

Mudanças na microbiota de ratos suplementados com extratos de *Achyrocline satureioides* e *Paullinia cupana* usando DNA fecal

Silveira, A.K¹; Moresco, K. S¹; Grun, L¹; Barbé-Tuana F. M¹; Oliveira, R. R²; Borges, A. G²; Bassani, V.L³; Gelain, D.P¹ Moreira, J.C.F¹.

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ² Instituto de Tecnologia do Petróleo, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

1. Introdução

Há tempos se sabe que a microbiota intestinal possui um papel fundamental no metabolismo de seus hospedeiros. Já descrita por alguns autores como o nosso segundo genoma (Galland 2014)

O eixo microbiota-intestino-cérebro representa uma rede complexa de comunicação bidirecional entre a microbiota intestinal, o intestino e o cérebro, capaz de modular a função imune, gastrointestinal e do sistema nervoso central.(Carabotti et al. 2015) Entre os processos que são influenciados por esta rede podemos citar, por exemplo, a reatividade ao estresse, a percepção da dor e a neuroquímica. O bom funcionamento desta rede depende de uma delicada relação sinérgica entre o hospedeiro e sua microbiota (Manuscript 2014)

A formação da microbiota ocorre em paralelo ao processo de neurodesenvolvimento, sendo ambos os processos caracterizados por uma série de alterações na organização microbiana e neuronal, os quais se iniciam no útero e que continuam a ser modelados e refinados durante o período pós-natal (Borre et al. 2014)

A colonização da microbiota começa cedo, a microbiota dos recém-nascidos é afetada pelo modo do nascimento, mostrando uma população maior de bactérias do epitélio em cesárea, diferente da população no parto normal, com mais bactérias do trato vaginal . Aos 3 anos de idade a população bacteriana do intestino já assume uma proporção mais parecida com a vida adulta (Yatsunencko et al. 2012).

Perturbações durante estes períodos críticos para a interação dinâmica entre a microbiota e o seu hospedeiro, estão amplamente associadas com sérias consequências para a saúde ao longo de todas as demais fases da vida, podendo aumentar o risco de distúrbios neurodesenvolvimentais e neuropsiquiátricos (Borre et al. 2014)

Sabemos que um dos principais fatores para a alteração da microbiota intestinal é a dieta, ainda não é claro qual alteração acarreta na outra, mas são eventos claramente correlacionados. Sabemos que alterações na dieta modulam diretamente a microbiota, independente da obesidade (5), e também sabemos que alterações na microbiota causam uma mudança nos hábitos alimentares, como a quantidade de ingestão calórica (Turnbaugh et al. 2006).

A microflora intestinal começa a sofrer pressão seletiva desde a primeira amamentação, onde as bactérias que metabolizam os derivados do leite materno podem se proliferar com vantagem. (Palmer et al. 2007) O consumo de extratos vegetais pode ser considerado um dos primeiros tratamentos medicinais da sociedade, selecionando uma porção da microbiota capaz de metabolizar ou resistir aos compostos secundários das plantas, como por exemplo: os flavonoides, catequinas e xantinas.

Achyroclines satureioides, popularmente conhecida como Marcela, assim como o fruto do Guaraná (*Paullinia cupana*), vem sendo utilizados na medicina popular há centenas de anos. As inflorescências da Marcela são ricas em polifenóis, como a quercetina e luteolina, 3-O-metilquercetina e Achyrobichalcona (Carini et al. 2014). Esses polifenóis possuem propriedades antimicrobianas. A quercetina possui uma função protetora em infecções de *Shigella* no modelo animal (Carini et al. 2014), estudos *in vitro* também mostraram uma ação na membrana bacteriana de patógenos, diminuindo o seu fator de virulência . A luteolina também tem efeito antibacteriano em *E. coli* (Eumkeb el al. 2012).

O guaraná é consumido com fins medicinais em todo o mundo, mas principalmente no Brasil. Esse extrato é rico em polifenóis como xantinas e catequinas (Bittencourt et al. 2014). As epicatequinas possuem efeitos anti infectivos (La Rosa et al. 2014) e antimicrobianos. A catequina do chá verde também possui um efeito indireto no combate à patógenos, estimulando a resposta imune através dos macrófagos e na produção de citocinas (Matsunaga et al. 2001).

