de laranja se estendiam a indivíduos com obesidade e resistência à insulina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro na microbiota intestinal, em parâmetros bioquímicos e em marcadores inflamatórios de indivíduos com obesidade e resistência insulínica.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar parâmetros antropométricos e o consumo alimentar de indivíduos com obesidade e resistência insulínica antes e após a ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro;

Avaliar o efeito da ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro em parâmetros bioquímicos e na pressão arterial em indivíduos com obesidade e resistência insulínica;

Avaliar o efeito da ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro na concentração de citocinas e quimiocinas no plasma e em sobrenadante de monócitos de indivíduos com obesidade e resistência insulínica;

Avaliar o efeito da ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro na excreção urinária de metabólitos de flavanonas e antocianinas;

Avaliar o efeito da ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro na microbiota intestinal;

Avaliar o efeito da ingestão do suco de laranja das variedades Pera e Moro na produção de ácidos graxos de cadeia curta e no pH fecal em indivíduos com obesidade e resistência insulínica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Caracterização físico-química dos sucos de laranja

Os sucos foram fornecidos pela Fundecitrus. Após descongelamento sob refrigeração, os sucos de laranja pasteurizados foram centrifugados a $8.000 \times g/15 \text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante utilizado para as análises de caracterização.

5.1.1 Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix (°Brix)

Os sólidos solúveis totais (TSS) dos sucos de laranja foram analisados através do refratômetro digital portátil (modelo DR 201-95).

5.1.2 Determinação do pH

Para determinação do pH dos sucos de laranja, foi utilizado pHmetro modelo Metrohm 827 pH Lab Meter Swissmade.

5.1.3 Açúcares totais

As amostras dos sucos de laranja foram filtradas em filtros PTFE (Politetrafluoretileno) de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore Ltda) e em seguida analisadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector pulsoamperométrico (Dionex, DX500). Foram utilizadas uma coluna PA1 (250 x 4 mm, Dionex, Sunnyvale) e fase móvel constituída de hidróxido de sódio (NaOH) 18 mM, em modo isocrático, por 25 min. As amostras foram analisadas em duplicata com fluxo através da coluna de 1 mL/min. Os açúcares foram identificados pelo tempo de retenção em comparação a curvas com padrões externos de sacarose, frutose e glicose (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos como g/100 mL de suco.

5.1.4 Determinação de fenólicos totais

Para análise de fenólicos totais foi usado o reagente de Folin-ciocalteu e ácido gálico como padrão (SWAIN; HILLIS, 1959). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados obtidos foram expressos como mg/100 mL de suco de laranja.

5.1.5 Identificação dos ácidos orgânicos

As amostras foram filtradas em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro. Em seguida, foram injetadas em sistema cromatográfico equipado com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) (Hewlett-Packard 1100, Agilent), em coluna µBondpack C18 (300mm x 3.6 mm i.d., Waters), com fase móvel de ácido fosfórico a 0,1%, com fluxo de 0,5 mL/min. O monitoramento foi feito a 210nm. As amostras foram injetadas em triplicatas e os resultados expressos em mg/100 ml de suco. Os ácidos orgânicos foram identificados a partir do tempo de retenção e similaridade do espectro de absorção em comparação aos padrões comerciais. Os padrões dos ácidos málico, succínico, cítrico, ascórbico e tartárico foram utilizados para a construção das curvas de calibração utilizando cinco pontos de concentração e aplicados em triplicata.

5.1.6 Determinação das fibras alimentares nos sucos

A análise de FA foi realizada em triplicata com 50 mL dos sucos. As frações insolúvel (FAI) e solúvel (FAS) da FA foram determinadas separadamente pelo método AOAC 991.43 utilizando o kit enzimático Total Dietary Fiber Assay Kit (K-TDFR) (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland). A FA total foi calculada pela somatória de FAI e FAS (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995).

5.1.7 Identificação e quantificação de flavonoides

Para extração e separação dos compostos fenólicos, amostras dos sucos foram centrifugadas (8.000 x g, 15 minutos a 4 °C) e o sobrenadante submetido a separação em fase sólida em coluna de 1g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6mL (HPLC Technology), previamente pré-condicionada com metanol, seguido de água deionizada. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com água deionizada e a eluição dos compostos fenólicos realizada com metanol e posteriormente, metanol:NH₃ (99, 5:0,5, v/v). Os eluatos foram secos em rotaevaporador (Rotavapor, RE 120), sob vácuo, a 40 °C. As amostras de suco de laranja Pera, foram ressuspensas em metanol, enquanto as amostras de laranja Moro, ressuspensas em metanol acidificado com ácido acético 5% e posteriormente filtradas em filtros PTFE de 0,45 µm (Millipore Ltda).

A separação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (equipamento *Agilent 2100*) e detector com arranjo de diodo (CLAE/DAD). Utilizou-se coluna Prodigy 5 µm ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo 1,0 mL/min para

flavanonas e 0,8 mL/min para antocianinas, a 25 °C. Para flavanonas, a eluição consistiu em gradiente de solventes constituídos por A: 0,5% de ácido fórmico em água e B: 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila, com gradiente de concentração dos solventes de 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% em 25 min, 90% em 30 min, 50% em 32 min e 8% em 35 min (tempo total de corrida), sob comprimento de onda de 280 nm. Para as antocianinas, foram utilizados os solventes A: água/ ácido fórmico/ acetonitrila (96:1:3 v/v/v) e D: água/ ácido fórmico/ acetonitrila (48:1:51 v/v/v). O gradiente de concentração dos solventes consistiu em 10% de D no início, 25% em 10 min, 31% em 15 min, 40% em 20 min, 50% em 30 min, 100% em 40 min, 10% em 45 min e 10% em 50 min (tempo total de corrida). Ao precipitado foram adicionados 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), sobre agitação, em temperatura ambiente, overnight, e posterior filtração. O comprimento de onda para leitura de 525 nm. Para quantificação, foi utilizado curvas de calibração de padrões de narirutina, hesperidina, didimina e cianidina 3-glucosídeo.

A identificação dos compostos foi realizada por espectrometria de massas (MS) tipo *ion trap* (*Esquire HCT, Bruker Daltonics*), acoplado a um cromatógrafo líquido (LC) (*Prominence, Shimadzu*) e interface de ionização por *electron spray* (ESI), nas mesmas condições utilizadas para a CLAE-DAD. Em seguida o fluxo foi alterado para 0,2 mL por minuto para passagem no espectrofotômetro de massa, com ESI em modo positivo para antocianinas e negativo para os demais flavonoides. O detector de massas foi programado para realizar *full scan* entre massa carga (m/z) 100-1000 e a energia de ionização foi de 3000-3500V. Os compostos foram identificados pela comparação do espectro de massas obtido em relação aos padrões comerciais e/ou dados da literatura, além do tempo de retenção e espectro de absorção.

5.2 Aprovação do comitê de ética

Todos os procedimentos deste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética da USP (CAAE: 59663816.8.0000.5462) e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (Nº de Protocolo: 4699, ANEXO 1) e registrado na plataforma de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) sob o identificador U111112158661 e respeitaram as normas estabelecidas pela legislação brasileira na Resolução n. 466 do conselho Nacional de Saúde. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2) antes de iniciar a pesquisa.

5.3 Seleção dos voluntários

Foram recrutados pacientes com obesidade e resistência à insulina em acompanhamento no ambulatório de Nutrição Clínica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Foram selecionados voluntários que concordaram em participar da pesquisa e assinar o TCLE, indivíduos com capacidade de responder os questionários da pesquisa (dados clínicos e de consumo alimentar) e que podiam ser submetidos à avaliação da composição corporal, coleta de sangue, urina e fezes.

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: 1) indivíduos com idade entre 40 e 60 anos de idade; 2) diagnóstico nutricional de obesidade segundo os pontos de corte da OMS e 3) resistência à insulina segundo duas equações simplificadas: HOMA1-IR (*Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance*) = $(IJ \times GJ) / 22,5$ (MATTHEWS *et al.*, 1985) utilizando o ponto de corte de 2,71 conforme estudo realizado com a população brasileira (GELONEZE *et al.*, 2005) e HOMA1-%B (*Homeostatic Model Assessment b-Cell Function*) = $(20 \times IJ) / (GJ - 3,5)$, estas equações podem ser usadas para estimar a resistência à insulina e a função das células beta, respectivamente. Em tais equações, IJ corresponde à insulinemia de jejum em mU/L, e GJ, à glicemia de jejum em mmol/L e foi realizado através do programa de computador *HOMA Calculator*.

Os critérios de exclusão do estudo foram: 1) pacientes com DM1 ou DM2 ou com alterações no exame de inclusão, compatíveis com o diagnóstico de DM ($GJ \geq 126\text{mg/dia}$); 2) presença de doenças gastrointestinais ou disfunção cognitiva; 3) uso de medicamentos anti-inflamatórios, antibióticos e/ou suplementação com vitaminas, minerais, compostos bioativos, prebióticos, probióticos e simbióticos.

No recrutamento, foram selecionados 55 voluntários para realizar a análise da glicemia de jejum e insulina para o cálculo do índice HOMA e, em seguida, realizamos a alocação nos grupos de intervenção: Suco de laranja Pera (SLP) ou Suco de laranja Moro (SLM). Destes, 21 voluntários não atenderam o critério de resistência à insulina ($\text{HOMA-IR} > 2,71$). Os demais voluntários ($n=34$) foram alocados para o protocolo, sendo que 6 voluntários desistiram da pesquisa devido a motivos pessoais ou não informaram. Portanto, 28 voluntários foram incluídos na pesquisa, com desistência durante o protocolo em ambos os grupos (Figura 7).

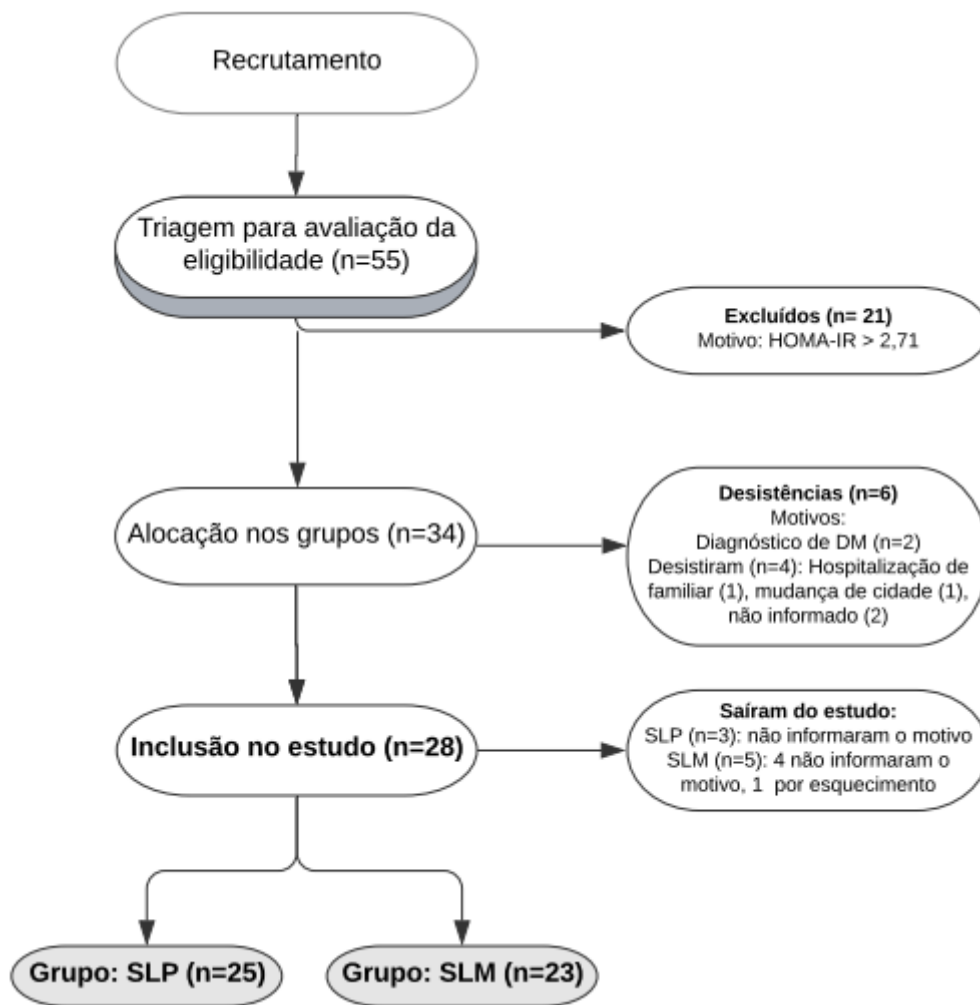


Figura 7. Fluxograma de recrutamento dos participantes no projeto de pesquisa. SLP: Suco de laranja Pera; SLM: Suco de laranja Moro.

5.4 Delineamento da pesquisa

Este é um estudo clínico crossover, randomizado com suplementação dos sucos de laranja Pera e Moro durante 15 dias ininterruptos com um período de *washout* entre os tratamentos de aproximadamente 40 dias (Figura 8). Dos voluntários que participaram do estudo, 22 começaram com o SLP e 7 iniciaram com o SLM.

Os voluntários do estudo participaram de dois ensaios experimentais: Suco de laranja Pera - SLP (25 voluntários) e Suco de laranja Moro – SLM (23 voluntários), ambos com a ingestão de 400ml/dia sendo fornecidos pela empresa Fundecitrus. Os participantes retiraram os sucos em garrafas de 1 litro no início de cada tratamento no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e foram

orientados a manter os sucos em geladeira até o consumo. Foi sugerido que o consumo do suco fosse fracionado em duas refeições (almoço e jantar), sendo 200ml em cada uma.

Os voluntários foram instruídos a ingerir a primeira dose de suco de laranja depois das mensurações (dia 1) e o último no dia 15. Os voluntários foram orientados a não ingerirem bebidas alcóolicas e alimentos que apresentassem quantidades significativas de flavanonas (por exemplo, suco ou frutas cítricas e ervas aromáticas como hortelã) ou antocianinas (por exemplo, açaí, ameixa, amora, cereja, figo, framboesa, uva, maçã, morango e acerola e nos vegetais, como o repolho-roxo, batata-roxa, berinjela, batata-doce) e foram aconselhados a não tomar quaisquer outros suplementos alimentares durante o período de estudo. Além disso, os voluntários foram instruídos a manter seus padrões normais de vida, atividade física e sono durante o período de intervenção.

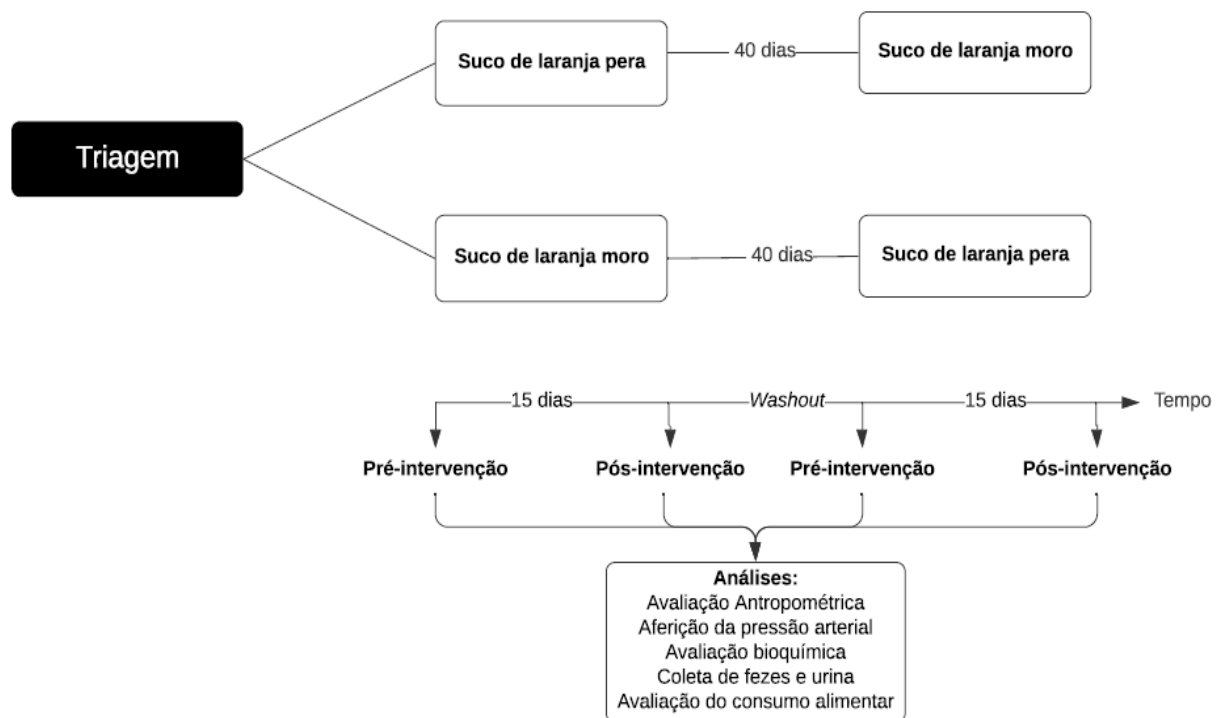


Figura 8. Delineamento do estudo.

5.5 Descrição das variáveis

5.5.1 Variáveis relacionadas ao consumo alimentar

Para avaliação do consumo alimentar foi utilizado o Recordatório Alimentar de 24 horas (ANEXO 4) no início e final de cada intervenção. Este método consiste em definir a ingestão alimentar no dia anterior a consulta. Após a coleta de dados, as calorias e os nutrientes foram quantificados através do Software Avanutri.

5.5.2 Variáveis relacionadas aos indicadores antropométricos

Os participantes do estudo foram submetidos à avaliação antropométrica no início e final de cada intervenção (ANEXO 3) que incluía medidas de peso, altura e circunferência abdominal. Todas as medidas foram realizadas por nutricionistas experientes, os participantes foram orientados a estarem vestidos de shorts ou bermudas de tecido fino e blusa de tecido leve, permanecendo descalços durante toda a avaliação.

- **Peso:** Foi aferido utilizando balança digital com capacidade máxima de 150 kg com grau de precisão de 50g, os participantes posicionaram-se no centro da plataforma da balança, com os braços estendidos, com as pernas ligeiramente afastadas e com a postura ereta, com o olhar fixo no horizonte para evitar oscilações na leitura do peso (JELLIFFE, 1966). Foi solicitado aos participantes que retirassem todos os objetos que pudessem interferir na medida do peso.
- **Estatuta:** Foi utilizado o estadiômetro acoplado à balança, estando os indivíduos em posição ereta, braços estendidos ao longo do corpo, pés unidos e descalços (JELLIFFE, 1966).
- **Circunferência Abdominal (CA):** Foi utilizado o ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela, por fita métrica inelástica. Os indivíduos foram classificados de acordo com os pontos de corte preconizados pela Federação Internacional de Diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2006).
- **Índice de Massa Corporal (IMC):** Foi calculado a partir da relação entre o peso e altura em metros ao quadrado e classificados segundo os pontos de corte pela OMS (WHO, 2000).

5.5.3 Coleta de sangue

As coletas de sangue foram inicialmente na triagem para dosagem da glicemia de jejum e da insulina e confirmação da elegibilidade segundo diagnóstico de resistência à insulina.

Posteriormente as coletas ocorreram no início e final de cada intervenção: primeiramente no período basal pela manhã com jejum de 12 horas, aproximadamente entre 8-10hs e a última período final, após 12 horas da última dose do suco. Em cada período da intervenção foi coletado 40mL de sangue venoso. Após a coleta, o sangue foi utilizado para cultura de células de monócitos (10mL) e o restante (30mL) foi centrifugado a 690 x g durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, o plasma ou soro foram extraídos, alíquotado e armazenados em freezer -80°C para posteriores análises.

5.5.4 Coleta de urina casual

O paciente realizou a coleta de urina na sua residência em frasco fornecido pelos pesquisadores e entregou no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no período basal e final. Foram coletados 75mL de urina, preferencialmente a primeira urina da manhã ou com um intervalo mínimo de 2 horas após a última micção, desprezando o primeiro jato. Após a coleta, o volume total foi armazenado em freezer -80°C para posteriores dosagens.

5.5.5 Coleta de fezes

O paciente realizou a coleta de uma pequena quantidade das fezes (equivalente a uma colher de sopa cheia) diretamente no frasco fornecido pelos pesquisadores, com o cuidado de não misturar com a urina e entregaram no período basal e final do protocolo. Caso o paciente tivesse o hábito de evacuação à tarde ou à noite, o paciente foi orientado a embrulhar o frasco em papel alumínio e conservá-los na geladeira até a hora de entregar no hospital. Após a coleta, este material foi utilizado para posteriores análises.

5.5.6 Análise da microbiota intestinal (Sequenciamento de Nova Geração)

Para análise da composição da microbiota intestinal, as amostras foram encaminhadas para a Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil). Foi utilizado os primers na região V3-V4 do gene 16S rRNA com as seguintes condições: o primeiro primer de PCR continha as sequências Illumina (Illumina), com o segundo PCR com as sequências indexadas. A reação de PCR foi realizada

em triplicata usando Platinum Taq (Invitrogen) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45s, 55°C por 30s e 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 2 min para PCR 1. No PCR 2 as condições foram: 95°C por 5 min, 10 ciclos de 95°C por 45s, 66°C por 30s e 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 2 min. Para comparação, o protocolo Illumina 16S foi utilizado como descrito (Illumina Technical Note 15044223 Rev. B). A reação final de PCR foi realizada usando AMPureXP (Beckman Coulter) e as amostras foram incluídas em uma biblioteca de sequenciamento para quantificação. As estimativas de Amplicon foram realizadas com o kit Picogreen dsDNA (Invitrogen), e em seguida as bibliotecas foram diluídas para quantificação precisa de qPCR utilizando KAPA (Kit de Quantificação para plataformas Illumina) (KAPA Biosystems).

5.5.7 Análise de bioinformática

Após o sequenciamento do 16S rRNA na Plataforma Illumina MiSeq, as comunidades microbianas foram analisadas utilizando o software QIIME 2 versão 21.2 d (CAPORASO *et al.*, 2010). As análises taxonômicas foram realizadas contra o banco de dados SILVA versão 132 (QUAST *et al.*, 2013). Posteriormente, a abundância relativa no nível filo e gênero foram analisadas através dos procedimentos estatísticos e os índices de alfa e beta diversidade foram calculados através do software online *Microbiome Analyst* (DHARIWAL *et al.*, 2017), disponível em <http://www.microbiomeanalyst.ca>.

5.5.8 Análise do pH fecal

Para análise do pH fecal, as fezes foram pesadas (0,3 mg) em balança analítica e transferidas para tubos eppendorfs. Então, foi adicionado 1mL de água miliq e usado a fita para mensuração.

5.5.9 Análise de ácidos graxos de cadeia curta

As amostras fecais foram extraídas (0,4 mg) em 1,5 mL de ácido metil valérico 0,05% em acetonitrila (padrão interno). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados usando seringas e foram filtrados em filtros de 0,8 µm e de 0,2 µm (adaptado de MENEZES *et al.*, 2010). As fezes foram injetadas em cromatógrafo a gás (CG) (Agilent Technologies 7890B GC System (USA) equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor automático (Agilent Technologies GC Sampler 80, Switzerland), e coluna capilar CP7747 de sílica fundida WCTO (Varian, LakeForest, CA, USA), com os seguintes

parâmetros: temperatura do injetor e do detector foi de 250°C; a análise foi feita em rampa de 100°C a 240°C sob pressão constante (tempo de corrida = 30 min). As amostras foram injetadas em volume de 3 µL, com split 1:10.

A curva padrão foi obtida com soluções de AGCC (Volatile Free Acid Mix, COD: CRM46975, Supelco, Bellefonte, PA, USA) em concentrações de 2,00 a 8,00 mM. O ácido 2-metil-valérico (Aldrich 10987-8, Milwaukee, WI, USA) foi utilizado como padrão interno, em concentração final de 0,05% (MENEZES *et al.*, 2010; ZHAO; NYMAN; JÖNSSON, 2006), em acetonitrila. A curva padrão também foi centrifugada e filtrada, como as amostras.

5.5.10 Isolamento dos monócitos e tratamento com LPS

Foi coletado 10mL de sangue total para separação de monócitos. Após a coleta de sangue, foi adicionado 3mL de Histopaque 1077 e 3mL de Histopaque 1119 para a sedimentação das hemácias após 30 minutos de centrifugação de gradiente, com velocidade de 400Xg em uma centrífuga sem freio à temperatura ambiente. Após este processo, houve a formação de uma nuvem que correspondia aos leucócitos totais e abaixo aos neutrófilos, as quais foram transferidas separadamente para tubos cônicos estéreis e diluídos em PBS. Para formação do precipitado, os tubos foram centrifugados novamente com velocidade de 400 x g em uma centrífuga sem freio a 4°C por 10 minutos. Após isto, as células foram ressuspensas em 1mL de meio de cultura RPMI-1640 enriquecido (preparado com soro fetal bovino e antibiótico) e obteve-se os linfócitos e monócitos. Para a separação dos linfócitos e monócitos foi necessário realizar uma cultura para que os monócitos ficassem aderidos na placa, enquanto os linfócitos dispersos no sobrenadante. Em uma placa de cultura de seis poços, foi adicionado 2mL de meio de cultura RPMI-1640 enriquecido e 500µl de suspensão celular de leucócitos em dois poços e incubado, por 1 hora, em estufa a 37 °C com concentração de 5% de CO₂.

Após incubação, o sobrenadante composto pelos linfócitos foi descartado e os monócitos ficaram aderidos à placa. Em seguida, foi adicionado no poço com monócitos 1,8 mL de meio RPMI-1640 enriquecido e 0,2 mL de LPS (5µg/ml). Os monócitos foram incubados por 48hs em estufa a 37°C com concentração de 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultura foi transferido para tubos cônicos estéreis e acrescentou-se PBS até completar volume de 15mL, o qual foi centrifugado com velocidade de 400 x g em uma centrífuga sem freio à temperatura ambiente por 10 minutos. Os sobrenadantes foram alíquotados em tubos eppendorfs em freezer -80°C para análise de citocinas e quimiocinas (IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IL-8).

5.5.11 Determinação dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios plasmáticos

Todos os parâmetros bioquímicos plasmáticos foram mensurados no período basal e final de cada intervenção.

5.5.11.1 Glicose, insulina e perfil lipídico

Todas as análises bioquímicas foram realizadas pelo Centro Estadual de Análises Clínicas (C.E.A.C.), laboratório responsável do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Para glicemia de jejum foi utilizado método colorimétrico – QS (química seca) em amostra de plasma; para insulina foi realizada quimiluminescência em amostra de soro; a hemoglobina glicada foi analisada por imunoturbidimetria em sangue total; o perfil lipídico foi analisado em amostras de soro, sendo utilizado método colorimétrico para o colesterol total e colorimétrico-QS para a HDL-c (Lipoproteína de alta densidade) e TG. Já o LDL-c foi determinado pela equação de Friedwald.

5.5.11.2 Citocinas e quimiocinas

A análise das citocinas plasmáticas (IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IL-8) e da quimiocina plasmática (MCP-1) foram determinados por citometria de fluxo através dos kits de quimiocinas e citocinas da BD™ Cytometric Bead Array (CBA).

5.5.11.3 Lipopolissacarídeos

A análise de LPS foi determinada por método colorimétrico utilizando o kit LAL-Chromogenic (QCL-1000™) da Lonza™.

5.6 Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva dos dados por meio de média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os quatro tempos (SLP = basal, SLP = final, SLM = basal, SLM = final) foi aplicado o teste de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) com o estimador robusto para matriz de covariância e, na análise de comparações múltiplas, realizou-se o teste post-hoc *Sidak*. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em escala logarítmica. Assumiu-se um nível descritivo de 5% ($p \leq 0,05$) para significância estatística. Os dados foram digitados em Excel e analisados no programa SPSS versão 23 para Windows.

Para a análise de correlação dos gêneros bacterianos com os demais dados utilizou-se o coeficiente de correlação de *Spearman* no programa *SPSS*. Para a seleção das variáveis apresentadas foi utilizado a força de correlação moderada ($r > 0,5$).

Para analisar a diferença dos voluntários em relação aos parâmetros bioquímicos e inflamatórios de acordo com o grau de obesidade utilizou-se o delta para todos os parâmetros, exceto para os metabólitos da urina, microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em monócitos. Para isto, a técnica utilizada foi a discriminação por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) através da plataforma online *MetaboAnalyst*.

Para análise da alfa-diversidade da microbiota intestinal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e a análise da beta-diversidade foi feita através de PERMANOVA, ambas através do Software online *Microbiome Analyst*.

6 RESULTADOS

6.1 Composição do suco de laranja

As características da composição nutricional e físico-química dos sucos de laranja estão disponíveis na Tabela 1.

Em relação as calorias, os sucos apresentaram resultados semelhantes. A quantidade de açúcares também foi similar em ambos os sucos, sendo a sacarose o principal açúcar encontrado. A presença de fibra alimentar (FA) apresentou uma discreta diferença entre os sucos, encontramos no SLM uma quantidade maior de FA Solúvel, FA Insolúvel e total, sendo esta última a que contribuiu com a maior parte desta concentração. Esta variação entre os sucos é comumente encontrada e possivelmente está relacionada à diferença de variedade e de estágio de amadurecimento dos frutos, uma vez que ambos os sucos sofreram o mesmo processamento. Além da FA, o SLM apresentou concentrações mais elevadas de compostos fenólicos.

Dos ácidos orgânicos encontrados nos sucos, a maior abundância em ambos os sucos foi de ácido cítrico, seguido de ácido málico, ascórbico e tartárico. Destes ácidos, o ascórbico estava em maior quantidade no SLM quando comparado ao SLP.

Em relação aos Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e o pH os valores encontrados foram bem próximos nos distintos sucos analisados.