A relação entre compostos secundários e efeito na microbiota intestinal são de extrema relevância para entender como o equilíbrio gastrointestinal pode influenciar parâmetros metabólicos no resto do corpo, sendo assim a hipótese deste projeto é caracterizar e comparar as alterações na microbiota intestinal de ratos wistar adultos suplementados com extratos vegetais *Achyroclines satureioides* e *Paullinia cupana*.

2 Material e Métodos

2.1 Reagentes químicos

O pó de Guaraná foi obtido da marca Lifar Ltd. (Porto Alegre, RS, Brasil). Para a preparação da fase líquida da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) utilizamos acetonitrila e metanol (Tedia, Fairfield, OH, USA), ácido acético (Cromoline, São Paulo, Brazil), acetato de etila (Scientific HEXIS S/A. Mexico) e água purificada (Milli-Q™ system, Millipore, Bedford, MA, USA). Os padrões de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina foram obtidos da Sigma, Alfa Aesar (Alemanha) e Extrasynthese (França), respectivamente. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparação do extrato hidroetanólico

Inflorescências de *Achyrocline satureioides* foram compradas do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas (CPQBA, Universidade de Campinas, Brazil). As amostras das plantas foram coletadas e secas a temperatura ambiente em

maio de 2013 e identificadas como cultivar CPQBA/2 registrado no Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA-Brazil) com o número 22975.

Um extrato hidroetanólico 80% foi preparado com as influorecências 7,5:100 (peso(g)/volume(mL)). A solução extrativa ficou em contato com as influorecências durante 8 dias, posteriormente o solvente foi evaporado em rotaevaporador e a solução restante foi liofilizada conforme metodologia proposta por Sonaglio (1984) e mantida sob congelamento a temperatura de - 20 °C.

*2.3 Conteúdo de flavonoides do extrato de *Achyroclines satureioides**

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência será realizada conforme descrito por De Souza et al. (2002), utilizando um cromatógrafo Waters (Milford, MA, EUA): uma bomba de água 510, um controlador automático de águas de fluxo 600, uma válvula de injeção Rheodyne 7125 com um loop de 20 µl, 486-um detector de UV de comprimento de onda variável (ajustado a 362 nm). Serão utilizadas como substâncias de referência (padrões) os flavonoides, quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina.

O extrato em pó será diluído em metanol, a análise será realizada usando coluna Shim-pack column CLC-ODS (M) RP-18, (tamanho partícula 5 µm) comprimento 250 mm x 4 mm. A fase móvel será constituída de uma mistura de metanol- ácido fosfórico 0,16 M (53:47, v/v), com um fluxo de 0,6 mL/min operado a temperatura de (23 ± 1°C) utilizando . Os resultados serão expressos em µg de flavonoides/mg de extrato em peso seco (De Souza, 2002).

2.4 Tratamento e manipulação dos animais

Foram utilizados 40 ratos machos wistar com 150 dias de idade obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica - UFRGS mediante aprovação do do projeto no CEUA sob o número 23900. Os ratos foram mantidos em salas específicas do biotério, seguindo todas os padrões do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, pelas normas de bem-estar em animais de laboratório e biossegurança em

experimentação animal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Experimentação e Ciência em Animais de Laboratório.

Também foram respeitadas as leis de uso e manipulação de animais em pesquisa: A Lei Federal nº 11794, de 8 de outubro de 2008 e a resolução de nº 879, de 15 de fevereiro de 2008. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração comercial própria do biotério *ad libitum*, divididos em em 4 grupos de 10 animais por grupo, sendo os grupos: Controle - (solução salina), Cafeína (60mg/Kg), *Paullinia cupana*. (0,021g/Kg) e *Achyroclines satureioides* (0,35mg/Kg) equivalente ao consumo de 150mL de chá por dia

Os animais receberam suplementação com extrato diariamente, durante 21 dias, via gavagem em volume máximo de 1mL calculado de acordo com o peso individual que foi acompanhado semanalmente para a administração adequada de cada tratamento.

2.5 Coleta Fecal

As fezes dos animais foram coletadas antes do tratamento D0 e depois do tratamento D21. A coleta foi realizada na bancada para manipulação de animais do Biotério – UFRGS, sendo feita uma assepsia prévia com álcool 70%. As fezes foram recolhidas e colocadas em microtubos previamente esterilizados por 20 min no UV dentro do fluxo laminar. Foram feitos *pools* de fezes nos tubos, a fim de melhor representar a diversidade de cada grupo, sendo feitos 4 microtubos para cada grupo.

2.6 Extração do DNA

As extrações foram feitas imediatamente após a coleta utilizando o *QIAmp DNA Stool Mini Kit* da marca QIAGEN, específico para extração de DNA fecal. As amostras de material genético extraído foram armazenadas à -20 °C para amplificação e posterior purificação.

2.7 Amplificação do DNA

Os *primers* utilizados para amplificação por PCR foram os oligos F515 e R806. Condições da PCR.

2.8 Sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação dos genes de interesse

Para análise metagenômica das comunidades presentes nas amostras fecais, os fragmentos dos genes 16S gerados por PCR foram submetidos ao sequenciamento de alto desempenho utilizando-se um sequenciador *Ion Personal Genome Machine (PGM) System* (Life Technologies).

A construção das bibliotecas foi realizada com o kit *Ion Plus Fragment Library* para amplicons curtos (≤ 350 pb), a partir de uma quantidade inicial de 100 ng de produto de amplificação. A cada amostra foi incorporado um adaptador (*barcode*) do kit *Ion Xpress Barcode 1-16*, para que as amostras pudessem ser sequenciadas em uma mesma corrida, diminuindo os custos do processo. Todos os procedimentos para a construção das bibliotecas foram realizados como recomendado pelo fabricante. As bibliotecas foram quantificadas e equalizadas com o kit *Ion Library Equalizer*, conforme recomendado no manual do fabricante. A PCR em emulsão e os passos de enriquecimento foram realizados conforme descrição do kit *Ion PGM Template OT2 200*, utilizando o equipamento *Ion OneTouch 2 System*. O sequenciamento foi realizado em um chip *Ion 316*, com o kit *Ion PGM Sequencing 200 v2*, seguindo as recomendações do fabricante.

2.9 Análise de sequenciamento de alto desempenho

A leitura do 16S rRNA foi gerada utilizando sequenciamento de alto rendimento e submetidas a um controle de qualidade. As sequências com comprimento mínimo de 100 pb foram triadas para remover bases de baixa qualidade para o mínimo de pontuação Phred 30, utilizando o software PRINSEQ (SCHMIEDER, EDWARDS, 2011).

Os restos mortais foram sequências replicadas lidas e classificadas por ordem decrescente e depois filtradas para excluir singletons usando USEARCH v7.0.1090 (Edgar, 2010).

A atribuição taxonômico foi obtida através do software QIIME v1.7 (CAPORASO et al., 2010). OTUs foram selecionados com base em 97% de semelhança de sequências; Dados taxonômicos foram alcançados através do algoritmo de classificação usando o 97% de GreenGenes OTUs Versão 13.8 (DESANTIS et al., 2006).

2.10 Análises bioquímicas

Perfil Redox: foram investigados diversos parâmetros enzimáticos no fígado, rim e intestino, estruturas previamente isoladas cirurgicamente, armazenadas a -80°C e homogeneizadas em tampão fosfato. A atividade da enzima catalase foi avaliada pela observação da taxa de degradação do peróxido de hidrogênio através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 240 nm (AEBI, 1984). A atividade da glutationala peroxidase foi avaliada através da avaliação da taxa de oxidação do NADPH em espectrofotômetro a 340 nm (WENDEL, 1981). A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada pela quantificação da inibição da auto-oxidação superóxido dependente da adrenalina em espectrofotômetro a 480 nm (MISR, FRIDOVICH, 1972). Atividade da enzima glutationala-S-transferase foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm pela medida da formação do conjugado da glutationala com o cloro-dinitro benzeno (CDNB). Resumidamente, as amostras foram misturadas com um tampão GSH 20mM. Depois, a reação foi iniciada pela adição de CDNB 20mM a 30°C , monitorada por 3 min (HABIG, JAKOBY, 1981).