O conteúdo de flavonoides do SLP e SLM foi de 31,71mg/100mL e 35,13mg/100mL, respectivamente. A hesperidina foi a principal flavanona encontrada em ambos os sucos, contribuindo

com 93,76% do conteúdo total de flavanonas no SLP e 73,54% no SLM. As três flavanonas majoritárias (narirutina, hesperidina e didimina) estavam em maior concentração no *pellet*, correspondendo a 95,23% (30,19mg/100mL) no SLP e 93,68% (30,28mg/100mL) no SLM.

Além das flavanonas, o SLM, tem a presença das antocianinas em sua composição (2,81mg/100mL de antocianinas totais), principalmente a cianidina-3-*O*-glicosídeo (97,15%) e cianidina-3-*O*-(6"-malonyl-glucosídeo) (2,85%) (Tabela 2).

Tabela 1. Composição nutricional e composição físico-química em 100 mL do suco de laranja Pera e Moro.

Parâmetros	SLP	SLM
A) Composição nutricional		
Energia (kcal)	24,60*	25,56*
Açúcares totais solúveis (g)		
Sacarose	3,10 ± 0,25	2,80 ± 0,25
Frutose	1,56 ± 0,10	1,90 ± 0,15
Glicose	1,50 ± 0,08	1,69 ± 0,18
Total	6,15 ± 0,42	6,39 ± 0,58
Ácidos orgânicos (mg)		
Ácido cítrico	1092,36 ± 3,09	1161,94 ± 81,19
Ácido málico	301,77 ± 3,34	273,97 ± 18,50 ^b
Ácido Ascórbico	16,00 ± 1,5	32 ± 2,6 ^a
Ácido Tartárico	ND	26,25 ± 0,95
Fenólicos totais (mg)	50,31 ± 0,00	60,75 ± 0,01
Fibras alimentares (FA) (g)		
Solúvel	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Insolúvel	0,25 ± 0,05	0,26 ± 0,02
Total	0,29	0,34
B) Composição físico-química		
pH	3,52 ± 0,00	3,48 ± 0,00
TSS (°Brix)	9,50 ± 0,00	10,00 ± 0,00

Valores expressos como média ± desvio padrão; SLP: Suco de laranja Pera; SLM: Suco de laranja Moro; ND: não detectado; pH: potencial hidrogeniônico; TSS: Sólidos Solúveis Totais; *Valor calórico proveniente dos açúcares; ^ap<0,001; ^bp<0,05.

Tabela 2. Conteúdo de flavanonas e antocianinas nos pellets e sobrenadantes em 100mL dos sucos de laranja Pera e Moro.

Compostos	SLP		SLM	
	Sobrenadante	Pellet	Sobrenadante	Pellet
Narirutina	0,25 ± 0,03	1,79 ± 0,08	0,14 ± 0,02 ^s	0,40 ± 0,07 [#]
Hesperidina	1,26 ± 0,44	28,40 ± 1,52	1,48 ± 0,20	22,29 ± 2,11 [#]
Didimina	Tr*	Tr*	0,42 ± 0,02	7,59 ± 0,42
Flavanonas totais	1,51	30,19	2,04	30,28
Cianidina-3-O-glucosídeo	-		2,73 ± 0,08	
Cianidina-3-O-(6"-malonil glucosídeo)**	-		0,08 ± 0,03	
Antocianinas totais	-		2,81	
Flavonoides totais	31,71		35,13	

Valores expressos em mg/100 mL de suco (média ± desvio padrão). SLP: Suco de laranja Pera; SLM: Suco de laranja Moro; *tr: traços; **Equivalente de cianidina-3-O-glucosídeo; [#]Comparação entre o pellet do SLP versus SLM (p<0,05); ^sComparação entre o sobrenadante do SLP versus SLM (p<0,05).

6.2 Características dos voluntários

Foram incluídos no estudo 28 pacientes que estavam em acompanhamento no ambulatório de nutrição clínica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e destes, 25 completaram o período de intervenção com o SLP e 23 completaram o período de protocolo com o SLM. Na Tabela 3 é possível visualizar as características gerais dos pacientes na triagem.

Os voluntários apresentaram na triagem tanto a glicemia quando a hemoglobina glicada alteradas, sendo classificados como pré-diabéticos. Por outro lado, os valores de insulina de jejum estavam dentro da normalidade. No cálculo do Índice HOMA-IR considerando os valores de glicemia e insulina em jejum, os pacientes apresentavam resistência à insulina, portanto, elegíveis para o estudo.

Tabela 3. Características basais dos voluntários.

Parâmetros	Triagem	Valores de Referência	
		Ideal	Pré-diabetes
Glicemia de jejum (mg/dL)	101 ± 10,87	< 99*	100 a 125*
Insulina de jejum (μIU/mL)	16,43 ± 3,76	1,9 a 23*	-
HbA1c (%)	5,97 ± 0,32	<5,7*	5,7 a 6,4*
Índice HOMA-IR	4,06 ± 0,87	≤ 2,71**	> 2,71**

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão; n=28; HbA1c: Hemoglobina Glicada; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance*; *Valores de referência do Centro Estadual de Análises Clínicas (C.E.A.C.); **Geloneze et al., 2009.

Do total de voluntários que participaram do estudo, 23 completaram todo o protocolo, sendo 70% do sexo feminino (n=16) e 30% do sexo masculino (n=7). Os participantes apresentavam diferentes graus de obesidade: obesidade grau 1 (50%); obesidade grau 2 (27,3%) e obesidade grau 3 (22,7%). A idade dos voluntários variou de 48-60 anos, com uma média de 57 anos.

As principais alterações encontradas nos participantes deste estudo foram a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (71,42%) e a dislipidemia (67,86%). A respeito do uso de medicamentos, 67,85% estavam em uso de hipolipemiantes e 75% em uso de anti-hipertensivos. Durante o protocolo do estudo, não houve nenhuma mudança no tratamento medicamentoso proposto ou dieta alimentar.

Em relação ao histórico familiar dos participantes, as principais condições clínicas mencionadas foram: obesidade (57,14%); DM2 (60,71%); HAS (67,85%); dislipidemia (53,57%); infarto agudo do miocárdio (46,42%) e acidente vascular cerebral (28,57%).

Sobre o estilo de vida, 35,71% de voluntários referiram prática de atividade física e 42,85% apresentavam ingestão de bebida alcoólica socialmente. Já em relação ao hábito intestinal e o apetite, a maioria dos voluntários (n=24) referiu hábito intestinal normal e o restante se declarou constipado (n=5), o apetite foi considerado aumentado em quatro voluntários.

Os valores correspondentes ao consumo alimentar de calorias e nutrientes foram semelhantes em ambos os tratamentos, exceto em relação a ingestão de carboidratos que foi estatisticamente diferente no período basal e final do SLP, com uma ingestão mais elevada de carboidratos no período final do protocolo. Já o consumo de FA apresentou diferença significativa comparando o período final de cada intervenção (SLP final vs SLM final), correspondendo a um maior consumo de FA no SLP.

Em suma, a ingestão dos nutrientes pelos voluntários atendeu as recomendações dietéticas de consumo alimentar (Tabela 4), exceto em relação ao consumo de ácidos graxos saturados que ultrapassaram a recomendação para indivíduos com risco cardiovascular.

Os parâmetros antropométricos e bioquímicos antes e após as duas intervenções podem ser visualizados na Tabela 5. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos na composição corporal e nos biomarcadores metabólicos. Em relação ao IMC, os voluntários pertencentes ao grupo SLP apresentaram em média 36 kg/m² e o grupo SLM apresentou uma média de 35kg/m².

Os parâmetros metabólicos (glicemia e perfil lipídico) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando valores basais e finais foram comparados para cada intervenção, entretanto, foi possível observar uma redução modesta em tais parâmetros, sendo este um indicativo do efeito da ingestão dos sucos de laranja.

Os dados de pressão arterial podem ser observados na Tabela 6, a pressão arterial sistólica dos voluntários apresentou-se ligeiramente elevada ($>120\text{mmHg}$). Por outro lado, a pressão arterial diastólica estava dentro dos valores esperados, no entanto, os valores de referência para a pressão arterial usados na prática clínica sugerem considerar os valores de referência de forma individualizada dependendo do grau de hipertensão arterial dos voluntários (SBC, 2020). Os tratamentos com os SLP e SLM promoveram uma discreta redução na pressão arterial especialmente após a ingestão do SLM.

Tabela 4. Ingestão de calorias e nutrientes antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.

<i>Nutrientes</i>	<i>Intervenção:</i>		SLP		SLM		
	<i>Período:</i>	Basal	Final	Basal	Final	<i>p1*</i>	<i>p2**</i>
Energia (Kcal)		1401,19 ± 164,87	1678,68 ± 142,57	1175,96 ± 110,18	1399,76 ± 154,71	0,235	0,534
Macronutrientes							
CHO (g)		183,97 ± 25,16	251,51 ± 21,18	172,11 ± 17,45	185,23 ± 32,13	0,032	0,099
PTN (g)		63,07 ± 7,47	66,85 ± 7,14	47,62 ± 5,79	49,02 ± 12,43	0,999	1,000
LIP (g)		45,29 ± 6,55	40,78 ± 4,60	37,48 ± 6,52	33,95 ± 6,78	0,971	0,997
Ácidos graxos							
Saturados (g)		11,98 ± 1,81	11,71 ± 1,84	9,57 ± 2,13	9,05 ± 2,41	1,000	1,000
AGMI		12,25 ± 1,86	10,95 ± 1,60	10,13 ± 2,02	7,92 ± 1,94	0,913	0,892
AGPI		11,15 ± 2,60	5,71 ± 0,49	8,16 ± 2,50	3,59 ± 1,56	0,106	0,615
Colesterol (mg)		185,94 ± 21,70	252,48 ± 57,42	199,31 ± 47,71	130,45 ± 32,38	0,590	0,602
Fibras (g)		13,67 ± 2,78	13,21 ± 1,61 ^a	9,65 ± 1,78	5,92 ± 1,08 ^a	1,000	0,113

SLP: Suco de laranja Pera (n=25); SLM: Suco de laranja Moro (n=23); CHO: carboidratos; PTN: proteínas; LIP: lipídios; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poliinsaturados. ^aComparação entre o período final do SLP e SLM ($p < 0,05$); **p1*: comparação entre o período basal e final do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média e foram testados com as Equações de Estimativas Generalizadas (GEE).

Tabela 5. Parâmetros antropométricos e bioquímicos antes e após intervenção com os sucos de laranja Pera e Moro.

Variáveis	Intervenção:	SLP		SLM		p1*	p2**
	Período:	Basal	Final	Basal	Final		
Composição corporal							
Peso (kg)		94,20 ± 2,64	94,40 ± 2,67	93,50 ± 2,57	93,20 ± 2,67	0,987	0,784
IMC (kg/m²)		36,10 ± 1,01	36,15 ± 1,01	35,85 ± 0,97	35,71 ± 1,00	0,998	0,575
CA (cm)		114,48 ± 2,15	113,11 ± 1,66	114,84 ± 1,76	114,78 ± 1,82	0,951	1,000
Biomarcadores metabólicos (mg/dL)							
GJ		95,88 ± 2,49	94,86 ± 1,57	95,85 ± 1,86	97,06 ± 2,17	0,998	0,998
CT		179,21 ± 8,27	172,92 ± 6,35	186,04 ± 6,65	174,82 ± 6,07	0,747	0,287
LDL-c		101,18 ± 6,34	100,98 ± 6,27	106,89 ± 7,41	100,53 ± 5,79	1,000	0,751
HDL-c		45,30 ± 2,05	44,42 ± 1,87	46,16 ± 1,68	44,80 ± 2,11	0,913	0,926
VLDL-c		32,48 ± 2,60	27,49 ± 2,56	31,34 ± 3,07	31,67 ± 3,08	0,200	1,000
TG		157,77 ± 15,0	136,19 ± 16,2	191,32 ± 26,8	183,47 ± 26,4	0,373	0,999
Razão TG/HDL		4,03 ± 0,21	3,99 ± 0,21	4,17 ± 0,16	4,04 ± 0,27	0,999	0,995

SLP: Suco de laranja pera (n=25); SLM: Suco de laranja moro (n=23); IMC: Índice de Massa Corporal; CA: Circunferência abdominal; GJ: Glicemia de jejum; CT: Colesterol total; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; TG: Triglicérides; **p1*: comparação entre o período basal e inicial do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média e foram testados com as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

Tabela 6. Pressão arterial antes e após intervenção com suco de laranja Pera e Moro.

Pressão arterial (mmHg)	Intervenção:	SLP		SLM		<i>p1*</i>	<i>p2**</i>
	Período:	Basal	Final	Basal	Final		
PAS		126,56 ± 3,40	123,6 ± 3,07	133,75 ± 2,82	124,71 ± 3,09	0,954	0,088
PAD		79,41 ± 2,70	76,58 ± 2,86	80,02 ± 2,62	78,13 ± 2,41	0,683	0,661

SLP: Suco de laranja pera (n=25); SLM: Suco de laranja moro (n=23); PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica; **p1*: comparação entre o período basal e inicial do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média e foram testados com as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

6.3 Análise das citocinas e quimiocinas no plasma

Foram avaliadas as citocinas e quimiocinas no plasma (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 e IL-10). Os valores analisados de cada citocina de acordo com o tratamento (SLP ou SLM) e os períodos da intervenção estão dispostos na Tabela 7.

As citocinas IL-10, IL-8 e MCP-1 não sofreram alterações significativas após o tratamento com os SLP e SLM. Embora seja possível visualizar uma redução discreta de IL-8 e MCP-1 após ambas as intervenções. Já a citocina IL-10 apresentou um aumento sutil após os dois tratamentos.

As citocinas IL-6 e IL-1 β não apresentaram mudanças após a ingestão do SLP. Em contrapartida, estas citocinas reduziram após o consumo de SLM, assim como, o TNF- α .

Ao comparar estas citocinas no período final de cada tratamento (SLP final vs SLM final), as citocinas IL-6 (Figura 9) e o TNF- α (Figura 10) apresentaram menores concentrações após a ingestão com o SLM.

Tabela 7. Citocinas e quimiocinas no plasma antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.

Variáveis (log10 pg/mL)	SLP		SLM		<i>p1*</i>	<i>p2**</i>
	Basal	Final	Basal	Final		
IL-6	0,60 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,06	1,000	0,010
IL-10	1,06 $\pm$ 0,12	1,39 $\pm$ 0,27	1,30 $\pm$ 0,27	1,39 $\pm$ 0,17	0,772	0,997
TNF- α	1,88 $\pm$ 0,07	2,16 $\pm$ 0,07	2,07 $\pm$ 0,06	1,83 $\pm$ 0,10	0,124	0,048
IL-8	2,80 $\pm$ 0,05	2,74 $\pm$ 0,05	2,83 $\pm$ 0,04	2,75 $\pm$ 0,05	0,757	0,226
IL-1 β	2,14 $\pm$ 0,07	2,15 $\pm$ 0,11	2,25 $\pm$ 0,08	1,87 $\pm$ 0,16	1,000	0,010
MCP-1	3,55 $\pm$ 0,09	3,49 $\pm$ 0,05	3,67 $\pm$ 0,09	3,53 $\pm$ 0,05	1,000	0,410

SLP: Suco de laranja Pera (n=18); SLM: Suco de laranja Moro (n=16); IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; IL-8: Interleucina-8; IL-1 β : Interleucina-1 beta; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; **p1*: comparação entre o período basal e inicial do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média $\pm$ erro padrão da média e foram testados com as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

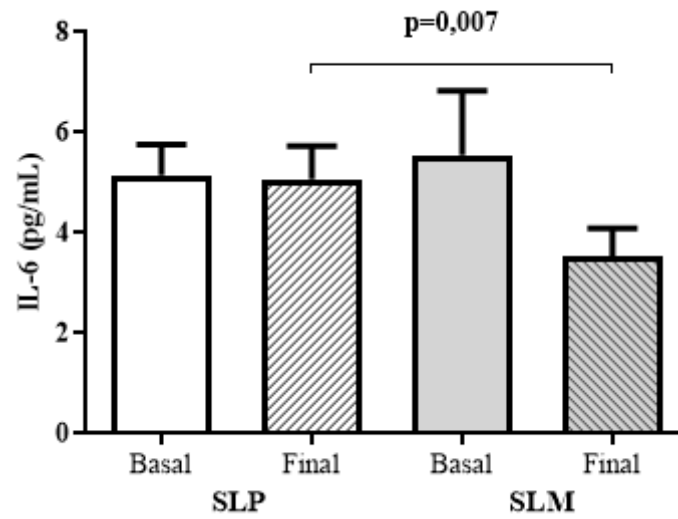


Figura 9. Concentração da citocina IL-6 no plasma antes e após a ingestão dos sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM). Valores expressos em média e erro padrão da média e foram testados pelas Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

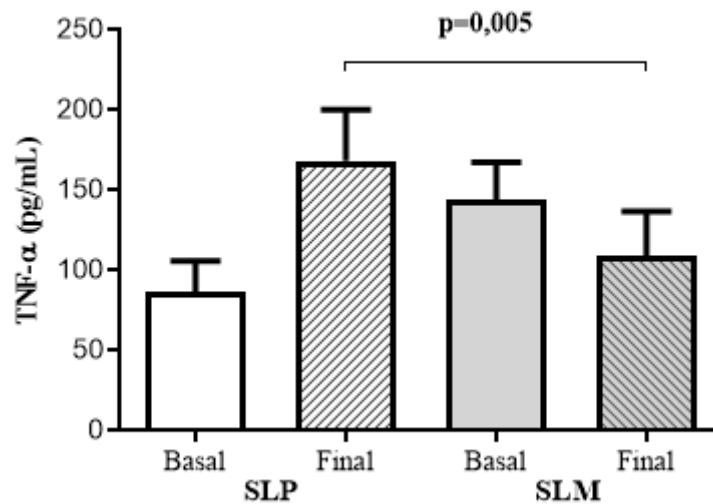


Figura 10. Concentração da citocina TNF-α no plasma antes e após a ingestão dos sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM). Valores expressos em média e erro padrão da média e foram testados pelas Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

6.4 Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de monócitos

As citocinas e quimiocinas (MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-1 β) foram avaliadas no sobrenadante de monócitos dos voluntários. Estas células foram avaliadas após o estímulo por LPS após a incubação por 48hs. Na Figura 11 estão expressos os dados correspondentes aos dois tratamentos.

Não houve diferença estatística na produção da quimiocina MCP-1 e nas citocinas IL-10 e IL-1 β em monócitos após o estímulo com o LPS. Mas, comparando o período final de cada tratamento (SLP final vs SLM final), notamos menores concentrações de TNF- α e de IL-6 nos voluntários que receberam o tratamento com o SLM.

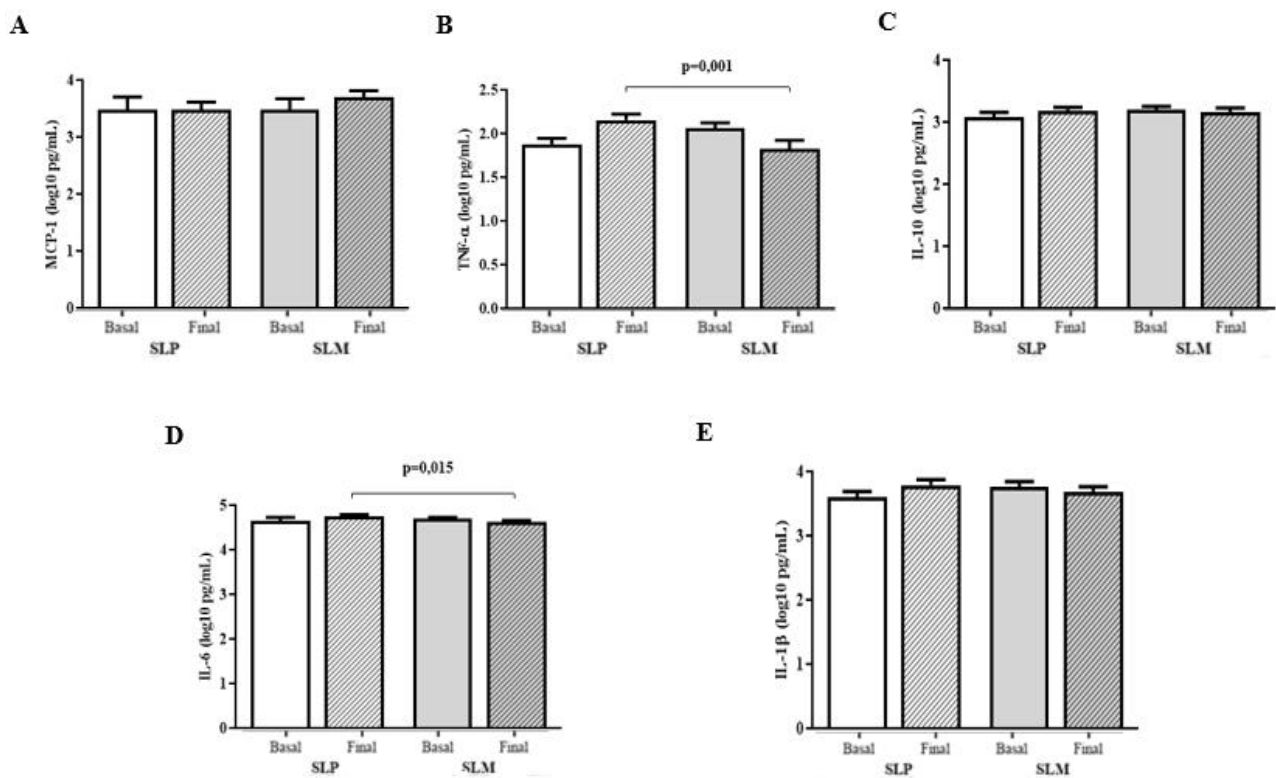


Figura 11. Citocinas e quimiocina no sobrenadante de monócitos cultivados com LPS antes e após os sucos de laranja Pera e Moro. (A) MCP-1; (B) TNF- α ; (C) IL-10; (D) IL-6 e (E) IL-1 β . Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; IL-10: Interleucina-10; IL-6: Interleucina-6; IL-1 β : Interleucina-1 beta.

6.5 Metabólitos de flavonoides na urina

As concentrações de hesperitina, naringenina e de ácidos fenólicos foram quantificadas nas amostras de urina dos voluntários no período inicial e final das duas intervenções.

A naringenina (metabólitos de fase II) e os ácidos fenólicos presentes na urina dos voluntários aumentaram após a intervenção com o SLP e SLM (Tabela 8). Já a hesperitina também apresentou aumento após as duas intervenções, no entanto, somente após o consumo de SLM de forma significativa.

Os metabólitos de hesperitina identificados na urina foram: hesperetina-3-glicuronídeo, hesperetina-7-glicuronídeo, hesperetina_sulf-glicuronídeo, hesperetina-diglicuronídeo isômero III, hesperetina-diglicuronídeo isômero II. Os metabólitos de naringenina identificados na urina foram: naringenina-7-glicuronídeo, naringenina-3-glicuronídeo, naringenina-diglicuronídeo, naringenina-diglicuronídeo isômero II. Três ácidos fenólicos também foram identificados na urina dos voluntários, foram eles: ácido hipúrico, ácido metilhipúrico e ácido protocatecuico, este último não foi quantificado.

A quantidade de metabólitos excretados apresentou uma grande variabilidade entre os voluntários no período basal e final de ambos os sucos, os resultados do SLP estão dispostos na Figura 12 e os dados do suco de SLM na Figura 13.

Tabela 8. Excreção de metabólitos na urina antes e após os sucos de laranja Pera e Moro.

Metabólitos	Intervenção:		SLP		SLM		
	Período:		Basal	Final	Basal	Final	<i>p1*</i> <i>p2**</i>
Creatinina			136,01± 23,29	113,68 ± 12,35	130,82 ± 14,46	120,42 ± 14,82	0,733 0,354
Naringenina			0,11 ± 0,03	0,47 ± 0,14	0,35 ± 0,09	0,71 ± 0,19	0,021 0,013
Hesperitina			0,26 ± 0,17	0,64 ± 0,22	0,72 ± 0,26	1,46 ± 0,49	0,110 0,028
Ácidos fenólicos			32,3 ± 13,17	72,3 ± 19,34	37,17 ± 6,39	77,15 ± 19,83	0,043 0,028

SLP: Suco de laranja Pera; SLM: Suco de laranja Moro; AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; **p1*: comparação entre o período basal e inicial do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média e foram testados com as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

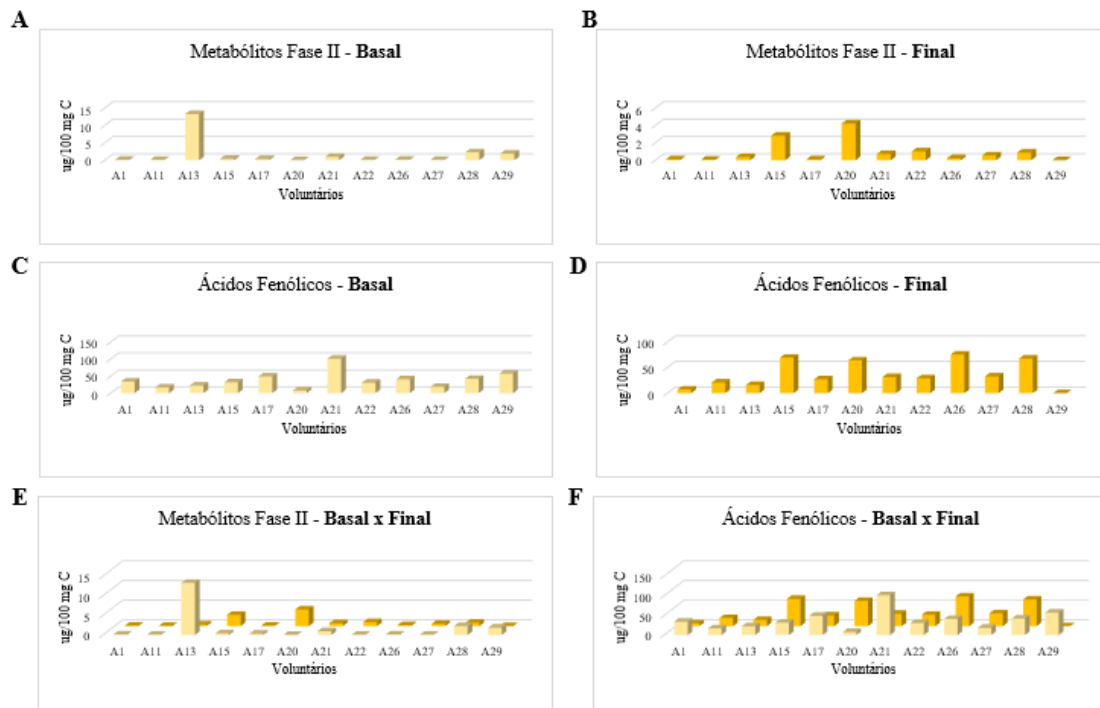


Figura 12. Excreção de metabólitos de flavonoides no suco de laranja Pera (n=12). A) Metabólitos de fase II (basal); B) Metabólitos de fase II (final); C) Ácidos fenólicos (basal); D) Ácidos fenólicos (final); E) Metabólitos de fase II (basal x final); F) Ácidos fenólicos (basal x final).

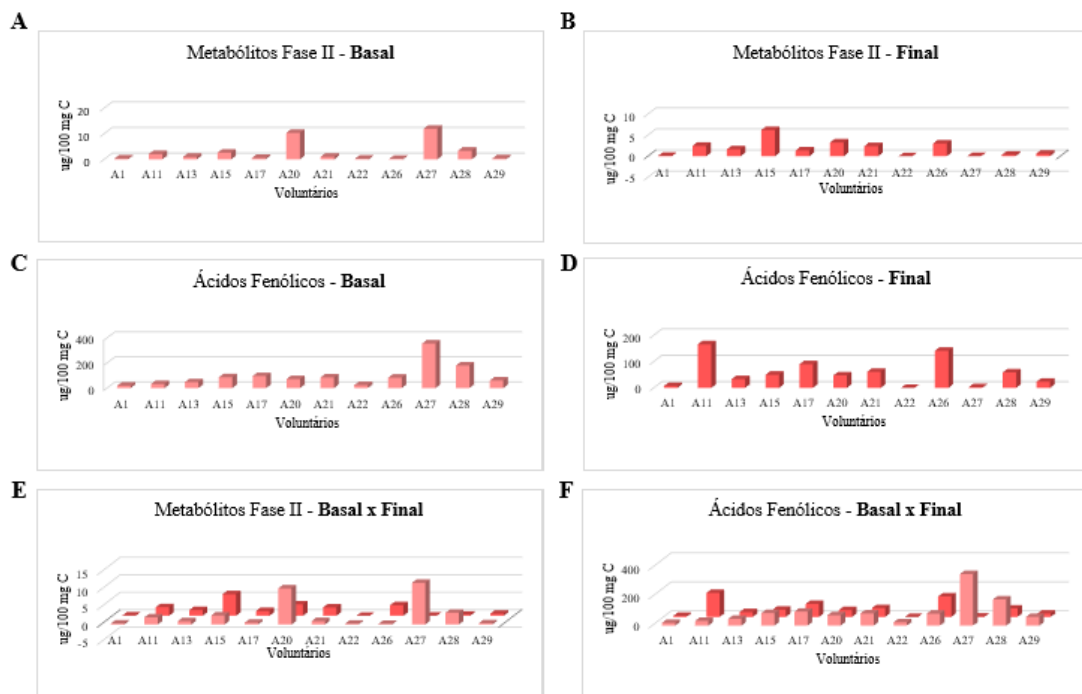


Figura 13. Excreção de metabólitos de flavonoides no suco de laranja Moro (n=12). A) Metabólitos de fase II (basal); B) Metabólitos de fase II (final); C) Ácidos fenólicos (basal); D) Ácidos fenólicos (final); E) Metabólitos de fase II (basal x final); F) Ácidos fenólicos (basal x final).

6.6 Avaliação de marcadores de permeabilidade intestinal

A zonulina plasmática é um biomarcador utilizado para avaliar a permeabilidade intestinal. Esta proteína compõem as proteínas chamadas de junções firmes nos enterócitos relacionadas à manutenção da permeabilidade intestinal através da regulação da passagem de moléculas do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. O tratamento com a suplementação de SLP promoveu uma redução significativa da zonulina plasmática de 23,00ng/mL para 19,90ng/mL. Por outro lado, o SLM não apresentou este efeito (Figura 14).