Níveis de carbonilação protéica e nitrosilação de proteínas: as proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20% e depois resolubilizadas em DNPH. O conteúdo de grupamentos carbonil foi então determinado por absorbância em espectrofotômetro a 370 nm conforme método de (Levine et al. 1990).

Níveis de lipoperoxidação: A formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) será quantificada por uma reação ácida de aquecimento com ácido tiobarbitúrico, sendo amplamente adotado como medida de dano oxidativo a lipídios. Resumidamente, as amostras serão misturadas com 0,6mL de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas (10,000×g 10 min). O sobrenadante será então misturado a 0,5mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e aquecido em banho-maria em água fervente por 25 min. O conteúdo de TBARS será então determinado por absorvância em espectrofotômetro a 532 nm (Draper e Hadley, 1990).

Estado redox de grupamentos tióis protéicos e não protéicos: O conteúdo total de grupamentos tióis em seu estado reduzido será quantificado como uma avaliação do estado redox das regiões do sistema nervoso central analisadas, visto que eles estão presentes em proteínas, assim como em moléculas de glutathione. Resumidamente, uma alíquota das amostras será diluída em SDS 0,1%. Depois, será acrescentado ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico 0,01M, preparado em etanol. A coloração amarelo intensa será lida em espectrofotômetro a 412 nm após 60 min para a obtenção do conteúdo total de grupamentos tióis. Para a determinação da fração protéica e não-protéica, uma alíquota da amostra será misturada previamente com ácido tricloroacético 20% para a separação das frações protéica e não-protéica (Ellman, 1959).

2.11 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA). Utilizamos também o teste Tukey para médias de diferenças com o auxílio dos professores e estudantes do Núcleo de Apoio de Estatística.

3 Resultados e Discussão

*3.1 Composição dos flavonóides do extrato de *Achyroclines satureoides**

A identificação da Achyrobichalcona, quercetina, luteolina e 3-o-metilquercetina no extrato de *Achyrocline satureioides* foi possível através da separação por HPLC. A composição de flavonóides totais do extrato etanólico foi 132 mg/g (Tabela 1 e Fig. 1).

Tabela 1. Conteúdo total de flavonoides do extrato de *Achyroclines satureoides* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DW). * n= 3; S.D.= desvio padrão; Rt= tempo de retenção.

Samples	Quercetin a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	3-o- methylquerceti na ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Luteolin a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Achyrobichalco na ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Flavonoid es Totais
Extrato hidro etanólico liofilizad o.	27.7 \pm 0.6	62.3 \pm 0.5	18.0 \pm 0.01	24.0 \pm 0.8	132.0

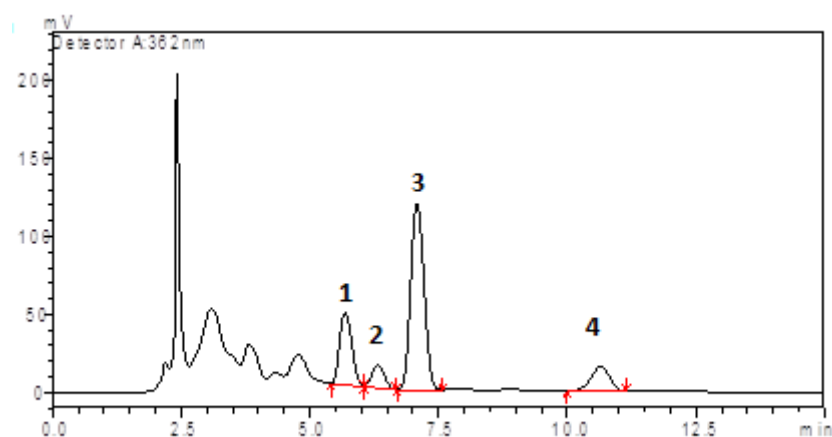


Fig. 1. Perfil cromatográfico dos flavonoides encontrados nos extratos de *Achyroclines satureioides* (1) quercetina, (2) luteolina (3) 3-o-metilquercetina, and (4) Achyrobichalcona.

3.2 Composição do Extrato de *Paullinia cupana*

A composição do Guaraná foi realizada anteriormente pelo nosso grupo (Bittencourt et al. 2014) As concentrações de flavonoides foram: cafeína (34.19 ± 1.26 mg/g), theobromina (0.14 ± 0.01 mg/g), (+)-catequina (3.76 ± 0.12 mg/g), and (-)-epicatequina (4.05 ± 0.16 mg/g) (Tabela 2). Como podemos observar, o extrato comercial do guaraná é rico em compostos com comprovada atividade antimicrobiana (Bittencourt et al. 2014, Steinmann et al. 2013).

Tabela 2. Conteúdo total de polifenóis no extrato comercial de Guaraná ($\mu\text{g}/100$ g DW).
* n= 3; S.D.= desvio padrão; Rt= tempo de retenção. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os polifenóis.

Nº Pico	Polifenol	Rt (min)	Concentrações (mg/g) \pm S.D.*
1	Theobromina	3.2	0.14 ± 0.01^c
2	Cafeína	5.0	34.19 ± 1.26^a
3	(+)-Catequina	8.7	3.76 ± 0.12^b
4	(-)-Epicatequina	10.4	4.05 ± 0.16^b
Total			42.15 ± 1.53

3.3 Amplificação do DNA

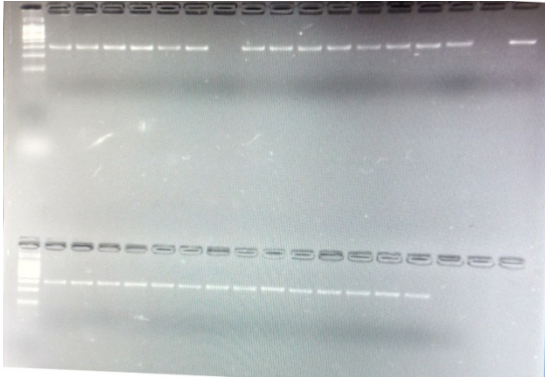


Fig. 2. Gel de agarose 3% para confirmar o aparecimento de banda única

3.4 Análise de sequenciamento de alto desempenho

A Figura 3 apresenta os principais filos de bactérias encontrados por meio da análise de sequenciamento antes e após o tratamento.