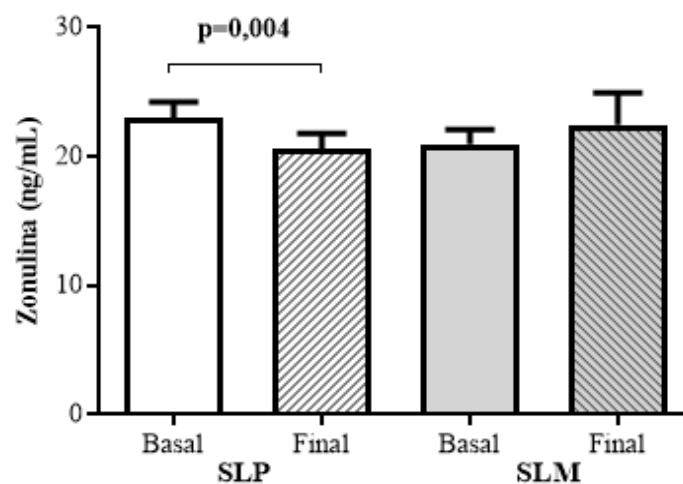


Figura 14. Concentração de zonulina no plasma antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera (n=16); SLM: suco de laranja Moro (n=14).

Além da avaliação da zonulina plasmática é possível avaliar outros biomarcadores relacionados a permeabilidade intestinal como as endotoxinas (LPS). O LPS compõe a parede das bactérias gram-negativas, quando ocorre um aumento da permeabilidade intestinal, o LPS transloca para a circulação, quadro conhecido como endotoxemia metabólica. Em ambos os tratamentos, não houve alteração no LPS plasmático significativamente (Figura 15), embora seja possível observar uma redução do LPS após as duas intervenções.

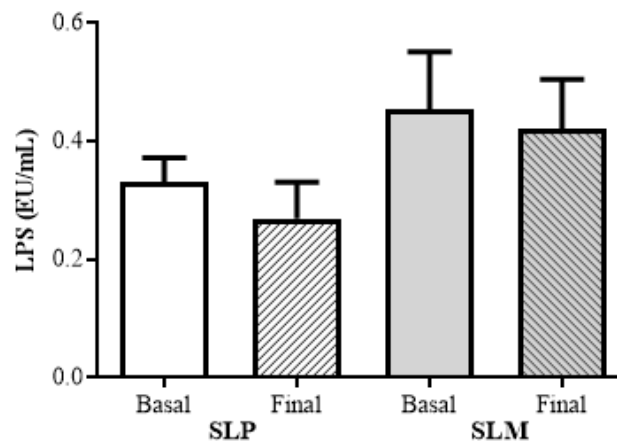


Figura 15. Concentração de LPS no plasma antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro. Valores expressos em média e erro padrão da média. LPS: lipopolissacarídeos; SLP: suco de laranja Pera (n=15); SLM: suco de laranja Moro (n=15).

6.7 Análise das diversidades (alfa e beta diversidade)

6.7.1 Alfa-diversidade segundo os Índices de Shannon, Chao1 e Simpson

A composição de microrganismos foi avaliada através de diferentes índices de diversidade (Shannon, Chao1 e Simpson). O índice Shannon avalia quais e quantos microrganismos estão presentes nas amostras avaliadas, o resultado corresponde ao intervalo de 1,5 - 3,5 dependendo da amostra. O índice de riqueza Chao1 avalia a riqueza da amostra (quantidade de gêneros ou espécies identificados). Já o índice Simpson avalia a dominância, quando o seu resultado se aproxima a zero indica maior riqueza (LIMA, M.; DOS SANTOS SOUZA; PEDERASSI, 2016). Os resultados destes índices de alfa-diversidade podem ser observados na Figura 16. Embora, os índices de alfa-diversidade não tenham sido estatisticamente diferentes, o índice Shannon apresentaram um ligeiro aumento após as duas intervenções. Por outro lado, o índice Chao1 e Simpson foram bastante semelhantes entre os grupos.

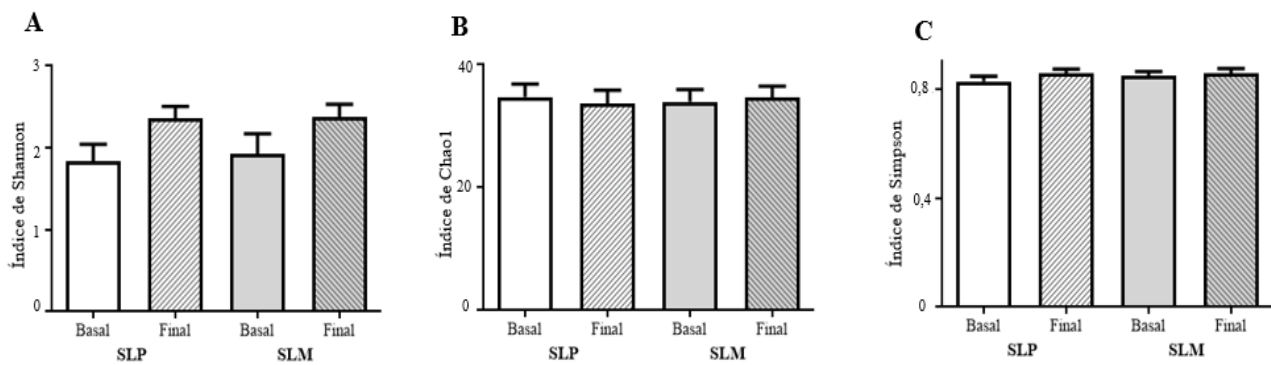


Figura 16. Alfa-diversidade nas amostras fecais antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro de acordo com os índices de diversidade: A) Shannon; B) Chao1 e C) Simpson; SLP: suco de laranja Pera (n=19); SLM: suco de laranja Moro (n=17).

6.7.2 Beta-diversidade

Para avaliar as similaridades e dissimilaridades na composição da microbiota intestinal e o efeito das intervenções com SLP e SLM foram aplicadas as matrizes da beta-diversidade para a construção do gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) que demonstra como cada voluntário se comporta em relação à composição da microbiota intestinal. Para isto, utilizamos o índice de Bray-Curtis e Jaccard. O índice Bray Curtis é um método que expressa a proporção de similaridade e dissimilaridade (distância) da abundância de bactérias. Já o índice Jaccard expressa a proporção de bactérias compartilhadas entre as amostras de acordo com o número total de bactérias.

A avaliação da beta diversidade através dos índices Bray-Curtis e Jaccard estão apresentadas na Figura 17. Não houve diferença estatística no índice Bray-Curtis e no índice Jaccard comparando o SLP e SLM nos diferentes períodos do estudo. Ainda, não foi observado nenhum agrupamento relacionado aos grupos de tratamento.

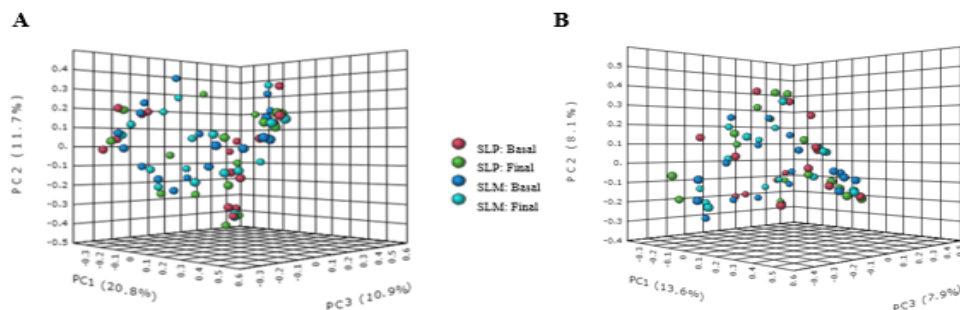


Figura 17. Beta-diversidade entre os sucos de laranja Pera e Moro e os diferentes períodos do estudo. PCoA construído a partir dos índices de similaridades de Bray-Curtis (A) e Jaccard (B). Cada ponto colorido no gráfico reflete as amostras de cada grupo. Os eixos 1, 2 e 3 representam o percentual de dados que são explicados por cada coordenada. SLP: suco de laranja Pera (n=19); SLM: Suco de laranja Moro (n=17).

6.8 Efeito das intervenções sobre a microbiota intestinal

6.8.1 Composição da microbiota intestinal nos níveis taxonômicos filo e gênero

Para a avaliação da abundância relativa das bactérias foi utilizado um corte de 2% para a seleção dos principais filos e gêneros nas amostras de fezes.

Foram encontrados 8 filos (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* e *Verrucomicrobia*), sendo os mais abundantes em ordem decrescente: *Firmicutes* (85,93%), *Actinobacteria* (6,25%), *Bacteroidetes* (5,98%), *Proteobacteria* (0,85%), *Verrucomicrobia* (0,36%), *Tenericutes* (0,36%), *Euryarchaeota* (0,27%) e *Cyanobacteria* (0,02%). Destes, apenas os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* estavam presentes em todos os voluntários. De todos os voluntários avaliados, os seguintes filos não estavam presentes em todos os voluntários: *Cyanobacteria* (13 voluntários), *Euryarchaeota* e *Tenericutes* (17 voluntários) e *Verrucomicrobia* (15 voluntários).

Os dois filos mais abundantes no SLP e SLM foram: *Firmicutes* e *Actinobacteria*. No período basal do SLP, a somatória da abundância relativa destes dois filos correspondeu a 94,85% e no período final 92,98% da microbiota intestinal dos voluntários. Já no período basal do SLM, a abundância foi de 91,76% e no período final de 91,22%. Em ambos os grupos, a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* foi maior no período basal comparado ao período final de cada intervenção (SLP: 73,25 vs 32,98; SLM: 43,65 vs 37,61). Os filos mais abundantes encontrados no período basal e final do SLP e SLM estão apresentados na Tabela 9.

A abundância dos filos e dos principais gêneros podem ser visualizadas na Figura 18 e na Figura 19.

Tabela 9. Abundância relativa (%) no nível taxonômico filo antes e após os sucos de laranja Pera e Moro

OTUs	Intervençã	SLP		SLM			
Filos	o: Período:	Basal	Final	Basal	Final	$p1^*$	$p2^{**}$
<i>Actinobacteria</i>		7,28 ± 1,46	6,62 ± 1,50	7,41 ± 1,57	7,67 ± 1,53	0,983	1,000
<i>Bacteroidetes</i>		3,55 ± 0,93	4,49 ± 1,03	6,17 ± 1,87	6,27 ± 1,39	0,964	1,000
<i>Firmicutes</i>		87,57 ± 1,65	86,36 ± 1,70	84,35 ± 2,16	83,55 ± 1,89	0,869	0,998
<i>Proteobacteria</i>		0,45 ± 0,08	1,56 ± 0,57	1,20 ± 0,38	0,49 ± 0,26	0,227	0,651
<i>Verrucomicrobia</i>		0,43 ± 0,15	0,49 ± 0,19	0,28 ± 0,13	0,59 ± 0,23	0,999	0,159

Outros	0,60 ± 0,30	0,46 ± 0,12	0,72 ± 0,17	0,62 ± 0,14	0,997	0,993
Razão F/B	73,25 ± 21,44	32,98 ± 6,74	43,65 ± 18,70	37,61 ± 15,28	0,209	0,999

SLP: suco de laranja Pera (n=18); SLM: suco de laranja Moro (n=16); OTUs: unidades operacionais taxonômicas (filos); F/B: *Firmicutes/Bacteroidetes*; Outros: somatória dos filos menos abundantes; *p1: comparação entre o período basal e inicial do SLP; **p2: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média e testados com as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

Em relação ao nível taxonômico correspondente ao gênero (Tabela 10), os mais abundantes foram: *Agathobacter* (10,95%), *Subdoligranulum* (7,25%), *Faecalibacterium* (6,89%), *Ruminococcus_2* (6,25%), *Blautia* (6,09%), *Bacteroides* (3,62%), *Holdemanella* (3,51%), *Bifidobacterium* (3,37%), *Christensenellaceae_R-7_group* (3,15%), *[Eubacterium]_coprostanoligenes_group* (2,59%), *Catenibacterium* (2,42%), *Dorea* (2,22%), *Ruminococcaceae_UCG-002* (2,21%), *Streptococcus* (2,07%), *Fusicatenibacter* (1,87%), *Collinsella* (1,85%), *Roseburia* (1,68%), *Ruminococcaceae_UCG-014* (1,58%), *Dialister* (1,56%), *Ruminococcus_1* (1,34%), *Erysipelotrichaceae_UCG-003* (1,34%), *Coprococcus_3* (1,21%), *Ruminococcaceae_UCG-005* (1,13%), *[Ruminococcus]_torques_group* (1,09%), *Coprococcus_2* (1,06%), *Ruminococcaceae_UCG-013* (1,02%), *Butyricicoccus* (0,87%), *Ruminococcaceae_NK4A214_group* (0,87%), *[Ruminococcus]_gauvreauii_group* (0,77%), *Lachnospiraceae_NK4A136_group* (0,76%).

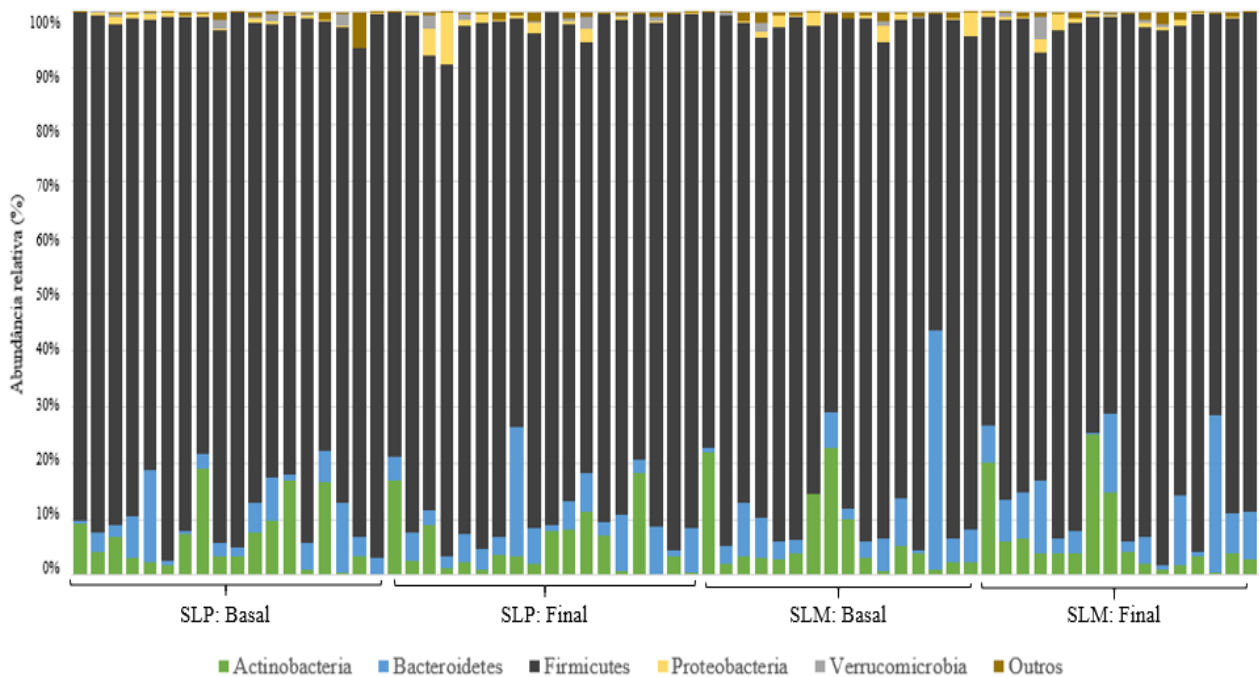


Figura 18. Histograma da composição da microbiota intestinal no nível taxonômico filo.

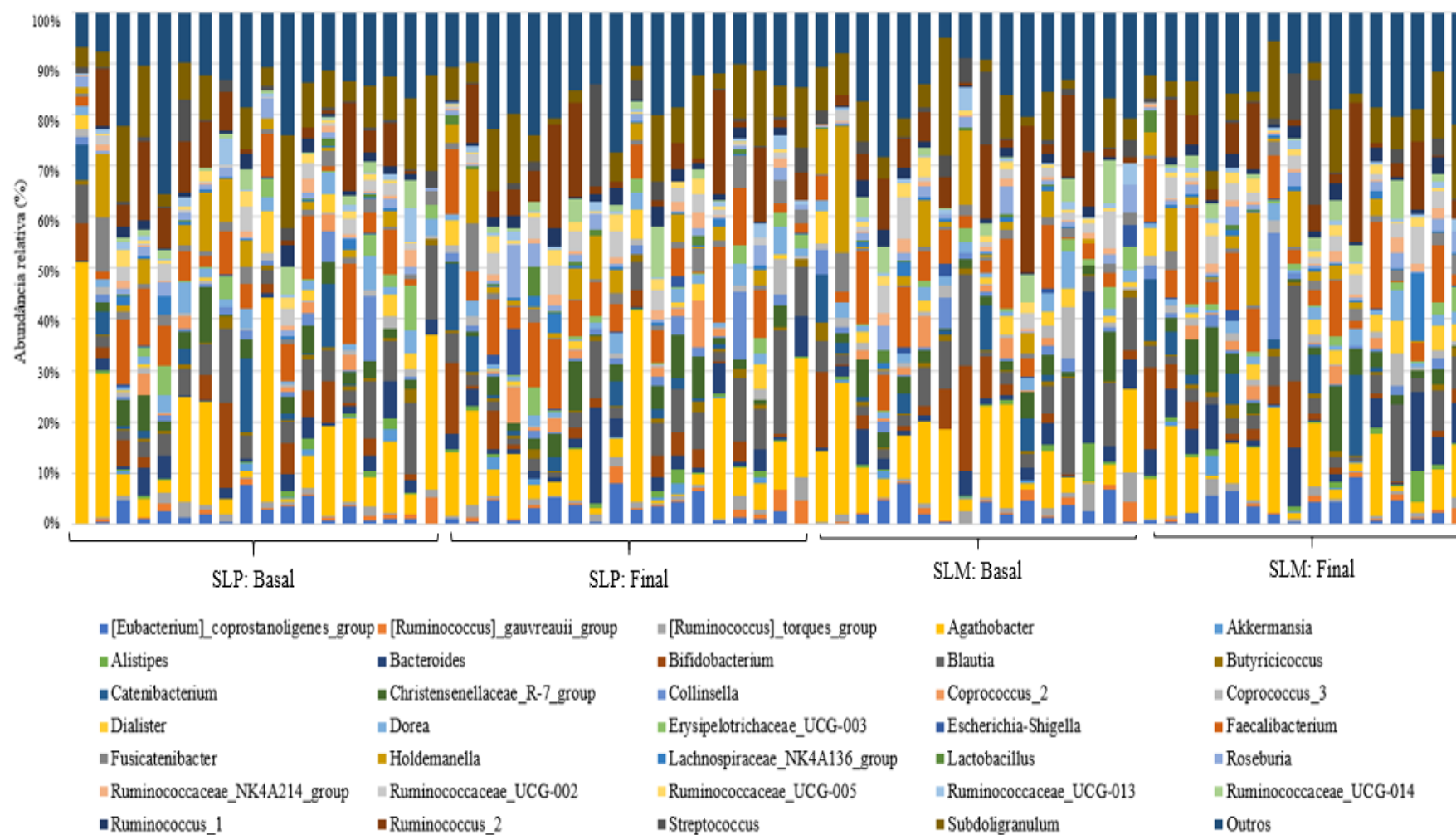


Figura 19. Histograma da composição da microbiota intestinal no nível taxonômico gênero.

Tabela 10. Abundância relativa (%) dos gêneros mais abundantes antes e após os sucos de laranja Pera e Moro.

OTUs Gêneros	SLP		SLM		<i>p1*</i>	<i>p2**</i>
	Basal	Final	Basal	Final		
<i>Akkermansia</i>	0,43 ± 0,15	0,49 ± 0,19	0,28 ± 0,13	0,59 ± 0,23	0,999	0,158
<i>Agathobacter</i>	14,71 ± 3,28	10,55 ± 2,40	11,51 ± 2,27	8,14 ± 2,06	0,336	0,608
<i>Subdoligranulum</i>	9,22 ± 1,15	8,00 ± 1,04	6,49 ± 1,27	6,81 ± 1,03	0,729	1,000
<i>Faecalibacterium</i>	5,97 ± 1,02	7,59 ± 0,83	6,28 ± 1,19	7,83 ± 1,49	0,484	0,292
<i>Ruminococcus_2</i>	5,49 ± 1,27	5,27 ± 1,55	7,75 ± 2,12	7,84 ± 1,79	1,000	1,000
<i>Blautia</i>	7,02 ± 1,07	6,68 ± 1,24	5,97 ± 1,21	5,17 ± 1,27	0,991	0,710
<i>Bacteroides</i>	1,81 ± 0,49	2,64 ± 0,81	3,79 ± 1,32	3,82 ± 0,90	0,906	1,000
<i>Holdemanella</i>	3,12 ± 0,90	2,81 ± 0,71	4,62 ± 1,95	3,00 ± 1,11	0,993	0,857
<i>Bifidobacterium</i>	3,96 ± 0,93	3,17 ± 0,86	4,50 ± 1,16	5,13 ± 1,12	0,902	0,989
<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	3,57 ± 0,72	3,46 ± 0,88	3,28 ± 0,79	4,59 ± 1,13	1,000	0,809
<i>[Eubacterium]_coprostanoligenes_group</i>	2,58 ± 0,48	3,06 ± 0,52	2,64 ± 0,50	3,32 ± 0,69	0,617	0,759
<i>Catenibacterium</i>	2,58 ± 0,94	1,88 ± 0,76	1,61 ± 0,75	2,90 ± 1,07	0,973	0,546
<i>Dorea</i>	2,90 ± 0,39	2,27 ± 0,34	2,37 ± 0,42	1,97 ± 0,36	0,151	0,822
<i>Ruminococcaceae_UCG-002</i>	1,75 ± 0,34	2,21 ± 0,42	2,34 ± 0,49	2,94 ± 0,46	0,664	0,716
<i>Streptococcus</i>	1,27 ± 0,38	3,18 ± 1,48	1,33 ± 0,57	1,71 ± 0,99	0,698	0,996
<i>Fusicatenibacter</i>	2,15 ± 0,57	2,27 ± 0,56	1,46 ± 0,38	1,31 ± 0,38	0,998	1,00

OTUs	SLP		SLM		<i>p1*</i>	<i>p2**</i>
Gêneros	Basal	Final	Basal	Final		
<i>Collinsella</i>	2,70 ± 1,09	2,49 ± 0,88	1,84 ± 0,64	2,42 ± 1,03	0,994	0,887
<i>Roseburia</i>	1,39 ± 0,23	1,97 ± 0,69	1,27 ± 0,32	2,37 ± 0,63	0,936	0,610
<i>Ruminococcaceae_UCG-014</i>	1,34 ± 0,36	1,82 ± 0,65	2,13 ± 0,57	2,05 ± 0,51	0,929	1,000
<i>Dialister</i>	1,60 ± 0,52	1,31 ± 0,42	1,62 ± 0,45	2,13 ± 0,53	0,758	0,176
<i>Ruminococcus_1</i>	1,39 ± 0,25	1,55 ± 0,32	1,16 ± 0,30	1,41 ± 0,34	0,945	0,983
<i>Erysipelotrichaceae_UCG-003</i>	1,66 ± 0,49	1,11 ± 0,32	0,75 ± 0,31	0,36 ± 0,37	0,398	0,806
<i>Coprococcus_3</i>	0,85 ± 0,16	0,97 ± 0,42	1,57 ± 0,53	1,44 ± 0,39	1,000	0,983
<i>Ruminococcaceae_UCG-005</i>	1,05 ± 0,22	1,20 ± 0,27	1,17 ± 0,24	1,40 ± 0,20	0,951	0,328
<i>[Ruminococcus]_torques_group</i>	0,98 ± 0,19	1,07 ± 0,23	1,11 ± 0,33	0,72 ± 0,18	0,999	0,799
<i>Coprococcus_2</i>	1,02 ± 0,35	1,53 ± 0,61	1,21 ± 0,57	1,22 ± 0,47	0,538	1,000
<i>Ruminococcaceae_UCG-013</i>	1,06 ± 0,34	0,84 ± 0,18	0,92 ± 0,26	0,69 ± 0,25	0,942	0,989
<i>Butyricicoccus</i>	0,79 ± 0,14	0,92 ± 0,11	0,66 ± 0,18	0,60 ± 0,20	0,979	1,000
<i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	1,07 ± 0,25	0,99 ± 0,20	1,05 ± 0,21	1,08 ± 0,22	0,998	1,000
<i>[Ruminococcus]_gavreui_group</i>	0,69 ± 0,21	0,99 ± 0,31	0,52 ± 0,20	0,42 ± 0,14	0,703	0,983
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	0,70 ± 0,20	0,55 ± 0,18	0,41 ± 0,13	0,99 ± 0,58	0,979	0,934

SLP: suco de laranja Pera (n=18); SLM: suco de laranja Moro (n=16); OTUs: unidades operacionais taxonômicas (gênero); **p1*: comparação entre o período basal final do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média e testados com as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE).

Destes gêneros analisados, a abundância do gênero *Bifidobacterium* apresentou diferença significativa comparando o período final de cada tratamento com o SLM contribuindo com a maior abundância deste gênero bacteriano (Figura 20).

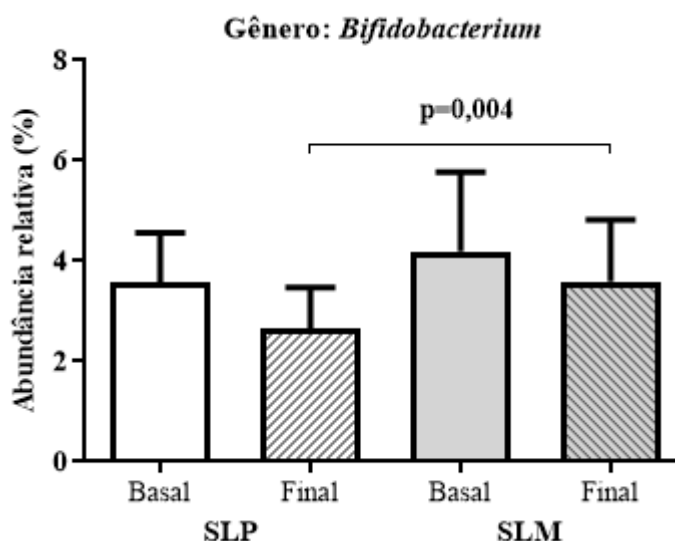


Figura 20. Abundância relativa do gênero *Bifidobacterium* antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera (n=18); SLM: suco de laranja Moro (n=16).

6.9 Correlações com a microbiota intestinal

Analizamos a correlação dos gêneros bacterianos com todos os parâmetros analisados no presente estudo. Os gêneros bacterianos *Dorea*, *Fusicatenibacter* e *Ruminococcus* apresentaram correlação positiva com os mesmos parâmetros incluindo a composição corporal (peso, circunferência abdominal e IMC), pressão arterial, perfil lipídico (CT, LDL-c, HDL-c) e glicemia.

O gênero *Dorea* apresentou correlação positiva moderada com os dados de composição corporal como peso (0,61), circunferência abdominal (0,64) e IMC (0,64). Ainda, houve correlação positiva com a pressão arterial (0,65), colesterol total (0,63), LDL-c (0,57), HDL-c (0,63) e glicemia (0,64). O gênero *Fusicatenibacter* correlacionou-se com o peso corporal (0,61), circunferência abdominal (0,63), IMC (0,60), pressão arterial sistólica (0,63) e diastólica (0,64), colesterol total (0,60), LDL-c (0,54), HDL-c (0,62) e glicemia (0,57). Ainda, o gênero *Ruminococcus* foi correlacionado positivamente com o peso corporal (0,64), circunferência abdominal (0,63), IMC

(0,59), pressão arterial sistólica (0,60) e diastólica (0,57), colesterol total (0,68), LDL-c (0,68), HDL-c (0,63) e glicemia (0,65).

Em relação aos metabólitos de flavanonas e antocianinas na urina encontramos correlação moderada negativa com os gêneros *Christensenellaceae* (-0,51), *Ruminococcus* (-0,54) e *Faecalibacterium* (-0,56).

6.10 Análise multivariada

A análise multivariada PLS-DA demonstrou possível tendência de agrupamento dos voluntários de acordo com grau de obesidade no tratamento como o SLP (Figura 21) e SLM (Figura 22), o que nos levou a descrever as respostas da microbiota intestinal frente aos tratamentos com os sucos de laranja de acordo o grau de obesidade dos voluntários. Embora a análise de agrupamento do PLS-DA aponte para separação dos voluntários pelo IMC, observamos que esta não foi a única variável relacionada ao agrupamento dos voluntários.

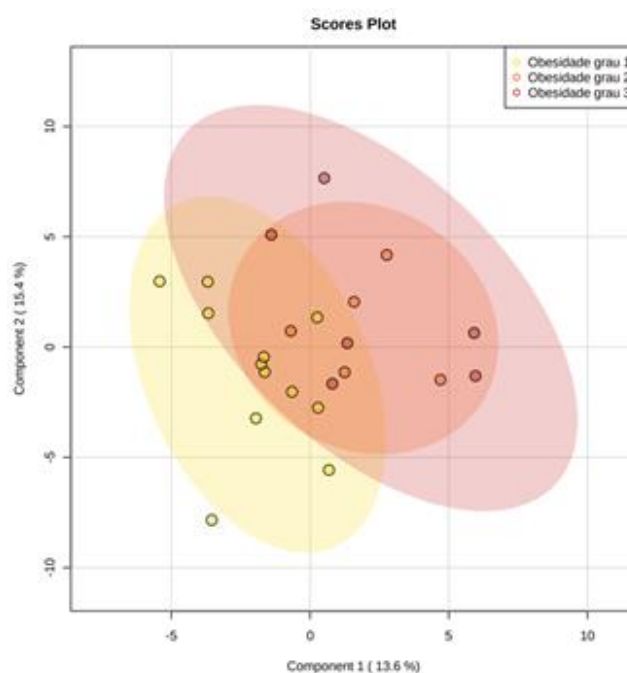


Figura 21. Projeção dos participantes na análise PLS-DA de dois componentes no grupo SLP. Os círculos amarelos correspondem aos voluntários com obesidade grau I, os círculos laranjas identificam os voluntários com obesidade grau II e os círculos vermelhos indivíduos com obesidade grau III.

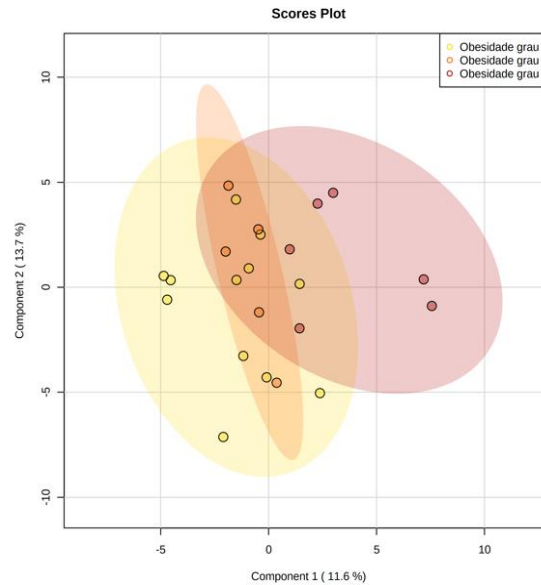


Figura 22. Projeção dos participantes na análise PLS-DA de dois componentes no grupo SLM. Os círculos amarelos correspondem aos voluntários com obesidade grau I, os círculos laranjas identificam os voluntários com obesidade grau II e os círculos vermelhos indivíduos com obesidade grau III.

Na análise das variáveis mais influentes no PLS-DA observamos que os parâmetros inflamatórios (IL-1, TNF- α , IL-6) apresentaram maior impacto no agrupamento das amostras no grupo SLP (Figura 23). Já no grupo tratado com o SLM (Figura 24), as variáveis de agrupamento foram o TNF- α , pressão arterial diastólica, MCP-1 e IL-8 indicando a influência dos tratamentos especialmente nos mediadores inflamatórios.

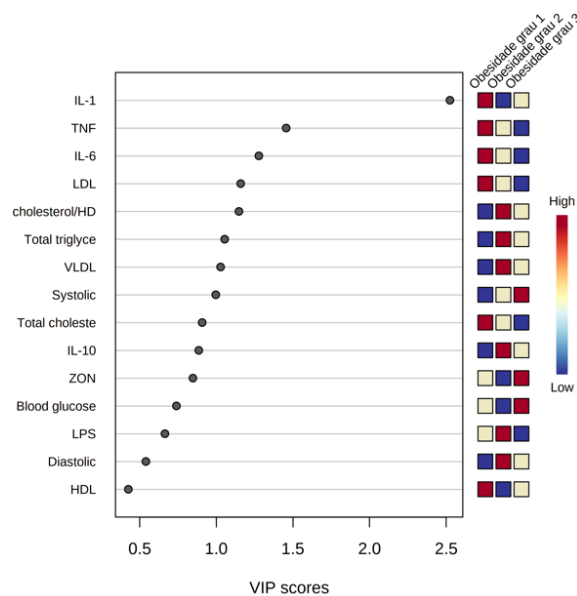


Figura 23. Gráfico de variáveis do grupo SLP para a construção do modelo PLS-DA.

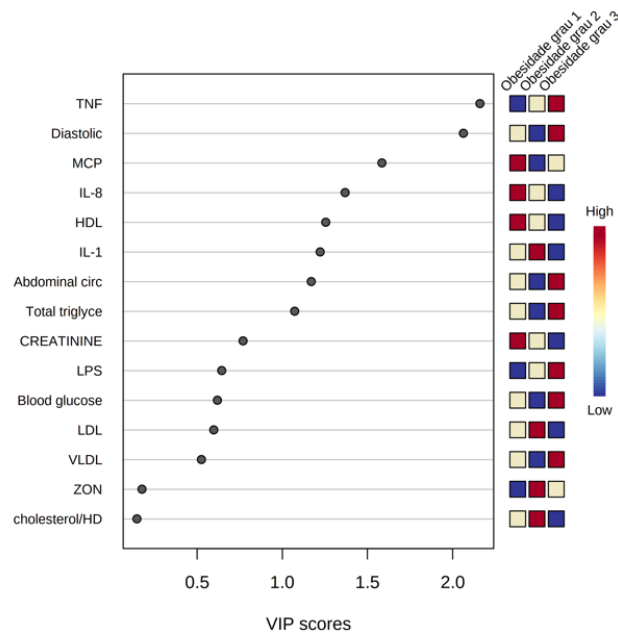


Figura 24. Gráfico de variáveis do grupo SLM para a construção do modelo PLS-DA.

6.11 Efeito das intervenções na microbiota intestinal nos diferentes graus de obesidade

Para aprofundar a avaliação sobre a microbiota intestinal considerando que os voluntários apresentavam diferentes graus de obesidade, optamos por realizar a análise da abundância relativa do filo e gênero de acordo com o grau de obesidade e os períodos de cada tratamento. Para isto, analisamos os mesmos filios e gêneros da avaliação inicial sobre a microbiota intestinal.

6.11.1 Abundância relativa no nível taxonômico filo e gênero

As figuras 25 a 28 demonstram a abundância relativa dos gêneros *Akkermansia*, *Alistipes*, *Bacteroides*, *Catenibacterium* e o filo *Bacteroidetes* separados por grau de obesidade e os tratamentos com o SLP e SLM.

Em relação a intervenção, o consumo de SLM nos voluntários com obesidade grau 3 promoveu um aumento discreto de *Akkermansia* (Figura 25) e maior abundância de *Alistipes* (Figura 26), *Bacteroides* (Figura 27) e *Catenibacterium* (Figura 28) comparado ao período basal do SLM. Na análise dos filios observou-se apenas maior abundância relativa do filo *Bacteroidetes* (Figura 29) após o tratamento com o SLM nos voluntários com obesidade grau 3 comparado ao período basal do

SLM que corresponde ao gênero *Bacteroides* mencionado anteriormente. Ao analisar a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* de acordo com o grau de obesidade observamos aumento linear desta razão nos voluntários com obesidade grau 1, 2 e 3 e redução nesta razão após os dois tratamentos com o SLP e SLM (Figura 30).

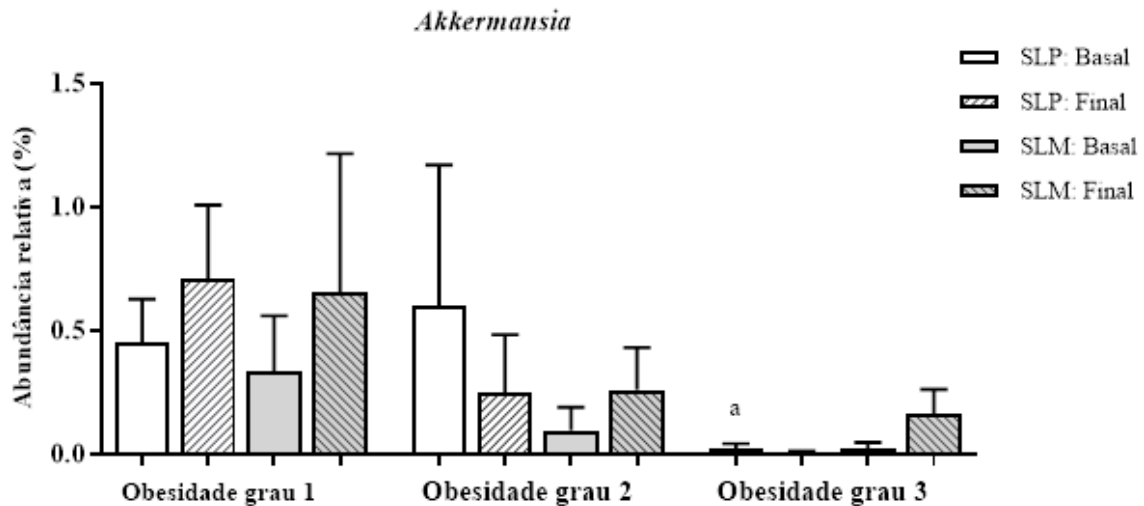


Figura 25. Abundância relativa do gênero *Akkermansia* antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro; ^aComparação entre obesidade grau 1 e obesidade grau 3 no período basal do SLP ($p < 0,05$).

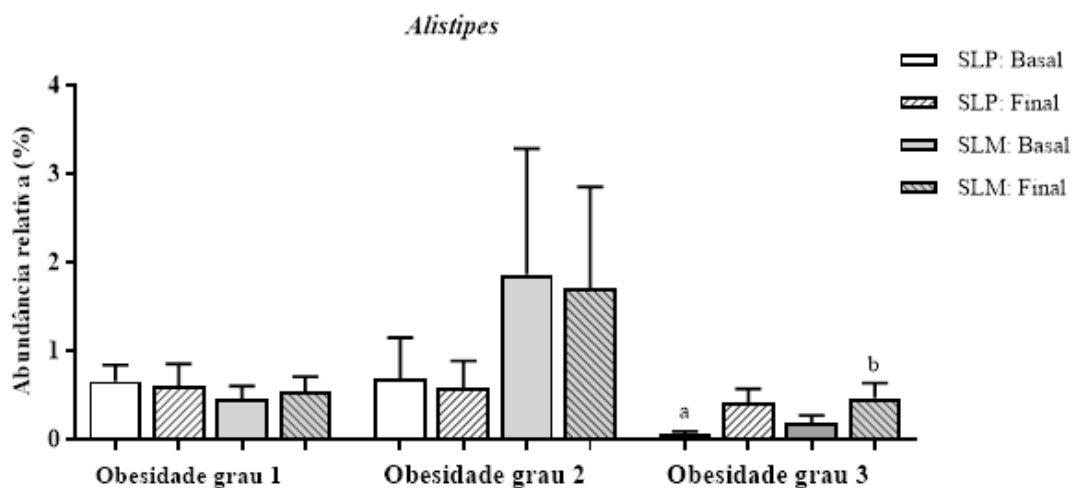


Figura 26. Abundância relativa do gênero *Alistipes* antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro; ^aComparação entre obesidade grau 1 e obesidade grau 3 no período basal do SLP ($p < 0,050$); ^bComparação entre o período basal e final do SLM (obesidade grau 3), $p < 0,050$.

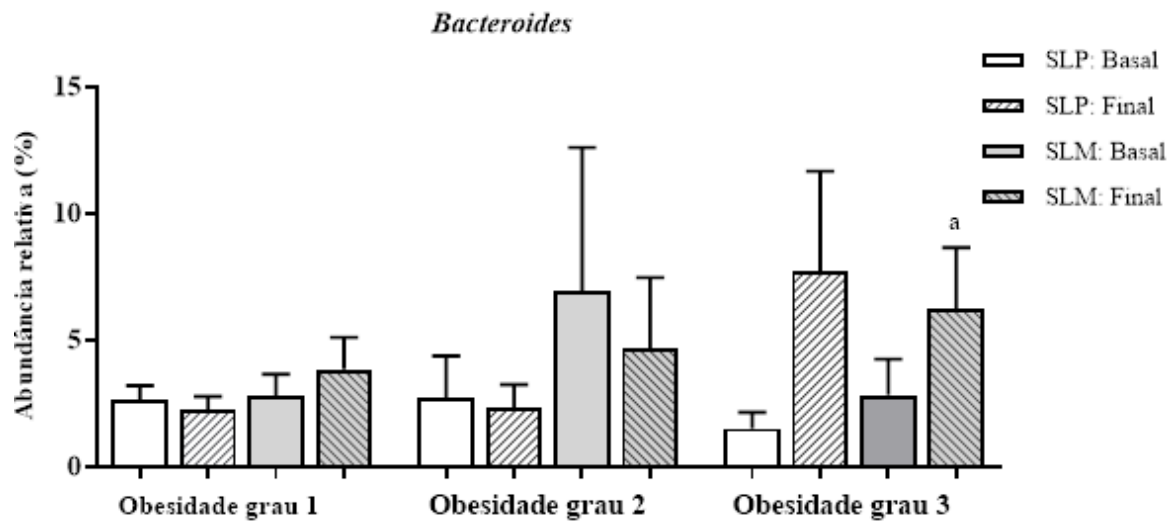


Figura 27. Abundância relativa do gênero *Bacteroides* antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro; ^aComparação entre o período basal e final do SLM (obesidade grau 3), $p < 0,050$.

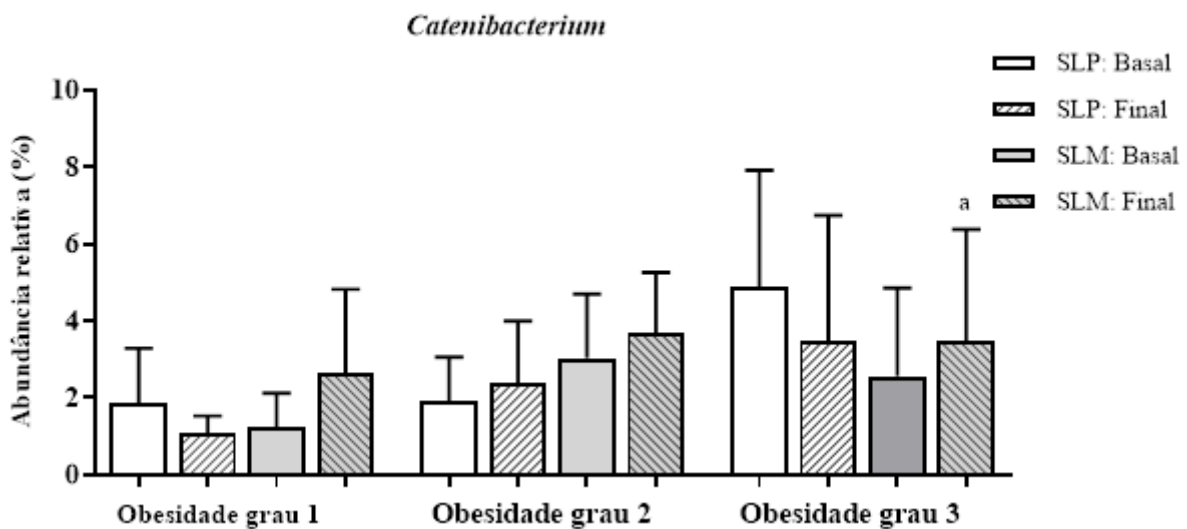


Figura 28. Abundância relativa do gênero *Catenibacterium* antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro; ^aComparação entre o período basal e final do SLM (obesidade grau 3), $p < 0,050$.

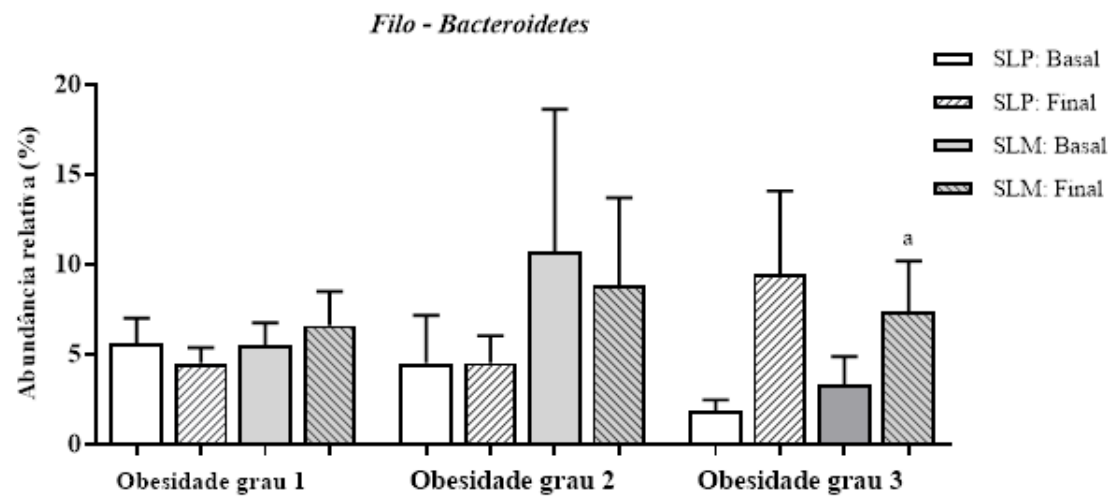


Figura 29. Abundância relativa do filo *Bacteroidetes* antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro nos diferentes graus de obesidade. Valores expressos em média e erro padrão da média. SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro; ^aComparação entre o período basal e final do SLM na obesidade grau 3 ($p < 0,050$).

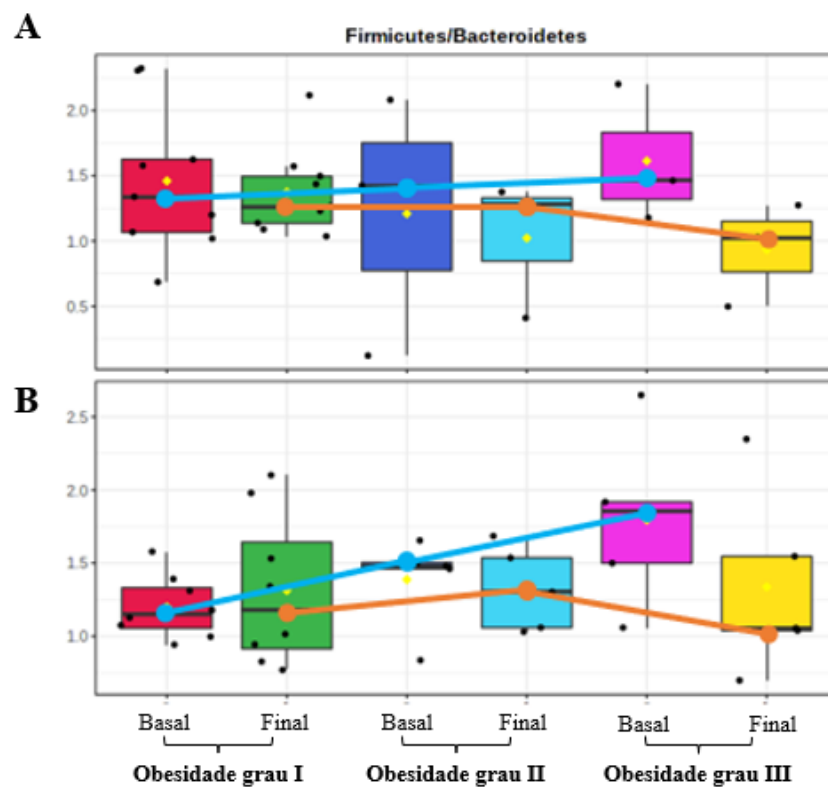


Figura 30. Influência do grau de obesidade e do tratamento com os sucos de laranja Pera (A) e Moro na razão *Firmicutes/Bacteroidetes*. Dados expressos em escala logarítmica.

6.12 Ácidos graxos de cadeia curta e pH fecal

A análise de AGCC (Tabela 11) e do pH fecal (Figura 31) são parâmetros avaliados para identificar a atividade metabólica da microbiota intestinal. Os principais AGCC identificados nas amostras foram: acetato, propionato, butirato e isobutírico. O acetato apresentou uma discreta redução após a suplementação com o SLP, o mesmo efeito não foi encontrado após a ingestão de SLM. Por outro lado, houve um aumento expressivo de acetato após o tratamento com o consumo de SLM.

As concentrações de todos os AGCC identificados de butirato, propionato e isobutírico foram maiores no período final do SLP comparado ao SLM.

Em relação a determinação do pH fecal, não houve diferença entre as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro.

Tabela 11. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro (n=19). SLP: suco de laranja Pera; SLM: suco de laranja Moro.

AGCC (log10 mM/g de fezes)	Intervenção: Período:	SLP		SLM		<i>p1*</i>	<i>p2**</i>
		Basal	Final	Basal	Final		
Butirato		1,65 ± 0,07	1,51 ± 0,09	0,73 ± 0,01	0,70 ± 0,08 ^a	1,000	0,815
Acetato		1,68 ± 0,12	1,05 ± 0,22	0,44 ± 0,05	0,80 ± 1,39	0,022	0,157
Propionato		1,36 ± 0,06	1,13 ± 0,11	0,59 ± 0,07	0,45 ± 0,08 ^a	0,287	0,995
Isobutírico		1,40 ± 0,05	1,14 ± 0,10	0,67 ± 0,01	0,55 ± 0,26 ^a	0,169	0,833

SLP: Suco de laranja Pera (n=16); SLM: Suco de laranja Moro (n=17); AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; ^aComparação entre o período final do SLP e SLM (p<0,05); **p1*: comparação entre o período basal e final do SLP; ***p2*: comparação entre o período inicial e final do SLM. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média.

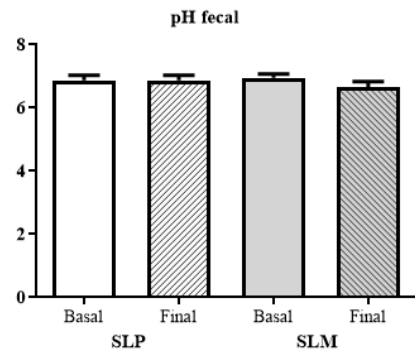


Figura 31. Determinação do pH fecal antes e após as intervenções com os sucos de laranja Pera e Moro. SLP: suco de laranja Pera (n=24); SLM: suco de laranja Moro (n=20); pH = potencial hidrogeniônico.

7 DISCUSSÃO

7.1 Suco de laranja e composição corporal

A obesidade é uma doença complexa com taxas alarmantes de morbidade e mortalidade nos últimos anos em todo o mundo (BHASKARAN *et al.*, 2018). Diversas estratégias nutricionais têm sido recomendadas para a prevenção e tratamento da obesidade incluindo alimentação balanceada composta por frutas, vegetais, cereais integrais que apresentam quantidades elevadas de micronutrientes, compostos bioativos e FA e são úteis para mitigar o processo inflamatório subclínico, estresse oxidativo e alterações da microbiota intestinal.

O suco de laranja é uma das principais bebidas consumidas em todo o mundo e apresenta uma variedade de nutrientes e compostos bioativos como as flavanonas que estão associadas a muitos benefícios à saúde. Já a laranja Moro é uma variedade de laranja sanguínea cultivada em algumas regiões do mundo e bastante investigada nos últimos anos devido as suas elevadas concentrações de antocianinas (RAMPERSAUD; VALIM, 2017).

As flavanonas e antocianinas são compostos bioativos amplamente estudados em doenças como a obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e doenças intestinais. Os sucos de laranja utilizados neste estudo apresentaram composição similar ao utilizado em outros ensaios clínicos do mesmo grupo de pesquisa (MOREIRA *et al.*, 2018; NISHIOKA *et al.*, 2021). Em relação ao teor total de flavanonas, SLP e SLM apresentaram respectivamente 31,71 e 32,32 mg/100 mL, valores inferiores ao encontrados por (NISHIOKA *et al.*, 2021) para SLP (48,57 mg/100 mL) e SLM (42,54 mg/100 mL) e por (MOREIRA *et al.*, 2018) para SLP (33,22 mg/100 mL). Assim como nos estudos anteriores, a hesperidina foi a principal flavanona encontrada em ambos os sucos. Por outro lado, o SLM apresentou valores de antocianinas (2,81 mg/100 mL) muito inferiores aos 15,12mg/100 mL quantificados por (NISHIOKA *et al.*, 2021).

No presente estudo, os sucos de laranja Pera e Moro não alteraram a composição corporal e não houve diferença entre os dois tratamentos. A manutenção da composição corporal após as intervenções propostas neste estudo é esperada tendo em vista que a perda de peso ocorre através de mudanças no estilo de vida tais como a prática de atividade física, restrição calórica, uso de medicamentos e mudanças comportamentais por período prolongado que promovam alteração do balanço energético. Os benefícios da ingestão de flavanonas e antocianinas em indivíduos com obesidade não apresentam apenas a perda de peso como alvo, pois podem contribuir de forma

complementar ao tratamento com efeitos coadjuvantes na redução da inflamação sistêmica, na melhora do estresse oxidativo (NANI *et al.*, 2021), regulação da composição da microbiota intestinal e da produção de metabólitos benéficos pela microbiota intestinal (DUARTE *et al.*, 2021).

7.2 Efeitos do suco de laranja em parâmetros bioquímicos e na pressão arterial

Nos parâmetros bioquímicos e da pressão arterial, não foram observadas diferenças significativas nos grupos tratados com suco de laranja Pera e Moro, provavelmente devido à grande variação interindividual dos voluntários, entretanto foram observadas diferenças consideráveis em tais parâmetros, o que poderia ser considerado como uma tendência de alteração metabólica. Os voluntários apresentaram valores de glicemia de jejum considerados normais ($<99\text{mg/dL}$) (ADA, 2020; SBD, 2019). Na avaliação do perfil lipídico, o colesterol total e as frações (HDL-c, VLDL-c) estavam dentro da normalidade. Já o LDL-c e os triglicérides apresentaram-se elevados considerando os pontos de corte $<100\text{mg/dL}$ e $<150\text{mg/dL}$, respectivamente (SBC, 2017). Ademais, os voluntários apresentaram risco para aterosclerose de acordo com a razão TG/HDL-c considerando o ponto de corte $>3,8$ para identificação de risco (HANAK *et al.*, 2004). Este marcador é utilizado na prática clínica como um preditor de doença coronariana (DA LUZ *et al.*, 2008), pois está correlacionado a presença de fatores de risco para aterosclerose (FROHLICH; DOBIÁŠOVÁ, 2003).

As flavanonas presentes no suco de laranja são comumente associadas a redução do colesterol total, LDL-c e triglicérides. Ressalta-se que este resultado pode ser dependente de uma série de variáveis, no presente estudo devido possivelmente ao protocolo da intervenção, tempo de tratamento, volume consumido e a presença de doenças crônicas pelos voluntários por muitos anos e em uso de diversos medicamentos, não foi possível verificar os efeitos dos sucos de laranja sobre estes parâmetros laboratoriais. Por outro lado, um estudo em 80 pacientes com hipercolesterolemia moderada (LDL-c entre 160 e 190mg/dia) tratados com doses diárias de extrato de bergamota (150mg de flavanoides) por um tempo prolongado (6 meses), os voluntários apresentaram redução dos lipídeos séricos (colesterol total, LDL-c e triglicérides) e aumento do HDL-c (RIZZO, 2016). Outro estudo clínico com 11 mulheres com sobrepeso ou obesidade que ingeriram 250ml/dia de suco de laranja vermelha (250mg de antocianinas/dia) duas vezes ao dia antes das refeições por 12 semanas não encontrou efeitos no peso corporal, mas houve uma redução do colesterol total e do LDL-c (AZZINI *et al.*, 2017). Considerando as intervenções realizadas nestes estudos, os achados encontrados sustentam a influência principalmente e do tempo de tratamento para que ocorram

mudanças no perfil lipídico. Em contrapartida, estudo realizado em 39 voluntários com obesidade investigou o consumo de suco de laranja Pera dividido em duas doses de 250ml associado a dieta hipocalórica por duas semanas e encontrou redução do peso corporal, massa adiposa, colesterol total e LDL-c em 24% comparado ao grupo controle que recebeu dieta hipocalórica sem o suco de laranja (RIBEIRO; DOURADO; CESAR, 2017). Tais resultados apontam que a ação destes compostos bioativos pode ser mais eficiente na atenuação dos parâmetros bioquímicos e do peso corporal com mudanças nos hábitos alimentares.

Em relação a pressão arterial houve uma redução discreta especialmente após o consumo do SLM. O efeito positivo das antocianinas na diminuição da pressão arterial já foi apontado em outros estudos clínicos. Um estudo clínico randomizado com 22 indivíduos saudáveis com consumo de 500ml/dia de suco comercial e fresco de *Citrus sinensis* com duração de duas semanas cada tratamento demonstrou redução da pressão arterial sistólica (-5,13%) e diastólica (-5,91%) nos dois protocolos (ASGARY; KESHVARI, 2013). Um outro estudo clínico com indivíduos saudáveis e com sobrepeso que consumiram 200ml de suco de laranja sanguínea por duas semanas, duas vezes ao dia não encontraram efeitos na pressão arterial, no entanto, encontraram melhora na função endotelial mediados pelo aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (Li *et al.*, 2020).

7.3 Ingestão dos sucos de laranja e consumo alimentar

Na avaliação do consumo alimentar não encontramos diferença entre os dois tratamentos com os sucos de laranja Pera e Moro. Entretanto, identificamos um padrão alimentar comumente associado à obesidade e resistência à insulina. Os hábitos alimentares inadequados apresentam um importante efeito sobre o ganho de peso e podem favorecer o desenvolvimento e a manutenção da obesidade e resistência à insulina. A ingestão calórica dos voluntários manteve-se similar ao longo do estudo e com valores inferiores ao esperado para a população estudada, no entanto, indivíduos com obesidade frequentemente apresentam sub-relato da ingestão alimentar (SCAGLIUSI; LANCHÁ JÚNIOR, 2003).

A distribuição dos macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) no nosso estudo estava adequada considerando a Ingestão Dietética Recomendada (DRIs) para estes nutrientes (PADOVANI *et al.*, 2006) e ainda respeitando as recomendações nutricionais para a população com risco cardiovascular (SBC, 2017, 2021). Por outro lado, o consumo de gorduras saturadas apresentou-se elevado (>7% do valor calórico da dieta) para indivíduos com alto risco de doenças

cardiovasculares, embora o consumo de gorduras totais estivesse dentro dos valores de recomendação (ECKEL *et al.*, 2014; GRUNDY *et al.*, 2019; SBC, 2021).