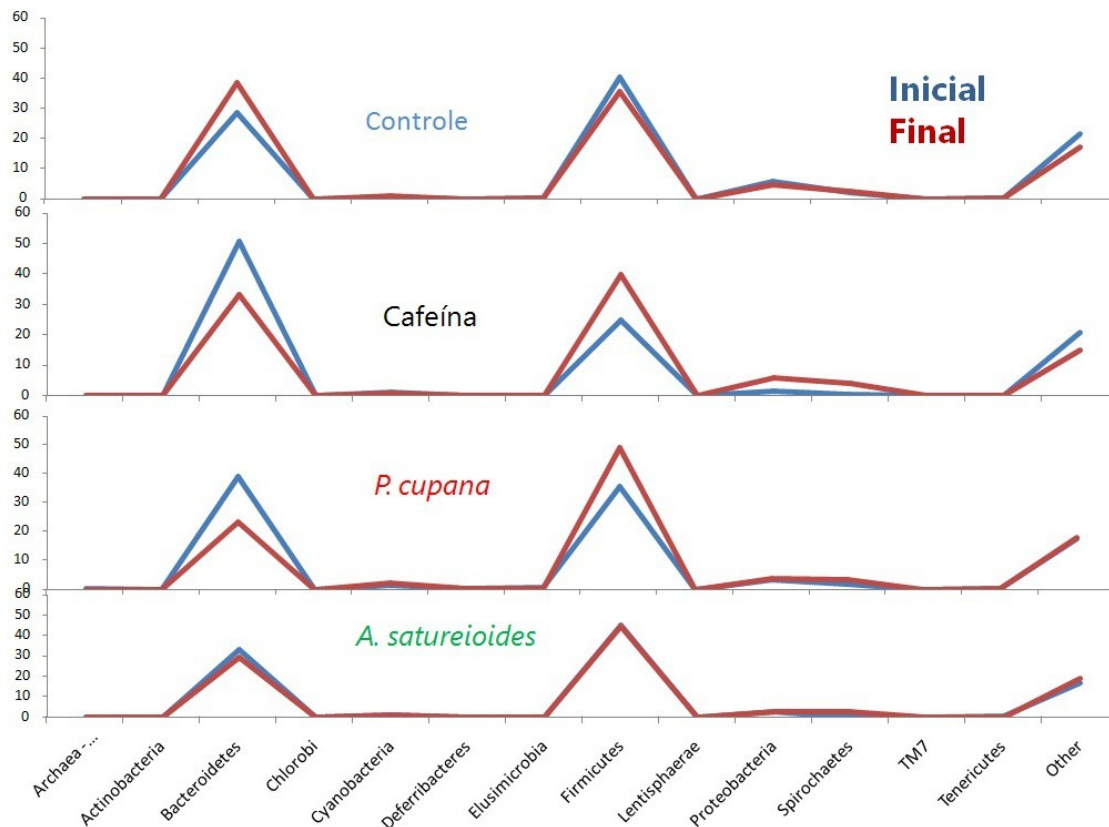


Fig 3. Alteração em % nas proporções dos Filos bacterianos ao longo do tratamento. (Inicial = Antes do tratamento / Final = Pós tratamento com extrato de *A. satureioides*, *Paullinia cupana* e cafeína)

O controle apresenta como seria o perfil esperado quanto a proporção de bactérias. Como pode-se observar, tanto este como no extrato de *A. satureioides*, o perfil de filios bacterianos não sofreu alterações significativas, principalmente frente as proporções de Firmicutes/Bacteroidetes, filios estes que vem sendo associados a doenças como obesidade e diabetes (Eckburg et al., 2005; Ley et al., 2005, 2006)

Diferente do controle e do extrato de *A. satureioides*, os extratos de *Paullinia cupana* e cafeína (controle) mostraram que houve uma diferença significativa no perfil dos filios com destaque para Firmicutes/Bacteroidetes depois do tratamento.

O extrato de *A. satureioides* é rico em flavonoides (Tabela 1), estudos demonstram que a suplementação com compostos ricos em polifenóis é capaz de alterar as populações microbianas do intestino (Cuervo et al. 2014) (Etxeberria et al. 2015)

Em estudos realizados com a quercetina, flavonoide presente no extrato, demonstraram que em uma situação de disbiose induzida por dieta hiperlipídica, a administração desse flavonóide é capaz de minimizar os efeitos na disbiose intestinal (Etxeberria et al. 2015).

Essa propriedade protetora dos compostos frente à uma disbiose poderia justificar o porque não observamos alteração nas proporções de Firmicutes/Bacteroidetes no final do tratamento.

3.5 Análises Bioquímicas

Através dos resultados expressos na (Fig. 4) para avaliar o dano lipídico (TBARS), dano proteico (Carbonil) e dano ao grupamento Sulfidril (SH) não encontramos diferenças nos tratamentos o que indica que nenhum dos extratos induzindo dano oxidativo, apesar da modulação nas populações bacterianas.

Isso nos leva a crer que os extratos de *Paullinia cupana* e *Achyrocline satureioides* não tem efeito pro oxidante no intestino nesse tratamento.

No entanto podemos ver uma diminuição na atividade enzimática da Catalase e um aumento na atividade enzimática na Glutathione-S-transferase no intestino (Fig 5.).