O consumo excessivo de gorduras saturadas tem sido frequentemente associado a um maior risco de doenças cardiovasculares e de mortalidade devido aos efeitos nos lipídios sanguíneos. A gordura saturada é um dos componentes essenciais dos lipopolissacarídeos, presentes na parede celular de bactérias gram-negativas e está relacionada a uma maior sinalização inflamatória via NF- κ B e TLR-4. Ainda, esta ativação influencia a cascata de sinalização da insulina e pode contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina (KOSKA *et al.*, 2016). Além disso, as dietas ricas em gordura saturada influenciam a composição da microbiota intestinal (DE WIT *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012) e provocam uma menor diversidade bacteriana, aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica condições frequentemente observadas em indivíduos com obesidade e resistência à insulina (LÓPEZ-MORENO *et al.*, 2017).

Os voluntários apresentaram ingestão de colesterol bem próximo a 200mg/dia, exceto após o tratamento com o suco de laranja Pera que os voluntários aumentaram a ingestão e ultrapassou este valor. Atualmente, os estudos na literatura e as diretrizes nacionais e internacionais não estabelecem pontos de corte para o colesterol dietético, tendo em vista que o papel do colesterol alimentar é questionável na incidência de doenças cardiovasculares (COUNCIL *et al.*, 2021; SBC, 2017). Em relação ao consumo de fibras, a ingestão estava abaixo da recomendação para a população geral (25 a 30g/dia) durante todo o estudo.

No presente estudo, utilizamos como critério de inclusão a classificação de obesidade ($IMC \geq 30\text{kg/m}^2$), não houve mudança no IMC dos voluntários ao longo deste trabalho com as duas intervenções, mas tivemos diferentes graus de obesidade neste estudo, sendo a classificação de obesidade grau I a mais prevalente.

Em relação a circunferência abdominal, no presente estudo não foi encontrada alteração neste parâmetro com a intervenção com os dois sucos de laranja, mas observamos que os voluntários apresentaram elevado acúmulo de gordura abdominal, com valores nitidamente elevados indicando risco de doenças cardiovasculares quando comparado aos pontos de corte para esta medida ($<90\text{cm}$ para homens; $<80\text{cm}$ para mulheres) (IDF, 2006). Certamente, o IMC elevado e a presença de gordura visceral apresentam uma estreita relação com alterações metabólicas que podem desencadear o aparecimento de distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares e a maioria dos participantes deste trabalho eram portadores de doenças associados à obesidade e já estavam em tratamento medicamentoso desde o início do estudo (MCCAFFERTY; HILL; GUNN, 2020).

7.4 Efeitos do suco de laranja em mediadores inflamatórios

Em resposta ao excesso de calorias, nutrientes e ao sedentarismo, o tecido adiposo sofre uma remodelação para garantir o estoque adequado de ácidos graxos ou triglicérides. Neste processo de expansão do tecido adiposo mediado por hiperplasia, hipertrofia ou ambos há um aumento da expressão e secreção de mediadores inflamatórios como as proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1) que iniciam o recrutamento de monócitos da circulação sanguínea para o tecido adiposo e promovem aumento da secreção de citocinas por adipócitos, monócitos e macrófagos residentes no tecido adiposo como a IL-6, IL-1 β e TNF- α e induzem a propagação da inflamação sistêmica. Existem vários fatores que contribuem para esta inflamação no tecido adiposo como o fluxo aumentado de lipídios, elevação nos níveis de ácidos graxos livres, hipóxia e estresse oxidativo. Além disso, este ambiente inflamatório associado ao padrão alimentar destes indivíduos podem favorecer uma mudança de fenótipo nos monócitos na circulação sanguínea com aumento da capacidade de apresentar antígenos, maior afinidade por células endoteliais e aumento da produção de citocinas inflamatórias (CONSIDINE, 2014). Estes mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos, monócitos e adipócitos afetam diversos processos fisiológicos como o apetite, metabolismo energético, interações imunológicas e podem favorecer o desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade como a resistência à insulina, doenças cardiovasculares e esteatose hepática não-alcóolica (JIANG *et al.*, 2019). Neste estudo analisamos a influência dos sucos de laranja Pera e Moro em marcadores inflamatórios no plasma e em monócitos.

Diversas citocinas estão envolvida nesta resposta inflamatória no tecido adiposo, entre elas, a IL-1 β que é uma citocina pró-inflamatória relacionada a condições inflamatórias crônicas como a obesidade, a resistência à insulina e o DM2 (LEE *et al.*, 2016). Nestas situações clínicas, a IL-1 β é produzida por monócitos na circulação sanguínea, pelos macrófagos nos tecidos e por adipócitos, isto ocorre após estímulo por produtos microbianos e por outras citocinas como o TNF- α . A inibição de IL-1 β através de diferentes estratégias farmacológicas e não-farmacológicas tem sido testadas no tratamento de pacientes com diabetes e os resultados apontam para uma melhora da inflamação sistêmica e da função das células β pancreáticas (PEIRÓ *et al.*, 2017). No presente estudo encontramos níveis elevados de IL-1 β no plasma dos voluntários no período basal dos dois tratamentos com o suco de laranja, no entanto, apenas o tratamento com o suco de laranja Moro diminuiu as concentrações de IL-1 β . Além disso, comparando o período final dos dois tratamentos, o

suco de laranja Moro apresentou menores níveis de IL-1 β . Atribuímos este resultado na modulação da inflamação à presença das antocianinas no suco de laranja Moro visto que outros estudos já demonstraram o envolvimento desta classe de flavonoides na modulação da secreção de citocinas (KELLEY *et al.*, 2018; VENDRAME *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2013). Os mecanismos que explicam este efeito envolvem a inibição de vias inflamatórias em macrófagos e adipócitos. Neste sentido, estudo *in vitro* com macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS tratados com antocianinas por 16hs (150 μ g e 200 μ g por ml) encontrou supressão do NF- κ B, proteína ativadora 1, proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK/JNK) (LI, LI *et al.*, 2014). Similar a estes achados, estudo em adipócitos tratados com antocianinas (36 μ g por ml) por 18hs demonstrou inibição da via do NF- κ B (JAYARATHNE *et al.*, 2018). Outros possíveis mecanismos anti-inflamatórios que explicam a ação das antocianinas na inflamação incluem redução da adiposidade através de mecanismos lipogênicos ou adipogênicos associados à inflamação (PPAR γ e SREBP), inibição da síntese de prostaglandinas/ciclooxygenases e de mudanças na composição da microbiota intestinal (JAYARATHNE *et al.*, 2019).

Nosso estudo também avaliou os níveis de TNF- α no plasma, visto que é um potente mediador da inflamação produzido por macrófagos e adipócitos com diferentes ações metabólicas. Na obesidade, esta citocina é conhecida por promover a lipólise através da regulação de enzimas como: a perilipina, lipase hormônio sensível e a lipase de triglicérides nos adipócitos. Além disso, o TNF- α inibe a captação e estoque de ácidos graxos não-esterificados e da glicose, assim como, fatores de transcrição envolvidos na lipogênese e adipogênese. Estas ações favorecem a liberação de ácidos graxos livres no plasma contribuindo para a resistência à insulina nestes indivíduos (CHEN, YAN; YU; DENG, 2019). No presente estudo, ao avaliar as concentrações de TNF- α notamos redução deste parâmetro somente após a ingestão com o suco de laranja Moro, achado semelhante ao encontrado em relação a citocina IL-1 β , o que reforça a ação anti-inflamatória das antocianinas presentes no suco de laranja Moro nos voluntários deste estudo. Consistente a isso, um estudo em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica (45% de calorias proveniente de gordura) encontrou aumento da expressão gênica de TNF- α e IL-1 β no tecido adiposo visceral e alterações na composição da microbiota intestinal nestes animais que foi normalizado através da suplementação de Mirtilo, alimento que contém altas concentrações de antocianinas (10g/100g de ração) por oito semanas (LEE. *et al.*, 2018). Além das ações das antocianinas sobre a inibição de vias inflamatórias, estes compostos bioativos podem regular a inflamação através da redução da translocação de LPS para a circulação e de mudanças na composição da microbiota intestinal estimulando a colonização de bactérias

benéficas como os *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e *Akkermansia muciniphila spp* (JAMAR; PISANI, 2017).

O TNF- α e a IL-1 β podem ativar fatores de transcrição que aumentam a produção da IL-6, uma citocina envolvida na inflamação produzida por monócitos, macrófagos e adipócitos a partir de sinais de patógenos exógenos conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (TANAKA *et al.*, 2014). Estes sinais são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de patógenos como os TLRs presentes em células imunológicas incluindo os monócitos e macrófagos e estimulam vias de sinalização inflamatória como o NF- κ B com efeitos diretos na transcrição de citocinas inflamatórias (PATSALOS *et al.*, 2020). A redução destas citocinas mencionadas anteriormente estão surgindo como possibilidade no tratamento clínico de diferentes doenças que apresentam processo inflamatório subjacente como as doenças metabólicas (PELUSO *et al.*, 2013). No presente estudo, os voluntários que receberam o suco de laranja Moro apresentaram redução das concentrações de IL-6 no plasma, resultado semelhante ao encontrado em relação a outros parâmetros inflamatórios no nosso estudo, o que sustenta a eficiência das antocianinas em reduzir a inflamação. Além disso, a análise multivariada apontou os mediadores inflamatórios no plasma como os parâmetros de maior impacto nos tratamentos com os sucos de laranja Pera e Moro evidenciando o papel do consumo de suco de laranja em marcadores inflamatórios.

Além da avaliação destes marcadores no plasma, nosso estudo analisou estes parâmetros inflamatórios no sobrenadante de monócitos estimulados por LPS e observamos que os voluntários que receberam suco de laranja Moro tiveram concentrações menores de IL-6 e TNF- α comparando os períodos finais de cada intervenção. Em conjunto, estes resultados corroboram com outros achados da literatura que sugerem a ação anti-inflamatória exercida pelas antocianinas e evidenciam o benefício da ingestão de alimentos ricos em antocianinas como o suco de laranja Moro com o objetivo de reduzir os níveis de marcadores inflamatórios na circulação sanguínea em indivíduos com obesidade e resistência à insulina (HOLT *et al.*, 2010; PELUSO *et al.*, 2013; SESSO *et al.*, 2005).

Estas citocinas inflamatórias também são capazes de provocar alterações na mucosa intestinal através de mudanças nas proteínas de junções firmes como a zonulina (STURGEON e FASANO, 2016) e contribuem para uma maior permeabilidade intestinal, o que favorece a translocação do LPS para a circulação sistêmica e a instalação da inflamação intestinal e sistêmica (FUKUI, 2016). Além disso, estas substâncias pró-inflamatórias são capazes de alterar a composição da microbiota intestinal e podem favorecer a patogênese da obesidade e de doenças associadas.

7.5 Suco de laranja e permeabilidade intestinal

Para investigar a permeabilidade intestinal nos voluntários, analisamos a zonulina e o LPS plasmáticos. A zonulina é uma proteína envolvida na regulação da permeabilidade intestinal através de ações sobre as proteínas de junções firmes e útil para a avaliação da permeabilidade intestinal. Em indivíduos com excesso de peso, a zonulina está aumentada e associada a alterações metabólicas tais como hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hiperuricemia (FERNA, 2012). Ainda, a dieta hiperlipídica também induz as alterações na permeabilidade intestino, na composição da microbiota intestinal e colabora para o surgimento de disfunções metabólicas como a resistência à insulina (CANI *et al.*, 2008). Diferente dos resultados encontrados no nosso estudo em relação aos parâmetros inflamatórios onde os efeitos foram associados à ingestão do suco de laranja Moro, a redução da permeabilidade intestinal foi encontrada somente após o consumo do suco de laranja Pera, estes resultados já foram observados em outro estudo que avaliou a ação de diferentes flavonoides como a daidzeína, morina, hesperetina, naringenina sobre a integridade da barreira intestinal (NODA *et al.*, 2012). Ressalta-se que destes compostos usados no estudo, a naringenina e a hesperitina estão presentes no suco de laranja Pera e Moro. Os mecanismos envolvidos que explicam menor permeabilidade após o a ingestão destes compostos bioativos incluem o aumento na expressão das proteínas de junções firmes como a zonulina, ocludina, molécula de adesão-1 e/ou claudinas (NODA *et al.*, 2012). No presente estudo, a composição de flavanonas é bastante semelhante nos sucos de laranja Pera e Moro, no entanto, o suco de laranja Pera contém maiores concentrações de hesperidina tanto no sobrenadante quanto no pellet, o que pode estar relacionado a estes efeitos encontrados na redução da permeabilidade intestinal somente com o tratamento com o suco de laranja Pera, já que este contém em maiores concentrações os compostos bioativos associados a efeitos protetores sobre a integridade intestinal. Neste sentido, estudo com suplementação de hesperidina avaliou o efeito da suplementação em três principais componentes das junções firmes (claudina 2, zonulina e ocludina) no colón de animais alimentados com dieta hiperlipídica e observou redução da expressão destas proteínas com a dieta, mas que foi restaurada após o tratamento com hesperidina (LIU *et al.*, 2020). Além disso, os autores encontraram elevação de outros marcadores de integridade intestinal como a proteína ligadora de polissacarídeos e a proteína ligadora de ácidos graxos, o que reforça nossos achados sobre a participação especialmente da hesperidina na regulação da integridade intestinal através de componentes das junções firmes contribuindo para mitigar os efeitos deletérios da obesidade e resistência à insulina na mucosa intestinal.

A microbiota intestinal de indivíduos com obesidade e de animais alimentados com dieta hiperlipídica é caracterizada por níveis elevados de LPS que é um constituinte das bactérias intestinais gram-negativas e um potente indutor da resposta inflamatória (TSENG e WU, 2019). Em condições normais, o LPS está presente no lúmen intestinal e não apresenta efeitos negativos, no entanto, na presença de doenças metabólicas e em outras condições clínicas que afetam o trato gastrointestinal direta ou indiretamente, o LPS é transferido para a circulação sanguínea através do aumento da permeabilidade intestinal e contribui para a inflamação sistêmica (BORONI MOREIRA *et al.*, 2012; CÂNDIDO *et al.*, 2018). No presente estudo, os tratamentos com o suco de laranja Pera e Moro não alteraram de forma expressiva o LPS, mas é possível observar concentrações mais baixas após a ingestão de ambos os sucos. Esta redução discreta do LPS no plasma possivelmente está relacionada à menor permeação do LPS devido ao fortalecimento da barreira intestinal como mencionado anteriormente. Associado a isso, a redução da abundância de bactérias gram-negativas que implicam na patogênese da inflamação crônica na obesidade e na sensibilidade à insulina.

7.6 Efeitos dos sucos de laranja na microbiota intestinal

A interação entre dieta, microbiota intestinal e obesidade vêm sendo intensamente investigada nos últimos anos. A hipótese de que a microbiota intestinal desempenha um papel na patogênese da obesidade levou a realização de uma série de trabalhos científicos que tentaram caracterizar a composição da microbiota intestinal em modelos animais e humanos com obesidade e testaram os possíveis efeitos de diferentes intervenções nesta composição (BARENGOLTS, 2016; CHAMBERS *et al.*, 2019; DAO *et al.*, 2016).

As bactérias são os principais representantes da microbiota intestinal, com duas principais linhagens filogenéticas: *Bacteroidetes* e *Firmicutes* que contribuem com 90% das bactérias fecais em indivíduos saudáveis. Na obesidade comparado a eutrofia, alguns estudos encontraram menor proporção de *Bacteroidetes* e maiores níveis de *Firmicutes* (ANDOH *et al.*, 2016; JINATHAM *et al.*, 2018; LEY *et al.*, 2005; TURNBAUGH *et al.*, 2006). O nosso trabalho analisou o efeito dos sucos de laranja Pera e Moro na abundância relativa neste nível taxonômico e encontramos uma grande abundância de *Firmicutes* correspondendo a 85,93% nas amostras fecais de todos os voluntários que corrobora com outros estudos que encontraram aumento do filo *Firmicutes* em detrimento do filo *Bacteroidetes* e demonstram o desequilíbrio na composição da microbiota intestinal nestes indivíduos. Esta mudança na composição dos principais filos da microbiota intestinal encontrada no

nosso estudo pode estar associada a ingestão crônica de uma dieta hiperlipídica especialmente de gordura saturada que induz ao aumento da razão *Firmicutes:Bacteroidetes* e tem implicação não apenas na composição da microbiota intestinal no nível como filo, mas também em gênero e espécie (TURNBAUGH *et al.*, 2009). Este desequilíbrio na microbiota intestinal de indivíduos com obesidade contribui para o aumento da permeabilidade intestinal, redução da riqueza microbiana e ativação da inflamação subclínica (CÂNDIDO *et al.*, 2018). No nosso estudo, o tratamento com o SLP e SLM promoveu uma redução na razão *Firmicutes/Bacteroidetes* o que suporta o papel benéfico das flavanonas e antocianinas presentes nos sucos de laranjas na restauração da microbiota intestinal em indivíduos com obesidade. Em concordância com nossos resultados, um estudo realizado em camundongos que receberam dieta hiperlipídica demonstraram diminuição significativa na abundância de *Firmicutes* e aumento de *Bacteroidetes* após a suplementação com neohesperidina (LU *et al.*, 2020).

O filo *Actinobacteria* foi o segundo mais abundante na microbiota intestinal dos participantes do nosso estudo, tanto o aumento do filo *Firmicutes* quanto de *Actinobacteria* estão associados a dieta hiperlipídica (HILDEBRANDT *et al.*, 2009), o que evidencia os resultados encontrados neste trabalho visto que o consumo elevado de gorduras saturadas também associado a alterações na composição da microbiota intestinal (MUJICO *et al.*, 2013; PATTERSON *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2011). Considerando as intervenções com os sucos de laranja, os dois tratamentos não apresentaram diferenças significativas neste filo, entretanto, sua abundância relativa apresentou-se consideravelmente reduzida (de 7,28% para 6,62%) após a intervenção com SLP neste filo.

Ao analisar o nível taxonômico gênero da microbiota intestinal, nosso estudo encontrou uma grande variabilidade interindividual antes e após cada tratamento com o suco de laranja. Esta variabilidade pode estar relacionada às características dos voluntários como idade, sexo, uso de medicamentos, genética e podem interferir na composição da microbiota intestinal e na resposta ao tratamento. Ainda assim, os sucos de laranja Pera e Moro alteraram de forma similar a abundância relativa de 51,61% dos gêneros bacterianos identificados na microbiota intestinal dos voluntários, sendo que 11 gêneros tiveram sua abundância aumentada e 5 gêneros tiveram sua abundância reduzida. Este padrão sugere que ambos os sucos podem modular a microbiota intestinal da mesma forma, pelo menos parcialmente.

Os sucos de laranja Pera e Moro não tiveram efeitos significativas ($p < 0,05$) sobre a composição da microbiota intestinal no nível gênero, exceto a abundância relativa da *Bifidobacterium* que foi diferente comparando o período final de cada tratamento com níveis mais elevados após o

tratamento com o suco de laranja Moro. Bactérias do gênero *Bifidobacterium* apresentam enzimas β -glicosidasas que são capazes de metabolizar as antocianinas e algumas, tais como *Bifidobacterium bifidum*, apresentam também enzimas responsáveis pela O-deglicosilação de flavanonas, compostos bioativos encontrado no suco de laranja Moro (FARIA *et al.*, 2014), tal resultado justifica a relação entre maior abundância de *Bifidobacterium* e o tratamento com o suco de laranja Moro. Este gênero é comumente associado a benefícios à saúde devido as suas ações anti-inflamatórias relacionadas à diminuição de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α e IL-1 β no tecido adiposo visceral e concentrações menores de LPS (CANI *et al.*, 2007). Embora nosso estudo tenha encontrado maior abundância deste gênero comparando o período final de cada intervenção, este resultado pode indicar uma possível relação da *Bifidobacterium* aos níveis reduzidos de citocinas inflamatórias também encontrados no grupo que foi suplementado com o suco de laranja Moro.

No presente estudo foi observada correlação positiva entre os gêneros *Dorea*, *Fusicatenibacter* e *Ruminococcus* e a composição corporal, perfil lipídico e glicemia. A associação positiva entre os gêneros *Dorea* e *Ruminococcus* e parâmetros antropométricos incluindo o IMC já foram apontados na literatura (COMPANYS *et al.*, 2021; OTTOSSON *et al.*, 2018), assim como, a correlação positiva com o perfil lipídico (ZENG *et al.*, 2019). Já o gênero *Fusicatenibacter* tem sido associado positivamente a obesidade (VAZQUEZ-MORENO *et al.*, 2021) e ao perfil lipídico como CT, LDL-c e TG (HUANG *et al.*, 2020) confirmando os achados encontrados no nosso estudo. Além disso, encontramos correlação negativa moderada entre os metabólitos de fase II provenientes de naringenina e os gêneros bacterianos *Christensenellaceae*, *Ruminococcus* e *Faecalibacterium*. A relação entre estes gêneros e metabólitos de flavonoides são escassos na literatura. Contudo, estudos prévios sugerem associação positiva entre a ingestão de flavonoides e estes gêneros encontrados (CUERVO *et al.*, 2015; ROÏTIÖ *et al.*, 2017; SOKOL *et al.*, 2008).

O intestino humano é um ecossistema muito diverso e uma microbiota intestinal saudável tem como característica principal uma maior diversidade de bactérias, no entanto, na presença de algumas condições clínicas como a obesidade, resistência à insulina e inflamação subclínica esta diversidade é afetada (STANISLAWSKI *et al.*, 2019). No nosso estudo para explorar os efeitos dos sucos na diversidade bacteriana utilizamos os índices de alfa e beta-diversidade e ambos os tratamentos não apresentam efeitos sobre estes parâmetros indicando que as comunidades bacterianas entre os grupos tratados com o suco de laranja Pera e Moro não eram diferentes. Por outro lado, estudos em animais e humanos demonstraram a capacidade dos polifenóis de alterar a diversidade da microbiota intestinal dependendo da estrutura química dos polifenóis, visto que estes compostos são capazes de promover

o crescimento de determinadas bactérias, mas esta ação é dependente da dose utilizada (LI *et al.*, 2020) Acrescenta-se a isso que os estudos que apresentaram mudança na diversidade da microbiota intestinal após a ingestão de polifenóis foi mediada pela redução do IMC, resultado que não foi encontrado no presente estudo (LE ROY *et al.*, 2020).

Existem algumas evidências na literatura que sugerem que os polifenóis a partir do consumo de frutas, vegetais, legumes podem induzir a mudanças na microbiota intestinal com efeitos sobre a produção da ácidos graxos de cadeia curta (MAS-CAPDEVILA *et al.*, 2020) As principais bactérias envolvidas na produção de ácidos graxos de cadeia curta são a *Escherichia coli*, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Eubacterium sp* (CARDONA *et al.*, 2013; DUEÑAS *et al.*, 2015).

Os três principais AGCC são o butirato, acetato e propionato e apresentam importantes ações em vias metabólicas e inflamatórias. No presente estudo encontramos níveis elevados de AGCC nas fezes dos voluntários que receberam a intervenção com o suco de laranja Pera, exceto em relação ao acetato que apresentou expressiva elevação após a ingestão do suco de laranja Moro. Atribuímos o aumento dos AGCC no grupo Pera devido a maior ingestão de fibras alimentares neste grupo, tendo em vista que os AGCC são produzidos durante a fermentação sacarolítica. Portanto, estes resultados não demonstraram a influência da ingestão dos sucos de laranja Pera nos ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela microbiota intestinal. Contudo, o suco de laranja Moro promoveu mudança nos níveis de acetato, o que pode sugerir o envolvimento de alguns gêneros bacterianos como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* relacionados a produção de AGCC (TURNBAUGH *et al.*, 2009). No presente estudo, o tempo de tratamento e a dose utilizada de suco de laranja não foi suficiente para induzir mudanças significativas na microbiota intestinal de indivíduos com obesidade especialmente em relação a estes gêneros associados a produção de AGCC. Mas, outros estudos que usaram concentrações mais elevadas de polifenóis apontaram maior abundância de *Bifidobacterium* e concomitantemente maiores concentrações de AGCC indicando que os polifenóis presentes na dieta podem favorecer mudanças na microbiota intestinal e maior produção destes metabólitos da microbiota intestinal com papéis benéficos à saúde (GENTILE; WEIR, 2018; SINGH *et al.*, 2017).

7.7 Influência do grau de obesidade e dos sucos de laranja na microbiota intestinal

Sabe-se que os efeitos de qualquer intervenção dietética dependem do fenótipo clínico e de variáveis individuais. Ao analisar os parâmetros responsáveis por maior agrupamento dos voluntários no presente estudo observamos a influência do IMC e dos marcadores inflamatórios como os

principais fatores que explicam a variância dos achados encontrados. Nossos voluntários apresentavam graus de obesidade distintos e possivelmente as diferenças metabólicas, perfil inflamatório e na composição da microbiota intestinal poderiam influenciar os resultados encontrados nas intervenções que realizamos. Por esta razão, com o intuito de aprofundar a compreensão dos efeitos dos sucos de laranja em diferentes graus de obesidade avaliamos a abundância relativa no nível taxonômico filo e gênero separando os voluntários de acordo com o grau de obesidade e tratamento proposto.

Na análise da abundância relativa da microbiota intestinal no nível gênero, os voluntários com obesidade grau 3 pertencentes ao grupo suco de laranja Pera tiveram menor abundância dos gêneros *Akkermansia*. Contudo, este gênero aumentou de forma discreta após o consumo do suco de laranja Moro. A *Akkermansia muciniphila* é uma bactéria encontrada na microbiota fecal de indivíduos saudáveis e tem como principal função a degradação da camada de muco do epitélio intestinal (BELZER; DE VOS, 2012). Nas doenças metabólicas como a obesidade, a *Akkermansia* é intensamente afetada e apresenta uma abundância reduzida (DAO *et al.*, 2019; SCHNEEBERGER *et al.*, 2015).

No presente estudo, encontramos o gênero *Alistipes* menos abundante em voluntários com obesidade grau 3 em ambos os tratamentos, achado consistente com outros estudos que apontaram correlação inversa de *Alistipes* com o IMC (AGUIRRE; SOUZA; VENEMA, 2016; LV *et al.*, 2019; THINGHOLM *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2019). Neste mesmo grupo, após a intervenção com os sucos de laranja Pera e Moro houve um aumento de *Alistipes* indicando um efeito relacionado ao IMC, visto que este efeito só foi observado nos voluntários com obesidade grau 3. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo em camundongos C57BL/6 tratados com antocianinas por três meses proveniente de *Goji berry*, após o tratamento os animais apresentaram maior abundância de *Alistipes* (PENG *et al.*, 2020). O gênero *Alistipes* parece ter um efeito protetor em doenças como a fibrose hepática, colite, câncer e doenças cardiovasculares, no entanto, os dados na literatura são conflitantes (PARKER *et al.*, 2020).

Ainda, os voluntários com obesidade grau 3 tiveram aumento do gênero *Catenibacterium*, após o tratamento com o suco de laranja Moro. Este gênero tem sido associado à menor risco de doenças cardiovasculares (KELLY *et al.*, 2017) e a ingestão de polifenóis na dieta (GUO *et al.*, 2017), no entanto, no presente estudo encontramos aumento deste gênero somente após a intervenção com o suco de laranja Moro o que sugere que a influência dos polifenóis sobre o gênero *Catenibacterium*

pode ser dependente da classe de polifenóis ofertado, já que o suco de laranja Pera também é uma fonte de polifenóis, mas não encontramos este mesmo resultado.

O gênero *Bacteroides* também apresentou maior abundância nos voluntários com obesidade grau 3 após o tratamento com o suco de laranja Moro. Este gênero está envolvido no metabolismo das flavanonas (BRAUNE; BLAUT, 2016) e das antocianinas (LIU *et al.*, 2017; MAYTA-APAIZA *et al.*, 2018; PETERSEN *et al.*, 2019), o que corrobora com nossos achados, uma vez que encontramos este efeito apenas nos voluntários que receberam suco de laranja Moro. Estes resultados corroboram também com os publicados em estudo anterior do mesmo grupo de pesquisa (NISHIOKA *et al.*, 2021), no qual foi observada correlação positiva entre os valores de abundância relativa deste gênero e os conteúdos de naringenina-7-glicuronídeo e hesperetina-7-glicuronídeo excretados na urina de voluntários após o consumo de 600 mL de suco de laranja das variedades Pera e Moro.

Tendo em vista os resultados apontados em relação à *Bacteroides* no nível gênero, tivemos aumento do filo correspondente (*Bacteroidetes*) nos voluntários com obesidade grau 3 após a suplementação com o SLM. Em suma, notamos o efeito especialmente do suco de laranja Moro em indivíduos com obesidade grau 3 na modulação de gêneros bacterianos já apontados na literatura com efeitos benéficos à saúde, o que pode indicar uma resposta possivelmente dependente do estado nutricional e/ou condições patológicas dos voluntários do presente estudo.

7.8 Compostos bioativos das laranjas e metabólitos na urina

No presente estudo, realizamos a análise dos metabólitos de flavanonas e antocianinas na urina dos voluntários e identificamos os metabólitos naringenina, hesperitina e ácidos fenólicos. Estes metabólitos estavam mais elevados após as intervenções com o suco de laranja Pera e Moro o que indica que os resultados encontrados no nosso estudo estavam relacionados à presença destes compostos bioativos, já que o consumo alimentar permaneceu inalterado ao longo do protocolo.

Os metabólitos da urina predominantemente encontrados estavam na forma conjugada de hesperitina e naringenina, semelhante a outros estudos do nosso grupo com o consumo de suco de laranja (NISHIOKA *et al.*, 2021). Além disso, encontramos metabólitos com dois ligantes como a hesperitina diglicuronídeo e a naringenina diglicosídeo. Notamos uma grande variabilidade na excreção de metabólitos encontrados urina em relação aos metabólitos de fase II e aos ácidos fenólicos. Consistente a isso, um estudo com 129 indivíduos com idade entre 18-80 anos também encontrou uma importante variabilidade individual na excreção de metabólitos após a ingestão de

naringenina (1,6% a 59%) e de hesperitina (0% a 25%), um dos principais fatores que contribuíram para este resultado foi a idade que apresentou uma correlação negativa com estes metabólitos indicando que pode ser um fator de interferência no metabolismo das flavanonas (BRETT *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que outros fatores podem interferir na biodisponibilidade destes compostos e na excreção destes metabólitos como a matriz alimentar, forma física disponível (suco, extrato solúvel ou cápsula), métodos de processamento, técnicas de estoque, estrutura química e as características dos indivíduos. Ainda, especula-se na literatura que a variabilidade na quantidade, composição e tempo de excreção de metabólitos destes compostos na urina pode ser devido a heterogeneidade na microbiota dos indivíduos (CASSIDY; MINIHANE, 2017), visto que para estes compostos bioativos estarem na sua forma aglicona que é mais biodisponível dependem das hidrolases no intestino e/ou da microbiota intestinal (WANG *et al.*, 2021b).

Muitas bactérias anaeróbias no intestino grosso apresentam enzimas hidrolíticas como as α -raminosidases, β -glicosidases, β -glucuronidases que contribuem para a hidrólise dos glicosídeos dos flavonóides, por exemplo, a naringenina-7-O-rutinosídeo e a hesperetina-7-O-rutinosídeo são convertidas em agliconas (naringenina e hesperitina) após a incubação com a espécie *Bifidobacterium longum* R0175 (PEREIRA-CARO *et al.*, 2018). Ainda, nesta forma aglicona, existem espécies bacterianas que também participam do metabolismo de fase II no intestino ou no fígado como a *Blautia* sp. MRG-PMF1, *Parabacteroides distasonis* JCM 5825, *Bacteroides uniformis* JCM 5828, *Bifidobacterium dentium* K13 e outras.(WANG *et al.*, 2021b) Igualmente, as antocianinas também são dependentes da microbiota intestinal para a conversão para a sua forma ativa e este processo ocorre através da ação de determinados microorganismos como as espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* que apresentam muitos efeitos benéficos à saúde (AMARETTI *et al.*, 2015). Nosso estudo não avaliou a composição da microbiota intestinal no nível espécie, mas no nível taxonômico gênero os nossos resultados indicaram o efeito dos tratamentos em determinadas bactérias como as *Bifidobacteria* relacionadas ao metabolismo de compostos bioativos.

Após este processo no colón ocorre a produção de produtos fenólicos das flavanonas tais como o ácido hipúrico e o ácido metilhipúrico, que no presente estudo foram os dois produtos fenólicos identificados na urina. As antocianidinas podem ser metabolizadas a ácidos protocatecuicos, no entanto, nosso estudo não conseguiu quantificar este composto na urina dos participantes. Deste modo, tanto as formas conjugadas quanto as formas agliconas podem ser encontradas na urina (ICHIYANAGI *et al.*, 2008; KAY *et al.*, 2004).

Para concluir, observamos no presente estudo que os sucos de laranja variedade Pera e Moro apresentaram efeitos distintos em determinados parâmetros em indivíduos com obesidade e resistência à insulina, os quais estão destacados na Figura 32.

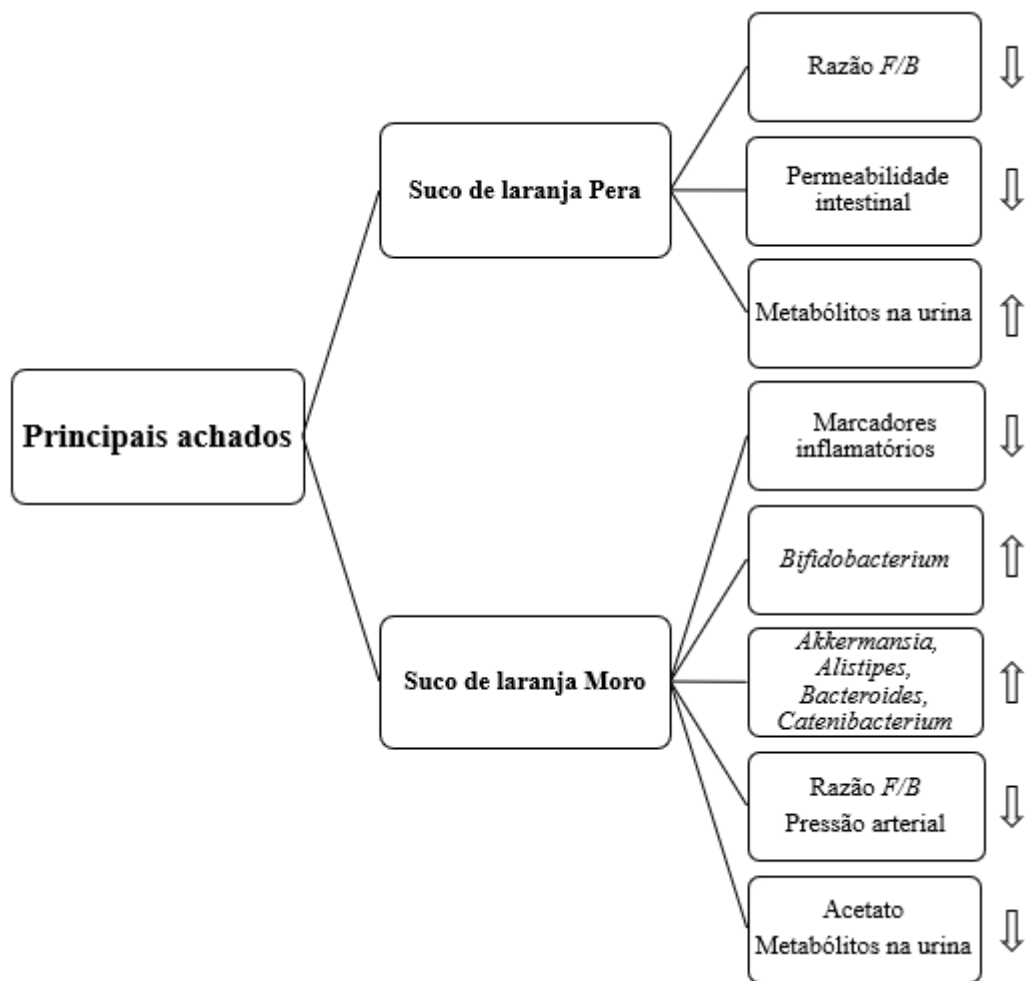


Figura 32. Principais resultados do estudo após o consumo do suco de laranja Pera e Moro. Razão *F/B*: *Firmicutes/Bacteroidetes*.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De um modo geral, a ingestão do suco de laranja Pera promoveu efeito positivo na redução da permeabilidade intestinal e o suco de laranja variedade Moro diminuição dos parâmetros inflamatórios e da pressão arterial em indivíduos com obesidade e resistência insulínica. Tais alterações podem contribuir para a diminuição da inflamação subclínica e, conseqüentemente, representar um benefício à saúde, mitigando as alterações metabólicas e inflamatórias decorrentes destas condições clínicas pré-existentes.

Resultados obtidos no presente estudo evidenciaram ainda possíveis efeitos dos sucos de laranja na modulação da microbiota intestinal, resultando em alterações na produção de ácidos graxos de cadeia curta e de ácidos fenólicos provenientes da metabolização das flavanonas dos sucos de laranja, compostos estes conhecidamente relacionados aos efeitos observados nos parâmetros bioquímicos avaliados e a outros efeitos benéficos decorrentes do consumo de *citrus* e derivados.

Embora a inclusão de voluntários com diferentes graus de obesidade (1 a 3) no ensaio clínico tenha dificultado a visualização de diferenças significativas nos parâmetros analisados, devido à grande variação interindividual, esta abordagem possibilitou a visualização da resposta à ingestão dos compostos bioativos do suco de laranja em indivíduos com diferentes estados nutricionais e patológicos.

Desta forma, os resultados obtidos justificam a realização de mais estudos com número maior de indivíduos e a continuidade na busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos relacionados ao consumo de suco de laranja.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, M.; SOUZA, C. B. DE; VENEMA, K. The Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects Contribute Differently to the Fermentation of Arabinogalactan and Inulin. *PLOS ONE*, p. 1–18, 2016.

ALMEIDA, M. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness ´. *Nature*, v. 500, n. 29, p. 4–10, 2013.

AMARETTI, A. *et al.* Hydrolysis of the Rutinose-Conjugates Flavonoids Rutin and Hesperidin by the Gut Microbiota and Bifidobacteria. *Nutrients*, v. 7, p. 2788–2800, 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*, v. 43, n. January, p. S14–S31, 2020.

ANACLETO, S. L. *et al.* Citrus flavanone metabolites protect pancreatic- β cells under oxidative stress induced by cholesterol. *Food and Function*, v. 11, n. 10, p. 8612–8624, 2020.

ANDOH, A. *et al.* Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *Journal Clinical Biochemistry Nutrition*, v. 59, n. 1, p. 65–70, 2016.

ANHÊ, F. F. *et al.* A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, v. 64, n. 6, p. 872–883, 2015.

ARGENIO, V. D.; SALVATORE, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*, n. 2014, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>>.

ARMOUGOM, F. *et al.* Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS ONE*, v. 4, n. 9, p. 1–8, 2009.

ARON-WISNEWSKY, J. *et al.* Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut*, v. 68, n. 1, p. 70–82, 2020.

ASGARY, S.; KESHVARI, M. Effects of citrus sinensis juice on blood pressure. *ARYA Atherosclerosis*, v. 9, n. 1, p. 98–101, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC International, 16th edition. Volume 1*. Arlington: [s.n.], 1995.

AZZINI, E. *et al.* Effect of Red Orange Juice Consumption on Body Composition and Nutritional Status in Overweight / Obese Female : A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 1–9, 2017.

BARENGOLTS, E. Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of obesity and prediabetes: Review of randomized controlled trials. *Endocrine Practice*, v. 22, n. 10, p. 1224–1234, 2016.

BARRECA, D. *et al.* Review Article Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors*, v. 43, n. 4, p. 495–506, 2017.

BELZER, C.; DE VOS, W. M. Microbes inside from diversity to function: The case of Akkermansia. *ISME Journal*, v. 6, n. 8, p. 1449–1458, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.6>>.

BHASKARAN, K. *et al.* Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3.6 million adults in the UK. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, v. 6, n. 12, p. 944–953, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30288-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30288-2)>.

BINDA, C. *et al.* Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, v. 50, n. 5, p. 1–37, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>>.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>>.

BORONI MOREIRA, A. P. *et al.* La microbiota intestinal y el desarrollo de la obesidad. *Nutricion Hospitalaria*, v. 27, n. 5, p. 1408–1414, 2012.

BOTO-ORDÓÑEZ, M. *et al.* High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: A randomized clinical trial. *Food and Function*, v. 5, n. 8, p. 1932–1938, 2014.

BOULANGÉ, C. L. *et al.* Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>>.

BRASIL, E. *et al.* Daily Consumption of Orange Juice from Citrus sinensis L. Osbeck cv. Cara Cara and cv. Bahia Differently Affects Gut Microbiota Profiling as Unveiled by an Integrated Meta-Omics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, p. 1381–1391, 2019.

BRASIL, E. ET AL. Effect of Pasteurization on Flavonoids and Carotenoids in Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. ‘Cara Cara’ and ‘Bahia’ Juices. *J. Agric. Food Chem.*, v. 65, n. 7, p. 1371–1377, 2017.

BRAUNE, A.; BLAUT, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, v. 7, n. 3, p. 216–234, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>>.

BRETT, G. M. *et al.* Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions

of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. *British Journal of Nutrition*, v. 101, n. 5, p. 664–675, 2009.

CÂNDIDO, F. G. *et al.* Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 69, n. 2, p. 125–143, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1343286>>.

CÂNDIDO TLN, BRESSAN J, A. R. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. *Nutr Hosp*, v. 6, p. 1432–1440, 2018.

CANI, P D *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* (2007), v. 50, p. 2374–2383, 2007.

CANI, PATRICE D.; DELZENNE, N. M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 130, n. 2, p. 202–212, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.012>>.

CANI, PATRICE D *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, v. 57, n. 6, p. 1470–81, 2008.

CAPORASO, J. G. *et al.* correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0510-335>>.

CARDONA, F. *et al.* Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>>.

CARNAUBA, R. A.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Estimated dietary polyphenol intake and major food sources of Brazilian population. *British Journal of Nutrition*, 2021.

CASSIDY, A. *et al.* Dietary flavonoids and risk of stroke in women Aedín. *Stroke.*, v. 43, n. 4, p. 946–951, 2013.

CASSIDY, A.; MINIHANE, A. M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 105, n. 1, p. 10–22, 2017.

CHAMBERS, E. S. *et al.* Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over t. *Gut*, v. 68, n. 8, p. 1430–1438, 2019.

CHATELIER, E. LE *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, v. 500, 2013.

CHAVES, D. F. S. *et al.* Proteomic Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells after a High-Fat, High-Carbohydrate Meal with Orange Juice. *Journal of Proteome Research*, v. 16, n. 11, p. 4086–4092, 2017.

CHEN, YAN; YU, C. Y.; DENG, W. M. The role of pro-inflammatory cytokines in lipid metabolism of metabolic diseases. *International Reviews of Immunology*, v. 38, n. 6, p. 249–266, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1645138>>.

CHEN, YONGYU *et al.* *Fusobacterium nucleatum* facilitates ulcerative colitis through activating IL-17F signaling to NF- κ B via the upregulation of CARD3 expression. *Journal of Pathology*, v. 250, n. 2, p. 170–182, 2020.

COLLADO, M. C. *et al.* Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 88, n. 4, p. 894–899, 2008.

COMPANYS, J. *et al.* Gut microbiota profile and its association with clinical variables and dietary intake in overweight/obese and lean subjects: A cross-sectional study. *Nutrients*, v. 13, n. 6, 2021.

CONSIDINE, R. V. Activated monocytes: Yet another link between systemic inflammation and obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 99, n. 7, p. 2347–2349, 2014.

CORNEJO-PAREJA, I. *et al.* Importance of gut microbiota in obesity. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 72, p. 26–37, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41430-018-0306-8>>.

CORRÊA, T. A. F. *et al.* The Two-Way Polyphenols-Microbiota Interactions and Their Effects on Obesity and Related Metabolic Diseases. *Frontiers in Nutrition*, v. 6, n. December, p. 1–15, 2019.

COUNCIL, G. *et al.* Statement Position Statement on Fat Consumption and Cardiovascular Health – 2021. v. 116, n. 1, p. 160–212, 2021.

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, v. 3, n. March, p. 207–215, 2015.

CRISTINA, R. *et al.* Anti-inflammatory Properties of Orange Juice: Possible Favorable Molecular and Metabolic Effects. *Plant Foods Hum Nutr*, v. 68, p. 1–10, 2013.

CUERVO, A. *et al.* Association of Polyphenols from Oranges and Apples with Specific Intestinal Microorganisms in Systemic Lupus Erythematosus Patients. p. 1301–1317, 2015.

CUEVAS-SIERRA, A. *et al.* Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Advances in Nutrition*, v. 10, n. 9, p. S17–S30, 2019.

CYPESS, AM AND KAHN, C. The Role and Importance of Brown Adipose Tissue in Energy Homeostasis. *Curr Opin Pediatr.*, v. 22, n. 4, p. 478–484, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

DA LUZ, P. L. *et al.* High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics*, v. 63, n. 4, p. 427–432, 2008.

DAO, M. C. *et al.* Akkermansia muciniphila abundance is lower in severe obesity , but its increased level after bariatric surgery is not associated with metabolic health improvement. *AJP-Endocrinol Metab*, n. 9, p. 446–459, 2019.

DAO, M. C. *et al.* Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, v. 65, n. 3, p. 426–436, 2016.

DAO, M. C.; CLÉMENT, K. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. *European Journal of Internal Medicine*, v. 48, n. October, p. 18–24, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.005>>.

DAVILA, A. *et al.* Intestinal luminal nitrogen metabolism : Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacological Research*, v. 68, p. 95–107, 2013.

DAY, A. J. *et al.* Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters*, v. 436, n. 1, p. 71–75, 1998.

DAY, A. J. *et al.* Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, v. 468, n. 2–3, p. 166–170, 2000.

DE WIT, N. *et al.* Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 303, n. 5, p. 589–599, 2012.

DEN BESTEN, G. *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, n. 9, p. 2325–2340, 2013.

DHARIWAL, A. *et al.* MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. W1, p. W180–W188, 2017.

DI CESARE, M. *et al.* Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)>.

DUARTE L, GASALY N, POBLETE-ARO C, URIBE D, ECHEVERRIA F, GOTTELAND M, G.-D. D. Polyphenols and their anti-obesity role mediated by the gut microbiota: a comprehensive review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2021.

DUEÑAS, M. *et al.* A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols Montserrat. *BioMed Research International*, p. 1–16, 2015.

ECKEL, R. H. *et al.* 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: A report of the American College of cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*, v. 129, n. 25 SUPPL. 1, p. 76–99, 2014.

EL-SHARKAWY, H. *et al.* Evaluation of Bifidobacteria and Lactobacillus Probiotics as Alternative Therapy for Salmonella typhimurium Infection in Broiler Chickens. *Animals*, v. 10, n. 1023, p. 1–12, 2020.

ESCOBEDO, G.; LÓPEZ-ORTIZ, E.; TORRES-CASTRO, I. Gut microbiota as a key player in triggering obesity , systemic inflammation and insulin resistance. *Revista de Investigación Clínica*, v. 66, n. 5, p. 450–459, 2014.

ESTRUEL-AMADES, S. *et al.* Hesperidin effects on gut microbiota and gut-associated lymphoid tissue in healthy rats. *Nutrients*, v. 11, n. 2, 2019.

EVERARD, A. *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS*, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.

EXLEY, M. A. *et al.* Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *Journal of Endocrinology*, v. 223, n. 2, p. R41–R48, 2014.

FARIA, A. *et al.* Interplay between anthocyanins and gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 29, p. 6898–6902, 2014.

FEI, N.; ZHAO, L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME Journal*, v. 7, n. 4, p. 880–884, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.153>>.

FERNA, M. Circulating Zonulin , a Marker of Intestinal Permeability , Is Increased in Association with Obesity-Associated Insulin Resistance. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. 1–4, 2012.

FILIPPO, C. DE *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS*, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.

FONTANÉ, L. *et al.* Influence of the microbiota and probiotics in obesity. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, v. 30, n. 6, p. 271–279, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.03.004>>.

FROHLICH, J.; DOBIÁŠOVÁ, M. Fractional Esterification Rate of Cholesterol and Ratio of Triglycerides to HDL-Cholesterol Are Powerful Predictors of Positive Findings on Coronary Angiography. *Clinical Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 1873–1880, 2003.

FUKUGAITI, M. H. *et al.* High occurrence of fusobacterium nucleatum and clostridium difficile in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1135–1140, 2015.

FUKUI, H. Stomach and Colon : Review Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function : Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflammatory Intestinal*

Diseases, v. 1, p. 135–145, 2016.

GARCÍA-BARRADO, M. J. *et al.* Role of flavonoids in the interactions among obesity, inflammation, and autophagy. *Pharmaceuticals*, v. 13, n. 11, p. 1–26, 2020.

GATTUSO, G. *et al.* Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, v. 12, p. 1641–1673, 2007.

GEERLINGS, S. Y. *et al.* Akkermansia muciniphila in the Human Gastrointestinal Tract : When , Where , and How ? *Microorganisms*, v. 6, n. 75, p. 1–26, 2018.

GELONEZE B, REPETTO EM, GELONEZE SR, TAMBASCIA MA, E. M. The threshold value for insulin resistance (HOMAIR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005.

GELONEZE, B. *et al.* HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 53, n. 2, p. 281–287, 2009.

GENTILE, C. L.; WEIR, T. L. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*, v. 362, n. 6416, p. 776–780, 2018.

GOMES, A. C.; HOFFMANN, C.; MOTA, J. F. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*, v. 9, n. 4, p. 308–325, 2018.

GOOSSENS, G. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*, v. 10, n. 3, p. 207–215, 2017.

GRUNDY, S. M. *et al.* 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. [S.l: s.n.], 2019. v. 139.

GUERGOLETTTO, K. B. *et al.* In vitro fermentation of juçara pulp (Euterpe edulis) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*, v. 196, p. 251–258, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>>.

GUO, X. *et al.* Green tea polyphenols reduce obesity in high-fat diet-induced mice by modulating intestinal microbiota composition. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 8, p. 1723–1730, 2017.

HANAK, V. *et al.* Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the low-density lipoprotein phenotype B. *American Journal of Cardiology*, v. 94, n. 2, p. 219–222, 2004.

HARDMAN, W. E. Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice*, v. 8, n. 3, p. 233–240, 2014.

HE, C. *et al.* High-fat diet induces dysbiosis of gastric microbiota prior to gut microbiota in association with metabolic disorders in mice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. APR, p. 1–9, 2018.

HEENEY, D. D.; MARCO, M. L.; BIOLOGY, C. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 49, n. 530, p. 140–147, 2019.

HICHAMI, N. . M. S. K. K. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols. *Molecules*, v. 26, n. 985, p. 1–15, 2021.

HIDALGO, M. *et al.* Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 15, p. 3882–3890, 2012.

HILLMAN, E. T. *et al.* Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environments*, v. 32, n. 4, p. 300–313, 2017.

HOLLANDS, W. J. *et al.* 4-Week consumption of anthocyanin-rich blood orange juice does not affect LDL-cholesterol or other biomarkers of CVD risk and glycaemia compared with standard orange juice: A randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, v. 119, n. 4, p. 415–421, 2018.

HOLT, E. M. *et al.* Relation to Markers of Inflammation and. *YJADA*, v. 109, n. 3, p. 414–421, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2008.11.036>>.

HUANG, K. *et al.* Effect of embryo-remaining oat rice on the lipid profile and intestinal microbiota in high-fat diet fed rats. *Food Research International*, v. 129, p. 108816, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108816>>.

IBGE. *Pesquisa nacional de saúde : 2019 : atenção primária à saúde e informações antropométricas.* . [S.l: s.n.], 2019.

ICHIYANAGI, T. *et al.* Effect on both aglycone and sugar moiety towards Phase II metabolism of anthocyanins. *Food Chemistry*, v. 110, n. 2, p. 493–500, 2008.

IEBBA, V. *et al.* Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiologica*, p. 1–12, 2016.

IJAZ, M. U. *et al.* Meat Protein in High-Fat Diet Induces Adipogenesis and Dyslipidemia by Altering Gut Microbiota and Endocannabinoid Dysregulation in the Adipose Tissue of Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 13, p. 3933–3946, 2020.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.*

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.* . [S.l: s.n.], , 2006

JAMAR, G.; PISANI, L. P. Contribution of anthocyanin-rich foods in obesity control through gut microbiota interactions. *BioFactors*, p. 1–10, 2017.

JANDHYALA, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

JANSSEN, A. W. F.; KERSTEN, S. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB Journal*, v. 29, n. 8, p. 3111–3123, 2015.

JAYARATHNE, S. *et al.* Protective Effects of Anthocyanins in Obesity-Associated Inflammation and Changes in Gut Microbiome. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 1900149, p. 1–18, 2019.

JAYARATHNE, S. *et al.* Tart Cherry Reduces Inflammation in Adipose Tissue of Zucker Fatty Rats and Cultured 3T3-L1 Adipocytes. *Nutrients*, v. 10, n. 1576, 2018.

JELLIFFE DB. *The assessment of the nutritional status of the community*. . [S.l: s.n.], 1966.

JI-CHAO, Z.; XIAO-WEI, Z. Akkermansia muciniphila : a promising target for the therapy of metabolic syndrome and related diseases. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 17, n. 11, p. 835–841, 2019. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(19\)30101-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(19)30101-3)>.

JIALAL, I.; KAUR, H.; DEVARAJ, S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: A translational perspective. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 99, n. 1, p. 39–48, 2014.

JIANG, N. *et al.* Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review. *Frontiers of Medicine*, v. 13, n. 3, p. 314–329, 2019.

JINATHAM, V. *et al.* Comparison of gut microbiota between lean and obese adult Thai individuals. *Microbiology and Biotechnology Letters*, v. 46, n. 3, p. 277–287, 2018.

JOHNSON, E. L. *et al.* Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*, v. 95, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00109-016-1492-2>>.

KAHN, C. R.; WANG, G.; LEE, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, v. 129, n. 10, p. 3990–4000, 2019.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KALLIOMÄKI, M. *et al.* Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, n. 3, p. 534–538, 2008.

KANG, Y.; CAI, Y. Gut microbiota and obesity: Implications for fecal microbiota transplantation therapy. *Hormones*, v. 16, n. 3, p. 223–234, 2017.

KAY, C. D. *et al.* Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition*, v. 91, n. 6, p. 933–942, 2004.

KELLEY, D. S. *et al.* Nutrition and Disease Consumption of Bing Sweet Cherries Lowers Circulating Concentrations of Inflammation Markers in Healthy Men and Women 1, 2. *Nutrition and Disease*, n. April, p. 981–986, 2018.

KELLY, T. *et al.* Gut Microbiome Associates With Lifetime Cardiovascular Disease Risk Profile Among Bogalusa Heart Study Participants Tanika. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

KHAN, M. J. *et al.* Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *Journal of Obesity*, v. 2016, 2016.

KNEKT, P. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases 1,2. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, p. 560–568, 2002.

KOSKA, J. *et al.* A human model of dietary saturated fatty acid induced insulin resistance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 65, n. 11, p. 1621–1628, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2016.07.015>>.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 15, n. 9, p. 639–660, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.75>>.

LE ROY, C. I. *et al.* Red Wine Consumption Associated With Increased Gut Microbiota α -Diversity in 3 Independent Cohorts. *Gastroenterology*, v. 158, n. 1, p. 270–272.e2, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.024>>.

LEE, M. K. S. *et al.* The modern interleukin-1 superfamily: Divergent roles in obesity. *Seminars in Immunology*, v. 28, n. 5, p. 441–449, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.001>>.

LEE, S. *et al.* Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota , Inflammation , and Insulin Resistance in High-Fat-Diet – Fed Rats. *The Journal of Nutrition*, p. 209–219, 2018.

LESER, T. D.; MØLBAK, L. Better living through microbial action: The benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 9, p. 2194–2206, 2009.

LEY, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504978102>>.

LI, H. *et al.* Synergic interactions between polyphenols and gut microbiota in mitigating inflammatory bowel diseases. *Food and Function*, v. 11, n. 6, p. 4878–4891, 2020.

LI, K. L. *et al.* Alterations of intestinal flora and the effects of probiotics in children with

recurrent respiratory tract infection. *World Journal of Pediatrics*, v. 15, p. 255–261, 2019.

LI, LI *et al.* Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Scientific Reports*, v. 4, n. 6234, p. 1–11, 2014.

LI, LU; LYALL, G. K.; MARTINEZ-BLAZQUEZ, J. A.; *et al.* Blood Orange Juice Consumption Increases Flow-Mediated Dilation in Adults with Overweight and Obesity: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition*, p. 1–8, 2020.

LI, LU; LYALL, G. K.; ALBERTO MARTINEZ-BLAZQUEZ, J.; *et al.* Blood orange juice consumption increases flow-mediated dilation in adults with overweight and obesity: A randomized controlled trial. *Journal of Nutrition*, v. 150, n. 9, p. 2287–2294, 2020.

LICCIARDELLO, F. *et al.* Contribution of blood orange-based beverages to bioactive compounds intake. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, n. AUG, p. 1–11, 2018.

LIM, H. J.; SHIN, H. S. Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of Bifidobacterium Strains : A Review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 12, p. 1793–1800, 2020.

LIMA, A. C. D. *et al.* Effect of Daily Consumption of Orange Juice on the Levels of Blood Glucose, Lipids, and Gut Microbiota Metabolites: Controlled Clinical Trials. *Journal of Medicinal Food*, v. 22, n. 2, p. 202–210, 2019.

LIMA, M.; DOS SANTOS SOUZA, C.; PEDERASSI, J. Qual Índice de Diversidade Usar? *Cadernos UniFOA*, n. 30, p. 129–138, 2016.

LIU, T. *et al.* Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe*, v. 18, n. 3, p. 331–337, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.02.004>>.

LIU, T. W. *et al.* Nondigestible fructans alter gastrointestinal barrier function, gene expression, histomorphology, and themicrobiota profiles of diet-induced obese C57BL/6J Mice. *Journal of Nutrition*, v. 146, n. 5, p. 949–956, 2016.

LIU, W. *et al.* Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates inflammation and adiposity by modulating gut microbiota in high-fat diet mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 61, n. 9, p. 1–33, 2017.

LIU, Z. *et al.* Novel role of hesperidin improve obesity in HFD mice by modulating the composition of the gut microbiota. 2020.

LÓPEZ-MORENO, J. *et al.* Effect of Dietary Lipids on Endotoxemia Influences Postprandial Inflammatory Response. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 35, p. 7756–7763, 2017.

LOPEZ-SILES, M. *et al.* Alterations in the Abundance and Co-occurrence of Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease

Subjects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* |, v. 8, n. September, 2018.

LU, J. F. *et al.* Neohesperidin attenuates obesity by altering the composition of the gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *FASEB Journal*, v. 34, n. 9, p. 12053–12071, 2020.

LUMENG, C. N. Innate Immune Activation in Obesity Carey. *Mol Aspects Med.*, v. 34, n. 1, p. 12–29, 2013.

LV, Y. *et al.* The Association between Gut Microbiota Composition and Body Mass Index in Chinese Male College Students , as Analyzed by Next-generation Sequencing. *The British journal of nutrition*, v. 122, p. 986–995, 2019.

MAGALHÃES, M. L. *et al.* Effects of Moro orange juice (*Citrus sinensis* (L .) Osbeck) on some metabolic and morphological parameters in obese and diabetic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n. July, p. 1–11, 2020.

MANACH, C. *et al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230–242, 2005.

MARIE A. HILDEBRANDT, CHRISTIAN HOFFMAN, SCOTT A. SHERRILL-MIX, SUE A. KEILBAUGH, MICAH HAMADY, YING-YU CHEN, ROB KNIGHT, REXFORD S. AHIMA, FREDERIC BUSHMAN, AND G. D. W. High Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*, v. 137, n. 1, p. 24.e1-24.e2, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706296>>.