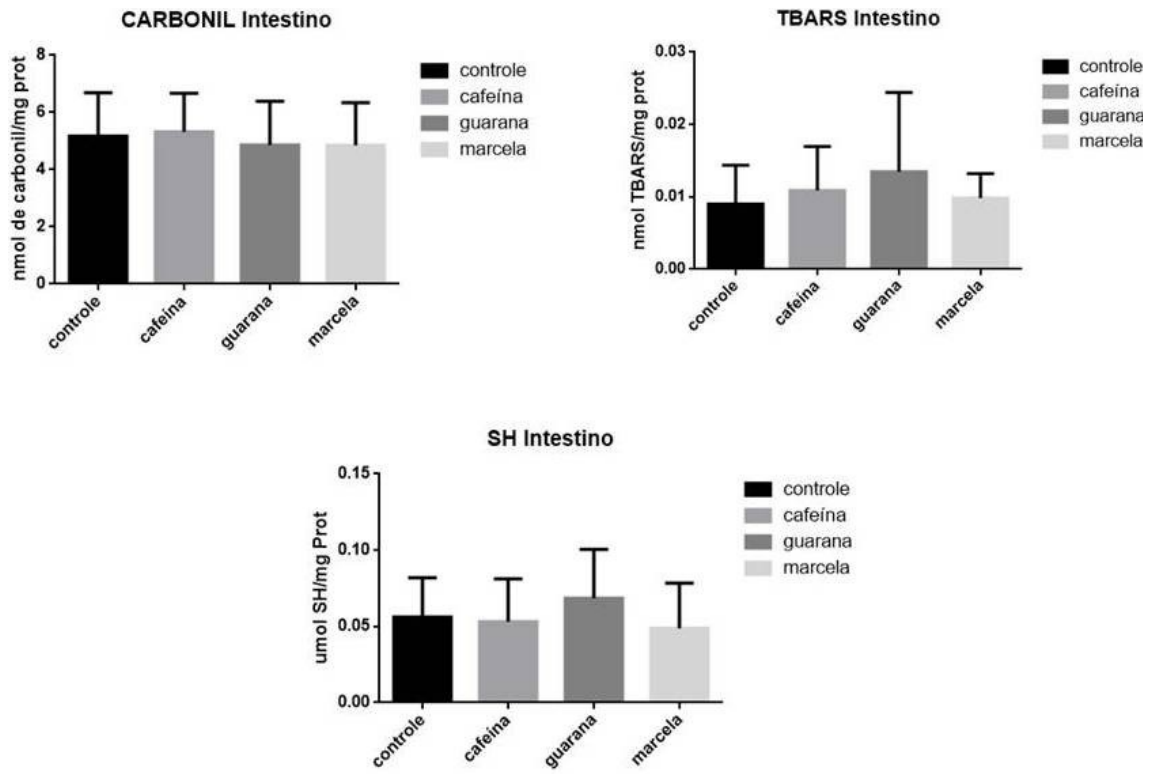


Fig. 4 Teste Lipoperoxidação (TBARS), Teste de Proteínas Carboniladas (Carbonil) e Dano ao grupamento Sulfidril (SH) na porção final do intestino.