MARIIA ISABEL QUEIPO-ORTUNO, MARIA BOTO-ORDONEZ, MORA MURRI, J. M. G.-Z.; MERCEDES CLEMENTE-POSTIGO, RAMON ESTRUCH, FERNANDO CARDONA DIAZ, CRISTINA ANDRES-LACUEVA, AND F. J. T. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 95, p. 1323–1334, 2012.

MARÍN, L. *et al.* Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism : Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–18, 2015.

MAS-CAPDEVILA, A. *et al.* Effect of hesperidin on cardiovascular disease risk factors: The role of intestinal microbiota on hesperidin bioavailability. *Nutrients*, v. 12, n. 5, 2020.

MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, T. R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, v. 28, p. 412– 9., 1985.

MAYTA-APAIZA, A. C. *et al.* Impact of tart cherries polyphenols on the human gut microbiota and phenolic metabolites in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 17, p. #pagerange#, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.001>>.

MCCAFFERTY, B. J.; HILL, J. O.; GUNN, A. J. Obesity: Scope, Lifestyle Interventions, and Medical Management. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, v. 23, n. 1, 2020.

MENEZES, E. W. *et al.* In Vitro Colonic Fermentation and Glycemic Response of Different Kinds of Unripe Banana Flour. *Plant Foods Hum Nutr* (2010), n. 65, p. 379–385, 2010.

MESQUITA, E.; MONTEIRO, M. Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice. *Food Research International journal*, v. 106, p. 54–63, 2018.

MILLION, M. *et al.* Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International Journal of Obesity*, v. 36, n. 6, p. 817–825, 2012.

MONK, J. M. *et al.* Fish oil supplementation to a high-fat diet improves both intestinal health and the systemic obese phenotype. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 72, p. 108216, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.07.007>>.

MOORTHY, M.; SUNDRALINGAM, U. Polyphenols as Prebiotics in the Management of High-Fat Diet-Induced Obesity : A Systematic Review of Animal Studies. *Foods*, v. 10, n. 299, p. 1–34, 2021.

MOREIRA, V. *et al.* Orange juice affects acylcarnitine metabolism in healthy volunteers as revealed by a mass-spectrometry based metabolomics approach. *Food Research International*, v. 107, n. February, p. 346–352, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.046>>.

MORGAN, X. C. *et al.* Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, v. 13, n. R79, p. 1–18, 2012.

MOZAFFARIAN, DARIUSH; HY WU, J. Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways. *Circ Res.*, v. 122, n. 2, p. 369–384, 2018.

MUJICO, J. R. *et al.* Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*, v. 110, n. 4, p. 711–720, 2013.

MURALIDHARA, D. Understanding The Physiology Of Adipose Tissue: A Key To Combat Obesity? *Journal Of Obesity Management*, v. 1, n. 2, p. 1–15, 2016.

MUROTA, K.; NAKAMURA, Y.; UEHARA, M. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 82, n. 4, p. 600–610, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>>.

NAGPAL. RAVINDER, NEWMAN. TIFFANY M, WANG. SHAOHUA, JAIN. SHALINI, L. J. F. AND Y. H. Obesity-Linked Gut Microbiome Dysbiosis Associated with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet. *Journal of Diabetes Research*, v. 2018, 2018. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L625711774%0Ahttp://dx.doi.org/10.1155/2018/3462092>>.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. New powers of brown fat: Fighting

the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 3, p. 238–240, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.009>>.

NISHIOKA, A. *et al.* Stratification of volunteers according to flavanone metabolite excretion and phase ii metabolism profile after single doses of ‘pera’ orange and ‘moro’ blood orange juices. *Nutrients*, v. 13, n. 2, p. 1–21, 2021.

NODA, S.; TANABE, S.; SUZUKI, T. Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 18, p. 4628–4633, 2012.

OTTOSSON, F. *et al.* Connection between BMI-Related Plasma Metabolite Profile and Gut Microbiota. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 103, n. 4, p. 1491–1501, 2018.

PADOVANI, R. M. *et al.* Dietary reference intakes: Application of tables in nutritional studies. *Revista de Nutricao*, v. 19, n. 6, p. 741–760, 2006.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009.

PARHIZ, H. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin : An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytotherapy Research*, n. August, 2014.

PARKER, B. J. *et al.* The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. June, p. 1–15, 2020.

PATSALOS, O.; DALTON, B.; HIMMERICH, H. E ff ects of IL-6 Signaling Pathway Inhibition on Weight and BMI : A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 6290, 2020.

PATTERN, H. P. D. *et al.* Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? *Nutrients*, v. 11, n. 1355, p. 1–55, 2019.

PATTERSON, E. *et al.* Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *British Journal of Nutrition*, v. 111, n. 11, p. 1905–1917, 2014.

PEIRÓ, C. *et al.* IL-1 β inhibition in cardiovascular complications associated to diabetes mellitus. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.

PELUSO, I.; RAGUZZINI, A.; SERAFINI, M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF- α and IL-6 in humans: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 57, n. 5, p. 784–801, 2013.

PENG, Y. *et al.* Effects of long-term intake of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray on the organism health and gut microbiota in vivo. *Food Research International*, v. 130, n. December

2019, 2020.

PEREIRA-CARO, G. *et al.* Catabolism of citrus flavanones by the probiotics *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus*. *European Journal of Nutrition*, v. 57, n. 1, p. 231–242, 2018.

PEREZ, N. B.; DORSEN, C.; SQUIRES, A. Dysbiosis of the Gut Microbiome: A Concept Analysis. *Journal of Holistic Nursing*, v. 38, n. 2, p. 223–232, 2020.

PETERSEN, C. *et al.* Dietary supplementation with strawberry induces marked changes in the composition and functional potential of the gut microbiome in diabetic mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 66, p. 63–69, 2019.

PETERSON, J. J. *et al.* Flavanones in oranges , tangerines (mandarins), tangors , and tangelos : a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 66–73, 2006.

PNG, C. W. *et al.* Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria. *The American Journal of GASTROENTEROLOGY*, n. June, p. 1–9, 2010.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RAJILI, M.; VOS, W. M. DE. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev*, v. 38, p. 996–1047, 2014.

RAMPERSAUD, G. C.; VALIM, M. F. *100% citrus juice: Nutritional contribution, dietary benefits, and association with anthropometric measures*. [S.l: s.n.], 2017. v. 57.

REILLY, J. O. *et al.* Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 93, p. 338–347, 2011.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 13, n. 11, p. 633–643, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>>.

RIBEIRO, C.; DOURADO, G.; CESAR, T. Orange juice allied to a reduced-calorie diet results in weight loss and ameliorates obesity-related biomarkers: A randomized controlled trial. *Nutrition*, v. 38, p. 13–19, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.12.020>>.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, v. 7, n. 1, 2019.

RIZZO, M. Bergamot Reduces Plasma Lipids , Atherogenic Small Dense LDL , and Subclinical Atherosclerosis in Subjects with Moderate Hypercholesterolemia: A 6 Months Prospective Study. *Frontiers in Pharmacology*, v. 6, n. January, p. 1–9, 2016.

ROGERO, MARCELO MACEDO AND CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like

Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, v. 10, n. 432, p. 1–19, 2018.

ROOPCHAND, D. E. *et al.* Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes*, v. 64, n. 8, p. 2847–2858, 2015.

ROSENBERG, E. *et al.* The prokaryotes: Human microbiology. *The Prokaryotes: Human Microbiology*, p. 1–554, 2013.

ROSSI, M. *et al.* Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environmental Microbiology Reports* (2016), v. 8, n. 3, p. 399–406, 2016.

ROÿTIÖ, H. *et al.* Dietary intake of fat and fibre according to reference values relates to higher gut microbiota richness in overweight pregnant women. *British Journal of Nutrition*, v. 118, n. 5, p. 343–352, 2017.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology*, v. 31, n. 4, p. 283–293, 2016.

SANTACRUZ, A. *et al.* Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *British Journal of Nutrition*, v. 104, n. 1, p. 83–92, 2010.

SCAGLIUSI, F. B.; LANCHA JÚNIOR, A. H. Subnotificação da ingestão energética na avaliação do consumo alimentar. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 4, p. 471–481, 2003.

SCHNEEBERGER, M. *et al.* *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Nature Publishing Group*, n. November, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep16643>>.

SCHWIERTZ, A. *et al.* Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, v. 18, n. 1, p. 190–195, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.167>>.

SEONG, C. N. *et al.* Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *Journal of Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 1–10, 2018.

SESSO, H. D. *et al.* Associations of Dietary Flavonoids with Risk of Type 2 Diabetes, and Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Women: A Prospective Study and Cross-Sectional Analysis Associations of Dietary. *Journal of the American College of Nutrition*, n. September 2013, p. 37–41, 2005.

SHIN, N.; WHON, T. W.; BAE, J. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>>.

SINGH, R. K. *et al.* Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 109, n. 6, p. 1–76, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 116, n. 1, p. 160–212, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretrizes. Diabetes Mellitus Tipo 1 e Tipo 2*. [S.l: s.n.], 2019.

SOKOL, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 43, p. 16731–16736, 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804812105>>.

STANISLAWSKI, M. A. *et al.* Gut microbiota phenotypes of obesity. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41522-019-0091-8>>.

STEVENS, Y. *et al.* The Intestinal Fate of Citrus Flavanones and Their Effects on Gastrointestinal Health. *Nutrients*, v. 11, n. 1464, 2019.

STRAUSS, J. *et al.* Phenotypic and genotypic analyses of clinical Fusobacterium nucleatum and Fusobacterium periodonticum isolates from the human gut. *Anaerobe*, v. 14, n. 6, p. 301–309, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.12.003>>.

STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin , a regulator of epithelial and endothelial barrier functions , and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*, v. 4, n. 4, p. 1–19, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/21688370.2016.1251384>>.

SUN, Q. *et al.* Gut microbiota metabolites of dietary lignans and risk of type 2 diabetes: A prospective investigation in two cohorts of U.S. women. *Diabetes Care*, v. 37, n. 5, p. 1287–1295, 2014.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, n. 1, p. 63–68, jan. 1959.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. Kishimoto 1989, 2014.

THINGHOLM, L. B. *et al.* Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show

Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host Microbe*, v. 26, n. 2, p. 252–264, 2020.

TRESSERRA-RIMBAU, A. *et al.* Intake of total polyphenols and some classes of polyphenols is inversely associated with diabetes in elderly people at high cardiovascular disease risk. *Journal of Nutrition*, v. 146, n. 4, p. 767–777, 2016.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, v. 2, p. 1231–1246, 2010.

TSENG, C. H.; WU, C. Y. The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association*, v. 118, p. S3–S9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.009>>.

TURNBAUGH, PETER J; BACKHED, FREDRIK; FULTON, LUCINDA; GORDON, J. I. Marked alterations in the distal gut microbiome linked to diet- induced obesity. *Cell Host Microbe.*, v. 3, n. 4, p. 213–223, 2008.

TURNBAUGH, PETER J.; RIDAURA, VANESSA K; FAITH, JEREMIAH J; REY, FEDERICO, E; KNIGHT, ROB; GORDON, J. I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine*, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3129>>.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* A core gut microbiome between lean and obesity twins. *Nature*, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TURRONI, F. *et al.* Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: A Lactobacillus and Bifidobacterium perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, n. 2, p. 183–203, 2014.

TZOUNIS, X. *et al.* Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 93, n. 1, p. 62–72, 2011.

UNAMUNO, X. *et al.* Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 48, n. 9, p. 1–11, 2018.

VAN DE WOUW, M. *et al.* Microbiota-gut-brain axis: Modulator of host metabolism and appetite. *Journal of Nutrition*, v. 147, n. 5, p. 727–745, 2017.

VAN DUYNHOVEN, J. *et al.* Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4531–4538, 2011.

VAZQUEZ-MORENO, M. *et al.* Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children. *Pediatric Obesity*, v. 16, n. 5, 2021.

VENDRAME, S. *et al.* Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases Bifidobacteria in the human gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 24, p. 12815–12820, 2011.

VENDRAME, S. *et al.* Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, n. 8, p. 1508–1512, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.010>>.

VILLARROYA, F. *et al.* Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 284, n. 5, p. 492–504, 2018.

VLASOVA, A. N. *et al.* Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 172, n. 330, p. 72–84, 2017.

WAN, M. L. Y. *et al.* Influence of functional food components on gut health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1433629>>.

WANG, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME Journal*, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.99>>.

WANG, M. *et al.* Citrus flavonoids and the intestinal barrier: Interactions and effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 20, n. 1, p. 225–251, 2021a.

WANG, M. *et al.* Citrus flavonoids and the intestinal barrier: Interactions and effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 20, n. 1, p. 225–251, 2021b.

WEDICK, N. M. *et al.* Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 95, n. 4, p. 925–933, 2012.

WHO. *Obesity and overweight*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 1 nov. 2020.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, v. 104, n. SUPPL.3, p. 48–66, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Report of a World Health Organization Consultation.*, p. 256, 2000.

WU, G. D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 2011.

WU, T. *et al.* Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice. *International Journal Food Sciences and Nutrition*, v. 7486, n. 3, p. 351–359, 2014.

YAMADA, T. *et al.* Frequency of Citrus Fruit Intake Is Associated With the Incidence of Cardiovascular Disease : The Jichi Medical School Cohort Study. *Journal of Epidemiology*, v. 21, n. 3, p. 169–175, 2011.

YEUM, K. Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. *Nutrients*, v. 9, n. 1089, p. 1–15, 2017.

ZATTERALE, F. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Frontiers in Physiology*, v. 10, n. January, p. 1–20, 2020.

ZENG, Q. *et al.* Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity- related metabolic abnormalities. *Scientific Reports*, n. December 2018, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-49462-w>>.

ZHANG, S.; CAI, S.; MA, Y. Association between *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: Progress and future directions. *Journal of Cancer*, v. 9, n. 9, p. 1652–1659, 2018.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JÖNSSON, J. Å. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, v. 682, p. 674–682, 2006.

ZHU, L. *et al.* Berberine treatment increases *Akkermansia* in the gut and improves high-fat diet-induced atherosclerosis in Apoe^{−/−} mice. *Atherosclerosis*, v. 268, p. 117–126, 2018.

ZHU, Y *et al.* Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia : A randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, p. 843–849, 2013.

ZHU, YONGSHENG *et al.* Metabolism and prebiotics activity of anthocyanins from black rice (*Oryza sativa* L.) in vitro. *PLoS ONE*, v. 13, n. 4, p. 1–15, 2018.

ZIĘTAK, M.; CHABOWSKA-KITA, A.; KOZAK, L. P. Brown fat thermogenesis: Stability of developmental programming and transient effects of temperature and gut microbiota in adults. *Biochimie*, v. 134, p. 93–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.006>>.

ANEXOS

ANEXO 1. PARECER DO CEP



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
 Comitê de Ética em Pesquisa



DATA DA ENTRADA: 08 de Setembro de 2016.

DATA DA AVALIAÇÃO: 04 de Outubro de 2016.

CAAE : 59663816.8.0000.5462

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4699

(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Investigadora Principal: Carlos Daniel Magnoni

Nº Total de Sujeitos no Centro:

Nº Total de Sujeitos no Brasil:

Nº Total de Sujeitos no Estudo:

Área Temática Especial: não se aplica

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde

Fase: Não se aplica

Duração do Estudo: 12 meses

Apoio/ Patrocinador: Recurso próprio

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

CEP Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Projeto de Pesquisa Clínica: "EFEITO DOS SUCOS DE LARANJA PÊRA E LARANJA SANGUÍNEA NA CAPACIDADE FUNCIONAL DOS MONÓCITOS, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO, EM INDIVÍDUOS COM RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA".

Considerações/Comentários: Trata-se de estudo clínico para avaliar os efeitos do consumo de suco de laranja, como uma terapia coadjuvante no tratamento da resistência à insulina e os possíveis mecanismos inflamatórios e metabólicos envolvidos.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Agência Nacionais de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa **avaliou e aprovou** o Projeto de Pesquisa.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa



- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacionais de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

1. Todas as declarações entregues;
2. Protocolo de pesquisa aprovado;
3. TCLE aprovado;
4. Questionário de Avaliação Nutricional aprovado.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita:

- a) Comunicar qualquer alteração no projeto e/ou TCLE.
- b) Comunicar qualquer evento adverso sério ocorrido durante a condução do estudo.
- c) Elaborar e apresentar ao CEP relatórios semestrais e relatório final sobre o andamento da pesquisa.

Situação: Projeto avaliado e aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em reunião ordinária realizada no dia 04 de Outubro de 2016.

São Paulo, 11 de Outubro de 2016.

Dr. Pedro Silvio Farsky
 Coordenador CEP
 CRM 55073
Dr. Pedro Silvio Farsky
 Coordenador do CEP
 Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

ANEXO 2 - TCLE



Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Av. Dr. Dante Pazzanese 500 Ibirapuera ☎ 04012-909
☎ Nutrição - 5085-6080 e-mail: nutricao@dantepazzanese.org.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:

“Efeito dos sucos de laranja pêra e laranja sanguínea na capacidade funcional dos monócitos, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, em indivíduos com resistência à ação da insulina.”

Justificativa do Estudo: A cada ano aumenta o número de casos de diabetes mellitus em todo o mundo e cada vez mais são estudadas novas terapias, já que a doença apresenta difícil controle e relação direta com o surgimento de complicações. A laranja sanguínea contém antioxidantes que podem ser benéficos no metabolismo de pacientes com resistência à insulina, o que pode prevenir ou retardar o desenvolvimento do diabetes mellitus.

Objetivos da Pesquisa: Investigar os efeitos dos sucos de laranja pêra e laranja sanguínea sobre os pacientes com diagnóstico de resistência à insulina.

Procedimentos que serão efetuados: Serão realizadas 4 visitas, com intervalo aproximado de duas semanas entre as mesmas.

Em todas as visitas será realizada uma entrevista com duração aproximada de 30 minutos. Serão realizadas perguntas sobre o seu estado de saúde, hábitos, problemas de saúde e sobre a sua alimentação. Além da entrevista, serão realizadas medidas de peso, altura, circunferência da cintura, conforme descrito a seguir:

Peso: Você será pesado sem os sapatos e com roupas leves.

Altura: Você será colocado descalço, sobre a plataforma da balança, de costas para o marcador, com os pés unidos, em posição reta e olhando para frente.

Circunferência abdominal: Será realizada utilizando-se fita métrica.

Também será solicitada a coleta de sangue, para fazer uma avaliação dos níveis de colesterol e açúcar no sangue, e a coleta de urina e fezes, que o sr. (a) realizará em sua casa e trará nos dias de visita. O exame de sangue será realizado pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. A pessoa que coletará o seu sangue trabalha no laboratório do hospital e é habilitada a utilizar os procedimentos adequados para não haver riscos para o(a) sr(a). Para a realização dos exames laboratoriais, o(a) sr.(a) deverá dar também o seu consentimento.

O suco de laranja pêra será entregue na primeira visita. Você receberá 3 litros de suco para iniciar o tratamento e o restante será entregue em sua residência. Você deverá ingerir 400 ml do suco por dia, durante 15 dias, para posterior análise.

Após a 2ª (segunda) visita, será realizada uma pausa de 4 semanas, e na 3ª (terceira) visita, você receberá o suco de laranja sanguínea, sendo parte entregue no momento da entrevista e o restante na sua residência. Este suco também deverá ser consumido durante 15 dias, sendo 400 ml/dia.

Desconforto e riscos esperados: Há a possibilidade de ocorrer um pequeno desconforto no momento da coleta de sangue, devido a picada de agulha da seringa. Mas esse desconforto é momentâneo.

Benefícios esperados: Você não terá benefícios diretos com esta pesquisa, mas irá contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos do uso da laranja sanguínea sobre a saúde das pessoas com resistência à insulina.

Efeitos adversos: Não são previstos efeitos adversos ao estudo, já que os sucos de laranja utilizados são 100% naturais e sem aditivos ou conservantes. De qualquer forma, está garantido seu direito de indenização diante de eventuais danos decorrentes da intervenção.

Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, caso o(a) sr(a) tenha qualquer dúvida, o sr(a) pode me perguntar ou entrar em contato com os pesquisadores envolvidos nesta pesquisa ou com o Comitê de ética em Pesquisa, órgão responsável pelo esclarecimento de dúvidas relativas aos procedimentos éticos da pesquisa e pelo acolhimento de eventuais denúncias quanto à condução do estudo.

Contato dos profissionais responsáveis pela pesquisa:

Dr. Carlos Daniel Magnoni – Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 – 9º andar. São Paulo/SP

Telefone: 11-5085-6080

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo -Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 14. São Paulo/SP

Telefone: [11-3091-0128](tel:11-3091-0128)

Comitê de Ética

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CONEP)

SEPN 510 NORTE, BLOCO A, 3º Andar

Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

CEP: 70750-521 - Brasília-DF

Direito de atualização sobre resultados: Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento do pesquisador.

Privacidade: A sua participação será mantida em completo sigilo. Todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e serão usadas somente com fins científicos. As informações coletadas na entrevista ou nas amostras de sangue serão identificadas apenas através do código, sem nenhuma identificação pessoal.

Os dados pessoais e os termos de consentimento serão mantidos em total segurança e apenas a coordenação da pesquisa terá acesso a essas informações. Os seus dados de identificação serão mantidos em sigilo, e só serão utilizados para fins científicos.

Gastos com a pesquisa: O (a) Sr.(a) não terá nenhum custo por participar da pesquisa. Os gastos com transporte e lanche (nos dias de exame de sangue), serão ressarcidos pela pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Efeito dos sucos de laranja pêra e laranja sanguínea na capacidade funcional dos monócitos, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, em indivíduos com resistência à ação da insulina.”**

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do participante

Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

ANEXO 3- FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
NUTRIÇÃO CLÍNICA

**Avaliação Nutricional – Projeto Laranja Moro**

Data: ____/____/____ Prontuário IDPC: _____ Tel.: (____) _____
 Nome: _____ Gênero: ☐ M ☐ F Idade: ____ anos
 E-mail: _____

HISTÓRIA CLÍNICA

Antecedentes pessoais	Observações	A. Familiar
Obesidade	tempo: _____ ☐ meses ☐ anos	☐ Não ☐ Sim
DM	tempo: _____ ☐ meses ☐ anos	☐ Não ☐ Sim
HAS	tempo: _____ ☐ meses ☐ anos	☐ Não ☐ Sim
DLP	tempo: _____ ☐ meses ☐ anos	☐ Não ☐ Sim
IAM	ano: _____	☐ Não ☐ Sim
AVC	ano: _____	☐ Não ☐ Sim
DRC	tempo: _____ ☐ meses ☐ anos	
ICC	tempo: _____ ☐ meses ☐ anos	
CATE	ano: _____	
Angioplastia	ano: _____	
Cirurgia Cardíaca	ano: _____	
Outros	obs.: _____	

Hábito Intestinal: ☐ Normal ☐ Constipação ☐ Diarréia **Apetite:** ☐ Normal ☐ Aumentado ☐ Inapetente

Edema: ☐ Sim ☐ Não **Hidratação:** ☐ < 1L/dia ☐ 1 a 2L/dia ☐ > 2L/dia **RH:** _____ ml/dia

Atividade Física: ☐ Não ☐ Sim **Tipo:** _____

Frequência: ☐ 1-2x/sem ☐ 3-4x/sem ☐ 5-7x/sem

Duração: ☐ <30 min ☐ 30-60 min. ☐ >1h

Bebida Alcoólica: ☐ Não ☐ Sim **Tipo:** ☐ Cerveja ☐ Vinho ☐ Destilados **Frequência:** ☐ Diária ☐ Semanal ☐ Mensal

☐ Social **Medida:** ☐ Shot ☐ Taça ☐ Copo ☐ Latas ☐ Garrafa

Quantidade: ☐ 1 a 3 doses ☐ 4 a 6 doses ☐ 7 a 10 doses ☐ >10 doses

Fumante: ☐ Não ☐ Sim: _____ cigarros/dia ☐ Ex-tabagista (parou há ____ anos)

ANTROPOMETRIA

Parâmetro	Visitas			
	1º: ____/____/____	2º: ____/____/____	3º: ____/____/____	4º: ____/____/____
Peso atual (kg)				
Circunferência da cintura (cm)				
Altura (m)				
IMC (kg/m²)				
Classificação IMC				
Pressão arterial (mmHg)				

Observações:

EXAMES BIOQUÍMICOS

Exame	Visitas			
	1º: / /	2º: / /	3º: / /	4º: / /
Glicemia jejum (mg/dL)				
Triglicérides (mg/dL)				
Colesterol total (mg/dL)				
LDL-C (mg/dL)				
HDL-C (mg/dL)				
HbA1c (%)				

MEDICAMENTOS

Ação	Medicamentos	Dosagem	Quant/dia	Tempo (uso)
Hipolipemiantes	ESTATINAS Mantida: ☐ Sim ☐ Suspenso ☐ Troca ☐ Sinva ☐ Atorva ☐ Rosuva ☐ Pita	☐ 2 ☐ 4 ☐ 10 ☐ 20 ☐ 40 ☐ 80	☐ 1	___ ☐ meses ☐ anos
	FIBRATOS Mantida: ☐ Sim ☐ Suspenso ☐ Troca ☐ Beza ☐ Cipro ☐ Feno	☐ 100 ☐ 145 ☐ 160 ☐ 200	☐ 1	___ ☐ meses ☐ anos
	Ezetimibe Mantida: ☐ Sim ☐ Suspenso	☐ 10	☐ 1	___ ☐ meses ☐ anos
Hipoglicemiantes	BIGUANIDAS ☐ Metformina ☐ Glifage	☐ 850 ☐ 500	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4	___ ☐ meses ☐ anos
	SULFONILUREIAS ☐ Gliclazida ☐ Glimepirida ☐ Glibenclamida	☐ 30 ☐ 60 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 4 ☐ 5	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4	___ ☐ meses ☐ anos
	OUTROS:			___ ☐ meses ☐ anos
Insulina	NPH	___ / ___ / ___	-	___ ☐ meses ☐ anos
	Lantus	___ / ___ / ___	-	___ ☐ meses ☐ anos
	Regular	___ / ___ / ___	-	___ ☐ meses ☐ anos
	Humalog	___ / ___ / ___	-	___ ☐ meses ☐ anos
Antihipertensivos	BETABLOQUEADORES ☐ Atenolol ☐ Carvedilol ☐ Propanolol ☐ Metoprolol			
	INIBIDORES ECA ☐ Captopril ☐ Enalapril			
	BLOQ. CANAL DE CÁLCIO ☐ Anlodipino ☐ Diltiazem			
	BLOQ. RECEPTOR ANGIOTENSINA II ☐ Losartana ☐ Olmesartana ☐ Valsartana			
Anticoagulantes	DIURÉTICOS ☐ Furosemida ☐ Clortalidona ☐ Espironolactona ☐ HCTZ ☐ Bumetanida			
	OUTRO ANTIHIPERTENSIVO ☐ Hidralazina ☐ Metildopa			
	OUTROS :			
Outros	☐ AAS ☐ Cilostazol ☐ Clopidogrel ☐ Dicumarina ☐ Dipiridamol ☐ Pentoxifilina ☐ Ticagrelor ☐ Varfarina ☐ Femprocumona ☐ Heparina			
	OUTROS :			
Renal	☐ Omeprazol ☐ Levotiroxina ☐ Alopurinol ☐ Preditonina ☐ Amiodarona ☐ Issosorbida ☐ Ivabradina ☐ Propatilnitrato			
Observações	☐ Bicarbonato ☐ Carbonato Ca ☐ Eritropoietina ☐ Colecalciferol ☐ Calcitriol ☐ Sulfato Fe			

ANEXO 4 – RECORDATÓRIO DE 24 HORAS



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Seção de Nutrição Clínica
Ambulatório de Nutrição



Data: / /

[illegible]

ANEXO 5 – FICHA DO ALUNO (JANUS)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9132 - 9961534/1 - Aline Alves de Santana

Email: aline_alves@usp.br
 Data de Nascimento: 07/03/1989
 Cédula de Identidade: RG - 44.879.498-2 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharel em Nutrição - Universidade Nove de Julho - São Paulo - Brasil - 2011
 Mestrado: Mestra em Ciências (1) - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado
 Programa: Ciência dos Alimentos
 Área: Nutrição Experimental
 Data de Matrícula: 08/10/2016
 Início da Contagem de Prazo: 08/10/2016
 Data Limite para o Depósito: 01/10/2021
 Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 08/10/2016 até 08/11/2016. Email: jronasci@usp.br
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Franco Maria Lajolo - 09/11/2016 até o presente. Email: fmlajolo@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, 14/09/2016
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 04/12/2018
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 08/10/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
 Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021
 Impresso em: 29/08/2021 22:01:28



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9132 - 9961534/1 - Aline Alves de Santana

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5719-4/1	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	04/08/2017	16/11/2017	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5716-6/4	Atualização em Diabetes Mellitus Tipo 1 e 2 e Síndrome Metabólica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	28/08/2017	01/10/2017	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5725-6/4	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lipídeos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	30/10/2017	03/12/2017	60	4	80	A	N	Concluída
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída
PSP5121-1/5	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	20/02/2018	01/05/2018	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5906-2/1	Análise de Dados de Microbioma	26/02/2018	08/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída
HNT5737-4/1	Ciência de Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	10/05/2018	21/06/2018	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	22
Estágios:			
Total:	0	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 172

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

Impresso em: 29/08/2021 22:01:28

ANEXO 6 – CURRÍCULO LATTES



Aline Alves de Santana

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2263213848580875>

ID Lattes: 2263213848580875

Última atualização do currículo em 29/06/2021

Possui graduação em Nutrição (2010) pela Universidade Nove de Julho com experiência na área de atendimento clínico- ambulatorial com foco em doenças crônicas não-transmissíveis (obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemia e outras). Possui Mestrado em Nutrição (2014) e Especialização em Obesidade (Abordagem Multiprofissional), ambos pela UNIFESP. Aprimorada em Nutrição em Cardiologia pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (2011). Atualmente, é aluna de doutorado em Nutrição Experimental pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e professora da graduação em Nutrição da Universidade Nove de Julho desde 2014 ministrando disciplinas na área clínica e de saúde coletiva (Avaliação Nutricional, Dietoterapia, Nutrição Materno-infantil, Nutrição humana, Epidemiologia Nutricional, Saúde coletiva) e Professora da Especialização em Fisiologia do exercício em doenças crônicas e populações especiais no Módulo de Doenças Metabólicas da Universidade Federal de São Paulo desde 2020. Na Uninove realizou o acompanhamento de alunos nos estágios curriculares de Saúde Coletiva, Nutrição Clínica e Unidade Produtora de Refeição por 5 anos (2014-2019). Foi professora da Graduação em Nutrição (2015) e Professora Visitante em 2016 da Pós-graduação em Nutrição Clínica (Latu sensu) da Faculdade Integrada Coração de Jesus na disciplina de Bases da Nutrição Clínica (Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição). Áreas de maior interesse: Obesidade, alimentos funcionais, compostos bioativos, inflamação. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Aline Alves de Santana
Nome em citações bibliográficas	ALVES, AS; SANTANA, AA.; DE SANTANA, AA.; DE SANTANA, ALINE; SANTANA, ALINE ALVES; DE SANTANA, ALINE A.; SANTANA, ALINE ALVES DE; DE SANTANA, ALINE ALVES; SANTANA, ALINE; SANTANA, ALINE A.
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/2263213848580875

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2016	Doutorado em andamento em Ciências dos Alimentos. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeitos da ingestão do suco de laranja Pera e suco de laranja Moro na microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade., Orientador:  Franco Maria Lajolo. Palavras-chave: Suco de laranja; Compostos bioativos; Flavanonas; Antocianinas; Obesidade; resistência à insulina.
2012 - 2014	Mestrado em Nutrição (Conceito CAPES 6). Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil. Título: Efeitos da ingestão de um extrato de chá verde descafeinado rico em epigallocatequina-3-galato sobre a lipólise de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica., Ano de Obtenção: 2014. Orientador:  Lila Missae Oyama. Coorientador: Fabio dos Santos Lira. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: 1. Epigallocatequina-3-galato; Obesidade; Lipólise; Metabolismo lipídico; tecido adiposo. Grande área: Ciências da Saúde

2011 - 2012	Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição. Especialização em Obesidade, Emagrecimento e Saúde. Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil. Título: Associação entre estilo de vida e perfil metabólico de pacientes obesos de uma Instituto de Cardiologia. Orientador: Fabio dos Santos Lira.
2007 - 2010	Bolsista do(a): Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil. Graduação em Nutrição. Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil. Título: Estudantes de Nutrição : Indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento de transtornos alimentares?.
2007 - 2008	Orientador: Ricardo Monezi Julião de Oliveira. Graduação em Formação Específica em Controle de Qualidade. Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.
2004 - 2006	Ensino Médio (2º grau). Escola Estadual Maria Montessori, EE, Brasil.
2000 - 2003	Ensino Fundamental (1º grau). Escola Estadual Maria Montessori, EE, Brasil.

Formação Complementar

2011	Extensão universitária em Nutrição em Cardiologia. (Carga horária: 840h). Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Brasil.
2020 - 2020	Metabolismo Humano e Obesidade. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2019 - 2019	Curso Online Nutrição Estética Avançada. Instituto Ana Paula Pujol, AP, Brasil.
2018 - 2018	Estratégias avançadas no emagrecimento. (Carga horária: 20h). Instituto Ana Paula Pujol, AP, Brasil.
2018 - 2018	Alimentos funcionais. (Carga horária: 40h). Instituto Ana Paula Pujol, AP, Brasil.
2018 - 2018	Modulação da microbiota intestinal. (Carga horária: 6h). Instituto Ana Paula Pujol, AP, Brasil.
2018 - 2018	Guia da Microbiota, imunidade e intestino. (Carga horária: 1h). Hi-Nutrition Instituto Educacional, HI-NUT, Brasil.
2018 - 2018	Microbioma e Saúde da Mulher. (Carga horária: 1h). Ganep Nutrição Humana, GANEP, Brasil.
2017 - 2017	Suplementação nutricional na prática clínica de A à Zinco. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
2017 - 2017	Comer com atenção plena - Mindful Eating. (Carga horária: 7h). Nutrição Comportamental, COMPORTAMENTAL, Brasil.
2014 - 2014	Manejo Nutricional nas Doenças Crônicas. (Carga horária: 14h). Instituto de Pesquisas, Ensino e Gestão em Saúde, IPGS, Brasil.
2014 - 2014	Fisiologia Hormonal do Emagrecimento. (Carga horária: 8h). Instituto de Pesquisas, Ensino e Gestão em Saúde, IPGS, Brasil.
2014 - 2014	VIII Workshop de Atualização em Nutrição. (Carga horária: 4h). Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	Visão da Psiquiatria para a Obesidade Infantil. (Carga horária: 2h). Hospital Infantil Sabará, HIS, Brasil.
2014 - 2014	Probióticos e Microbiota intestinal. (Carga horária: 5h). Danone Heath Affairs, DHA, Brasil.
2013 - 2013	Análise Estatística. (Carga horária: 48h). Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
2013 - 2013	Tendências e perspectivas no cenário da nutrição. (Carga horária: 5h). Instituto de Pesquisas, Ensino e Gestão em Saúde, IPGS, Brasil.
2013 - 2013	Nutrigenômica básica. (Carga horária: 8h). Instituto de Pesquisas, Ensino e Gestão em Saúde, IPGS, Brasil.
2012 - 2012	Curso On-Line de Pesquisa no PubMed para Pós-Gradu. (Carga horária: 120h). Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
2010 - 2010	Transtornos Alimentares: Como identificar e tratar. (Carga horária: 4h). Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.

2010 - 2010	Avaliação física. (Carga horária: 3h).
2010 - 2010	Formando profissionais de academia, FPA, Brasil. Terapia Nutricional - Uma visão atualizada. (Carga horária: 8h). Núcleo Especializado em Nutrição, , Brasil.
2010 - 2010	Atendimento Nutricional - Personal Diet. (Carga horária: 4h). Núcleo de Estudos Avançados em Nutrição, NEAN, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Nutrição na Infância e na Adolescência. (Carga horária: 28h). Hospital das Clínicas da FMUSP, HC, Brasil.
2009 - 2009	Nutrição nas Doenças Cardiovasculares. (Carga horária: 8h). Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP, INCOR, Brasil.
2009 - 2009	Contagem de Carboidratos. (Carga horária: 5h). Hospital das Clínicas da FMUSP, HC, Brasil.
2009 - 2009	Transtornos Alimentares. (Carga horária: 4h). Núcleo de Estudos Avançados em Nutrição, NEAN, Brasil.
2009 - 2009	Nutrigenômica. (Carga horária: 4h). Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2009 - 2009	Envelhecimento, Nutrição e Doenças Cardiovasculares. (Carga horária: 8h). Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP, INCOR, Brasil.
2009 - 2009	Nutrição Esportiva. (Carga horária: 5h). Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.
2008 - 2008	Inovações tecnológicas em Uan. (Carga horária: 4h). Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.
2008 - 2008	Nutrição nos Ciclos da Vida. (Carga horária: 6h). Hospital e Maternidade Brasil, HMB, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 40

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

Vínculo institucional

2020 - 2020

Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Outro

Outras informações

Disciplina ministrada: Doenças Metabólicas e Intervenção Nutricional: Obesidade, Diabetes, Síndrome Metabólica e Microbiota intestinal (60 horas)

Faculdades Integradas Coração de Jesus, FAINC, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2016

Vínculo: Professor, Enquadramento Funcional: Professor titular, Carga horária: 4

Vínculo institucional

2014 - 2015

Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Pós graduação em Nutrição Clínica

Extensão Médica Acadêmica, EMA, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2015

Vínculo: Nutricionista Discutidora, Enquadramento Funcional: Voluntária

Outras informações

Atividades do projeto Extensão Médica Acadêmica (EMA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no ano de 2015 com uma carga horária de 30 horas, na qualidade de Nutricionista Discutidora.

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2011

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Aprimoranda de Nutrição em Cardiologia, Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

07/2010 - 12/2010

Estágios, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.
Estágio realizado
Estágio em Nutrição Clínica.

02/2010 - 04/2010

Estágios, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.
Estágio realizado
Estágio em Saúde Pública.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. MARCIANO, RENATA ; SANTAMARINA, ALINE BOVETO ; DE SANTANA, ALINE ALVES ; SILVA, MAÍSA DE LIMA CORREIA ; AMANCIO, OLGA MARIA SILVÉRIO ; DO NASCIMENTO, CLAUDIA MARIA DA PENHA OLLER ; OYAMA, LILA MISSAE ; DE MORAIS, MAURO BATISTA . Effects of prebiotic supplementation on the expression of proteins regulating iron absorption in anaemic growing rats. *British Journal of Nutrition* **JCR**, v. 113, p. 901-908, 2015.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 21 | **SCOPUS** 11
 2. ★ SANTANA, ALINE ; SANTAMARINA, ALINE ; SOUZA, GABRIEL ; MENNITTI, LAÍS ; OKUDA, MARCOS ; VENANCIO, DANIEL ; SEELAENDER, MARILIA ; OLLER DO NASCIMENTO, CLAUDIA ; RIBEIRO, ELIANE ; LIRA, FABIO ; OYAMA, LILA . Decaffeinated green tea extract rich in epigallocatechin-3-gallate improves insulin resistance and metabolic profiles in normolipidic diet-but not high-fat diet-fed mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* **JCR**, v. 26, p. 893-902, 2015.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 20 | **SCOPUS** 9
 3. SANTAMARINA, ALINE B. ; OLIVEIRA, JULIANA L. ; SILVA, FERNANDA P. ; CARNIER, JUNE ; MENNITTI, LAÍS V. ; SANTANA, ALINE A. ; DE SOUZA, GABRIEL H. I. ; RIBEIRO, ELIANE B. ; OLLER DO NASCIMENTO, CLÁUDIA M. ; LIRA, FÁBIO S. ; OYAMA, LILA M. . Green Tea Extract Rich in Epigallocatechin-3-Gallate Prevents Fatty Liver by AMPK Activation via LKB1 in Mice Fed a High-Fat Diet. *Plos One* **JCR**, v. 10, p. e0141227, 2015.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 39 | **SCOPUS** 19
 4. SANTAMARINA, ALINE B. ; CARVALHO-SILVA, MILENA ; GOMES, LARA M. ; OKUDA, MARCOS H. ; SANTANA, ALINE A. ; STRECK, EMILIO L. ; SEELAENDER, MARILIA ; OLLER DO NASCIMENTO, CLAUDIA M. ; RIBEIRO, ELIANE B. ; LIRA, FÁBIO S. ; OYAMA, LILA MISSAE . Decaffeinated green tea extract rich in epigallocatechin-3-gallate prevents fatty liver disease by increased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in diet-induced obesity mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* **JCR**, v. 26, p. 1348-1356, 2015.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 45 | **SCOPUS** 6
 5. MENNITTI, LAÍS ; OYAMA, LILA ; DE OLIVEIRA, JULIANA ; HACHUL, ANA CLAUDIA ; SANTAMARINA, ALINE ; DE SANTANA, ALINE ; OKUDA, MARCOS ; RIBEIRO, ELIANE ; DO NASCIMENTO, CLAUDIA MARIA DA PENHA OLLER ; PISANI, LUCIANA . Oligofructose supplementation during pregnancy and lactation impairs offspring development and alters the intestinal properties of 21-d-old pups. *Lipids in Health and Disease* **JCR**, v. 13, p. 26, 2014.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 8 | **SCOPUS** 4
 6. ★ DIAS, FERNANDO ; LEFFA, DANIELA ; DAUMANN, FRANCINE ; DE OLIVEIRA MARQUES, SCHÉROLIN ; LUCIANO, THAIS F. ; POSSATO, JONATHAN ; DE SANTANA, ALINE ; NEVES, RODRIGO ; ROSA, JOSÉ ; OYAMA, LILA ; RODRIGUES, BRUNO ; DE ANDRADE, VANESSA ; DE SOUZA, CLÁUDIO ; DE LIRA, FABIO . Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against alterations to proteins involved in inflammatory and lipolysis pathways in the adipose tissue of obese mice fed a cafeteria diet. *Lipids in Health and Disease* **JCR**, v. 13, p. 24, 2014.
-
7. RODRIGUES, BRUNO ; SANTANA, ALINE ALVES ; SANTAMARINA, ALINE BOVETO ; OYAMA, LILA MISSAE ; CAPERUTO, ÉRICO CHAGAS ; DE SOUZA, CLÁUDIO TEODORO ; BARBOZA, CATARINA DE ANDRADE ; ROCHA, LEANDRO YANASE ; FIGUEROA, DIEGO ; MOSTARDA, CRISTIANO ; IRIGOYEN, MARIA CLÁUDIA ; LIRA, FÁBIO SANTOS . Role of Training and Detraining on Inflammatory and Metabolic Profile in Infarcted Rats: Influences of Cardiovascular Autonomic Nervous System. *Mediators of Inflammation (Print)* **JCR**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 13 | **SCOPUS** 12
 8. OKUDA, MARCOS H. ; ZEMDEGS, JULIANE C.S. ; DE SANTANA, ALINE A. ; SANTAMARINA, ALINE B. ; MORENO, MAYARA F. ; HACHUL, ANA C.L. ; SANTOS, BRUNO DOS ; NASCIMENTO, CLAUDIA M. OLLER DO ; RIBEIRO, ELIANE B. ; OYAMA, LILA M. . Green tea extract improves high fat diet-induced hypothalamic inflammation, without affecting the serotonergic system. *Journal of Nutritional Biochemistry* **JCR**, v. 25, p. 1084-1089, 2014.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 22 | **SCOPUS** 11

9. DE SOUZA, GABRIEL INÁCIO DE MORAIS HONORATO ; SANTAMARINA, ALINE BOVETO ; SANTANA, ALINE ALVES DE ; LIRA, FÁBIO SANTOS ; LAQUILA, RACHEL DE ; MORENO, MAYARA FRANZOI ; RIBEIRO, ELIANE BERALDI ; NASCIMENTO, CLAUDIA MARIA DA PENHA OLLER DO ; RODRIGUES, BRUNO ; ESPOSITO, ELISA ; OYAMA, LILA MISSAE . Preventive Effects of
10.  **SANTANA, AA.**; Lira, FS ; PIMENTEL, G. D. ; Romualdo, M. ; OYAMA, L. M. ; THOMATIELI, R. V. ; PINHO, R. A. ; SOUZA, C. T. ; RODRIGUES, B. ; CAPERUTO, E. C. . Sleep duration in elderly obese patients correlated negatively with intake fatty. *Lipids in Health and Disease* **JCR**, v. 11, p. 2-13, 2012.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 17 | **SCOPUS** 8

Capítulos de livros publicados

1. **SANTANA, AA.** Inflamação do tecido adiposo e aspectos nutricionais. *OBESIDADE: Guia prático do diagnóstico à prescrição do exercício físico*. 1ed. São Paulo: Clube de Autores, 2020, v. 1, p. 1-382.

Apresentações de Trabalho

1. **SANTANA, AA.**; Gama, KS ; Kovacs C ; Magnoni, D ; THOMATIELI, R. V. ; Hassimoto, NMA ; Lajolo, FM . Effect of the Moro and Pera orange juice intake on gut microbiota composition in obese individuals. 2020. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. **SANTANA, AA.**; Santos GK ; Kovacs C ; Magnoni, D ; THOMATIELI, R. V. ; Hassimoto, NMA ; Lajolo, FM . ?Efeito da suplementação de suco de laranja pera e sanguínea em biomarcadores inflamatórios depende do grau de obesidade. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. Santos GK ; **SANTANA, ALINE A.** ; Kovacs C ; Magnoni, D ; Lajolo, FM ; Hassimoto, NMA . Effect of pera and blood orange juices on biochemical parameters and antioxidant capacity in humans with insulin resistance. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. Santamarina, AB ; Silva, FP ; MENNITTI, L. V. ; Carnier, J. ; Okuda, MH ; **SANTANA, AA.** ; Ribeiro, EB ; Oller do Nascimento, CM ; Lira, FS ; OYAMA, L. M. . EPIGALLOCATEQUINA-3-GALATO MELHORA SENSIBILIDADE À INSULINA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE AMPK NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. Santamarina, AB ; Silva, Fernanda Pinheiro ; MENNITTI, L. V. ; Carnier, J. ; Okuda, MH ; **DE SANTANA, ALINE ALVES** ; Ribeiro, EB ; Oller do Nascimento, CM ; Lira, FS ; OYAMA, L. M. . EPIGALLOCATEQUINA-3-GALATO MELHORA SENSIBILIDADE À INSULINA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE AMPK α 1/2 NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. Santamarina, AB ; Okuda, MH ; **SANTANA, AA.** ; Oliveira, JL ; Carnier, J. ; MENNITTI, L. V. ; OLLER DO NASCIMENTO, CLÁUDIA M. ; Ribeiro, EB ; Lira, FS ; OYAMA, L. M. . THE EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE (EGCG) IMPROVED THE OBESITY BY LIVER LKB1/AMPK ACTIVATION.. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. MENNITTI, L. V. ; OYAMA, L. M. ; Oliveira, JL ; HACHUL, ANA CLAUDIA ; Santamarina, AB ; **SANTANA, AA.** ; Okuda, MH ; Ribeiro, EB ; OLLER DO NASCIMENTO, CLÁUDIA M. ; PISANI, LUCIANA . Oligofructose supplementation during pregnancy and lactation impairs offspring development associated to an increase in mRNA levels of IL-6R in 21-d-old pups. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. Santamarina, AB ; **SANTANA, AA.** ; MENNITTI, L. V. ; Carnier, J. ; Silva, FP ; GOMES, LARA M. ; CARVALHO-SILVA, MILENA ; STRECK, EMILIO L. ; OLLER DO NASCIMENTO, CLÁUDIA M. ; Ribeiro, EB ; Lira, FS ; OYAMA, L. M. . The epigallocatechin-gallate (EGCG) improved the obesity by increasing hepatic mitochondrial activity in mice treated with high fat diet.. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. MENNITTI, L. V. ; DE OLIVEIRA, JULIANA ; HACHUL, ANA CLAUDIA ; **SANTANA, AA.** ; SANTAMARINA, ALINE BOVETO ; OYAMA, LILA ; OLLER DO NASCIMENTO, CLAUDIA ; Ribeiro, EB ; PISANI, LUCIANA . THE SUPPLEMENTATION WITH 10% OF OLIGOFRUCTOSE DURING PREGNANCY AND LACTATION INCREASES SERUM LIPOPOLYSACCHARIDES AND DECREASES SERUM CONCENTRATION OF ADIPONECTIN, ON 21 DAYS OLD OFFSPRING.. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. **SANTANA, AA.** ; Okuda, MH ; Santamarina, AB ; DE SOUZA, GABRIEL INÁCIO DE MORAIS HONORATO ; MENNITTI, L. V. ; Ribeiro, EB ; OLLER DO NASCIMENTO, CLÁUDIA M. ; OYAMA, L. M. . The epigallocatechin-gallate (EGCG) increased AMPK α 1/2 phosphorylation and AMPK β 1 and SIRT1 protein content in gastrocnemius muscle. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. MENNITTI, L. V. ; OYAMA, L. M. ; Oliveira, JL ; HACHUL, ANA CLAUDIA ; **SANTANA, AA.** ; Santamarina, AB ; Ribeiro, EB ; OLLER DO NASCIMENTO, CLÁUDIA M. ; PISANI, LUCIANA . The oligofructose supplementation during pregnancy and lactation alters the mRNA expression of IL-6R and AdipoR2 in liver, on 21 days old offspring. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1.  **DE SANTANA, ALINE A.** Alimentação na menopausa. 2015. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

Redes sociais, websites e blogs

1. **SANTANA, AA.** Frutas secas são práticas e ricas em benefícios, só cuidado com as porções.. 2020; Tema: Frutas secas. (Site).

Demais tipos de produção técnica

1. **SANTANA, AA.** Higieneização das mãos. 2017. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Conteúdos de vídeo-aula de curta duração (selfie class) - UNINOVE).
2. **SANTANA, AA.** Envelhecimento saudável. 2016. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Elaboração de Material didático para curso de Pós-graduação Lato sensu (UNIVFV)).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 3º Simpósio de Obesidade e Distúrbios Metabólicos. 2021. (Simpósio).
2. II webinar do projeto RENOB-MG, intitulado: abordagem em grupos na prevenção e controle da obesidade na Atenção Básica,. 2020. (Seminário).
3. VI Simpósio OCRC, promovido pelo Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (CEPID OCRC) - Processo FAPESP 2013/07607-8. 2020. (Simpósio).
4. Benefícios da ingestão de suco de laranja. Benefícios da ingestão de suco de laranja. 2018. (Seminário).
5. I International Symposium on Citrus Bioactive compounds and health benefits?., Effect of pera and blood orange juices on biochemical parameters and antioxidant capacity in humans with insulin resistance. 2018. (Congresso).
6. 16º Evento da Série de Workshops Internacionais sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde - Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos: Avanços Científicos, Perspectivas e Desafios?. 2017. (Seminário).
7. As melhores práticas no ambiente virtual de aprendizagem. 2016. (Oficina).
8. Como gravar aulas selfies. 2016. (Oficina).
9. Como gravar vídeo aulas. 2016. (Oficina).
10. Elaboração de avaliações. 2016. (Oficina).
11. GENC: O papel da nutrição nos biomarcadores da aterosclerose. 2016. (Seminário).
12. Oficina de idiomas e informática. 2016. (Oficina).
13. XI Congresso Paulista de Nutrição Clínica. 2016. (Congresso).
14. VII Simpósio Internacional de Alergia Alimentar e da IX Jornada de de atualização em nutrição pediátrica. 2015. (Simpósio).
15. Alimentação na prevenção de doenças crônicas. 2014. (Seminário).
16. V Meeting Probiótica de Suplementação Nutricional. 2014. (Outra).
17. 20th European Congress on Obesity. The epigallocatechin-gallate (EGCG) increased AMPK α 1/2 phosphorylation and AMPK β 1 and SIRT1 protein content in gastrocnemius muscle. 2013. (Congresso).
18. Pré-simpósio do I Simpósio Brasileiro de Imunologia no Esporte. 2013. (Simpósio).
19. XV Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica. Epigallocatequina-3-gallato (EGCG) aumenta fosforilação da AMPK e melhora perfil metabólico do tecido adiposo mesentérico de camundongos tratados com dieta hiperlipídica. 2013. (Congresso).
20. XV Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica. 2013. (Congresso).
21. 6 Congress of the International Society Nutrigenetics/Nutrigenomics. 2012. (Congresso).
22. Bases genéticas da resistência a insulina e do Diabetes. 2012. (Seminário).
23. Classical and novel mediators of insulin resistance in lipid-induced and obesity-linked insulin resistance. 2012. (Outra).
24. Controle pós-transcricional de expressão gênica : Papel do mRNA. 2012. (Seminário).
25. Doenças neurodegenerativas e terapias neuroprotetoras. 2012. (Seminário).
26. Herança epigenética. 2012. (Seminário).
27. Nutrição e programação fetal das doenças crônicas não transmissíveis : Mecanismos moleculares. 2012. (Seminário).
28. Redação científica. 2012. (Outra).
29. Respostas celulares a lesões no genoma. 2012. (Seminário).
30. 20 anos do programa de pós-graduação da Unifesp. 2011. (Outra).
31. 4º Simpósio de Obesidade na Infância e Adolescência do HC-FMUSP. 2011. (Simpósio).
32. 6º Simpósio de Síndrome Metabólica do Hospital das Clínicas da FMUSP. 2011. (Simpósio).
33. Diarréia - Desmistificando as causas. 2011. (Outra).
34. II Encontro Multiprofissional do acompanhamento e atenção à saúde integral do adolescente : Experiência de programas de intervenção em obesidade. 2011. (Encontro).
35. IX Congresso Paulista de Nutrição Clínica e VIII Congresso Paulista de Nutrição Humana. 2011. (Congresso).
36. Popularização da Ciência da Nutrição : riscos, cuidados e necessidades. 2011. (Seminário).
37. Workshop : Ácidos graxos e doenças cardiovasculares. 2011. (Outra).
38. 3º Simpósio sobre Obesidade na Infância e Adolescência do HC-FMUSP. 2010. (Simpósio).
39. Atualização em Alimentos e Compostos bioativos - Parte II. 2010. (Simpósio).
40. Atualização em Avaliação do Estado Nutricional. 2010. (Simpósio).
41. Atualização em Nutrição Clínica - Parte I. 2010. (Simpósio).
42. Atualização em Nutrição Clínica - Parte II. 2010. (Simpósio).
43. Bioquímica da Nutrição : caminho das biomoléculas rumo a metabolização - Parte I. 2010. (Simpósio).
44. Bioquímica da Nutrição : caminho das biomoléculas rumo a metabolização - Parte II. 2010. (Simpósio).
45. Congresso Paulista de Nutrição Clínica / Humana. 2010. (Congresso).
46. Estudos Temáticos da Docência. Visita monitorada- Laboratório de Alimentos e Bebidas. 2010. (Encontro).

47. FÓRUM PARA DISCUSSÃO : Abordagem Clínica na biomodulação neuroinflamatória da cicatrização da pele. 2010. (Outra).
48. I Fórum de Marketing Nutricional. Organização de eventos. 2010. (Congresso).
49. Jornada científica do Nisan / Carta da Terra, Slow food e Segurança Alimentar e Nutricional. 2010. (Outra).
50. Marketing e Empreendedorismo em Alimentação e Nutrição. 2010. (Simpósio).
51. Nutrição e dietética nas diferentes fases da vida. 2010. (Simpósio).
52. Qualidade Nutricional, Higiênico Sanitária, Tecnológica e Sensorial de Alimentos - Parte I. 2010. (Simpósio).
53. Qualidade Nutricional, Higiênico Sanitária, Tecnológica e Sensorial de Alimentos - Parte II. 2010. (Simpósio).
54. Tópicos Especiais em Epidemiologia Nutricional - Parte II. 2010. (Simpósio).
55. VII Simpósio Anual de Nutrição Clínica - Alimentos e Nutrientes : Como prescrever com eficácia. 2010. (Simpósio).
56. Ação Global. Orientação Nutricional. 2009. (Outra).
57. Simpósio Anual de Nutrição Clínica, Saúde e Qualidade de vida. 2009. (Simpósio).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Larissa Ribeiro Borges. Akkermansia muciniphila e seus efeitos metabólicos na obesidade. Início: 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização Fisiologia do Exercício) - Universidade Federal de São Paulo. (Orientador).
2. HELENA JUNQUEIRA OLIVEIRA. Relação entre obesidade e fibromialgia. Início: 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização Fisiologia do Exercício) - Universidade Federal de São Paulo. (Orientador).
3. SABRINA BATISTA BRAGA. A eficácia da vitamina E no tratamento da doença hepática gordurosa não-alcóolica. Início: 2021. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização Fisiologia do Exercício) - Universidade Federal de São Paulo. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Fernanda Levino. Complicações associadas à gestação e obesidade: Importância da alimentação saudável. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
2. Lucas Rocha Braidão. Avaliação do consumo alimentar de adventistas vegetarianos. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
3. Dayanne Castro de Oliveira. Avaliação de fatores de risco cardiovascular no envelhecimento. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
4. Roberta Michelle Aguiar da Silva. Transtorno Alimentar: Associação de compulsão alimentar e obesidade. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
5. Ana Claudia Conceição Vitória. Comportamento de restrição alimentar na anorexia nervosa. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
6. Karina Mendes Sillig de Almeida. Anorexia Nervosa na adolescência e a influência da mídia na imagem corporal. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
7. Elissandra Aparecida da Silva Ferreira. A importância da alimentação em portadores de distrofia muscular de Duchenne. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
8. Tamara Nolasco Chagas. A relação dos hormônios Leptina e Grelina no desenvolvimento da obesidade. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
9. Camila Silva Cerqueira. Consumo alimentar de ácido ascórbico na infância. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.
10. Rigele Oliveira Veloso da Fonseca. Influência de fatores psicológicos na alimentação de praticantes de futebol pré e pós competições. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Faculdades Integradas Coração de Jesus. Orientador: Aline Alves de Santana.
11. Amanda Braga. Avaliação do consumo de corantes alimentares em crianças e sua relação com a hiperatividade. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Faculdades Integradas Coração de Jesus. Orientador: Aline Alves de Santana.
12. Fernanda Silva Cardoso. O benefício do consumo de alimentos funcionais na prevenção e no tratamento do câncer. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Nove de Julho. Orientador: Aline Alves de Santana.

Educação e Popularização de C & T

Artigos

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ **SANTANA, AA.**; Lira, FS ; PIMENTEL, G. D. ; Romualdo, M. ; OYAMA, L. M. ; THOMATIELI, R. V. ; PINHO, R. A. ; SOUZA, C. T. ; RODRIGUES, B. ; CAPERUTO, E. C. . Sleep duration in elderly obese patients correlated negatively with intake fatty. *Lipids in Health and Disease* **JCR**, v. 11, p. 2-13, 2012.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 17 | **SCOPUS** 8

Apresentações de Trabalho

1. Santos GK ; **SANTANA, ALINE A.** ; Kovacs C ; Magnoni, D ; Lajolo, FM ; Hassimotto, NMA . Effect of pera and blood orange juices on biochemical parameters and antioxidant capacity in humans with insulin resistance. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **SANTANA, AA.**; Gama, KS ; Kovacs C ; Magnoni, D ; THOMATIELI, R. V. ; Hassimotto, NMA ; Lajolo, FM . Effect of the Moro and Pera orange juice intake on gut microbiota composition in obese individuals. 2020. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Desenvolvimento de material didático ou instrucional

1. **SANTANA, AA.**. Higienização das mãos. 2017. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Conteúdos de vídeo-aula de curta duração (selfie class) - UNINOVE).

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. ★ **DE SANTANA, ALINE A.**. Alimentação na menopausa. 2015. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

Redes sociais, websites e blogs

1. Zago, C ; Pereira, AP ; Fernanda, E. ; **SANTANA, AA.** . Pêssego faz bem para a pele e o intestino: veja 9 benefícios da fruta.. 2020. (Site).