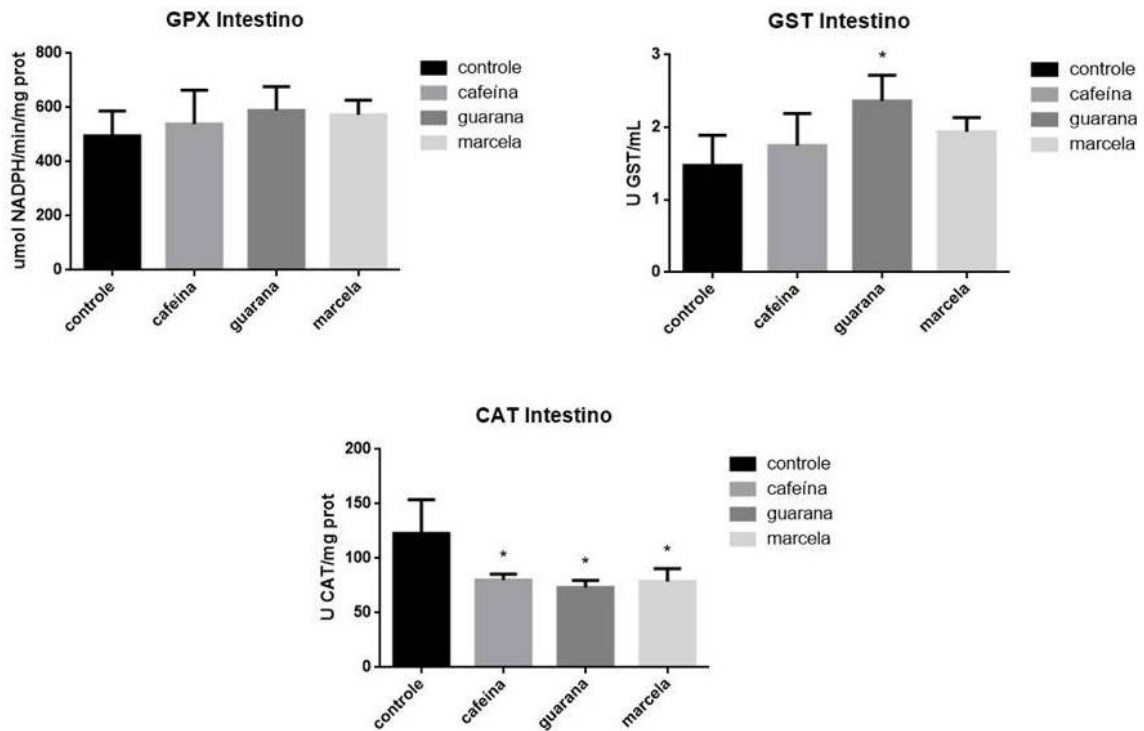


Fig. 5 Atividade das enzimas antioxidantes: enzima catalase (CAT), glutiona peroxidase (GPX) e Atividade da enzima de detoxificação glutiona-S-transferase (GST) na porção terminal do intestino.

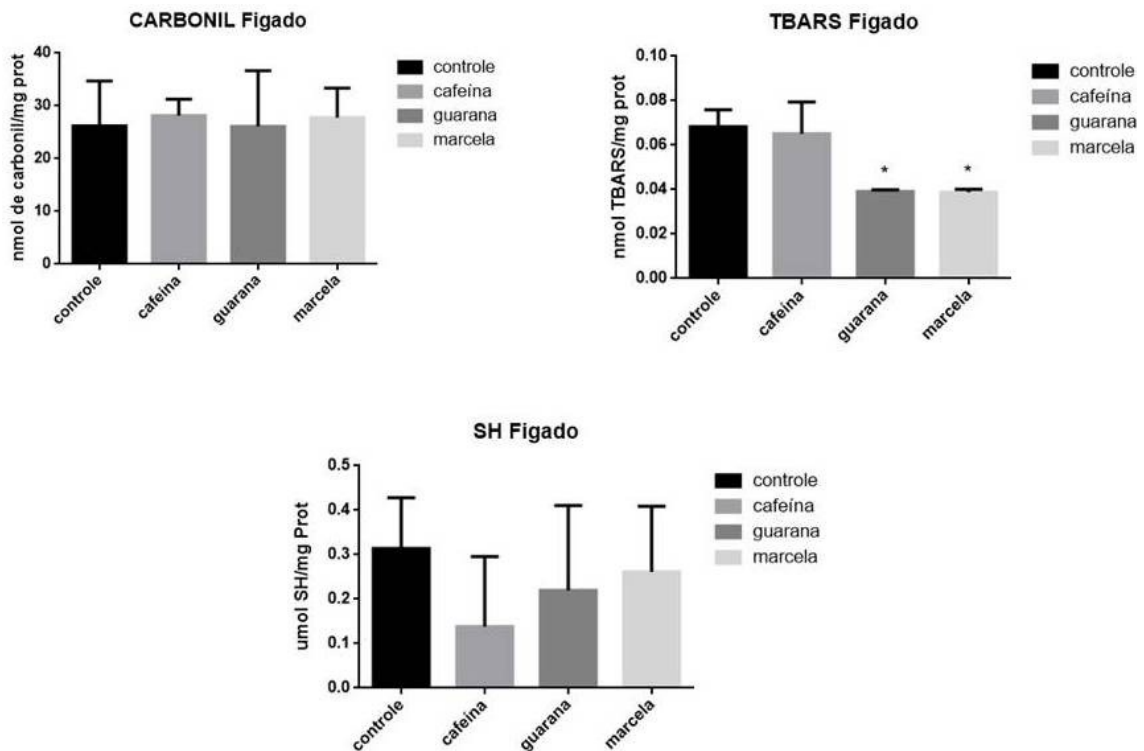


Fig. 6 Teste Lipoperoxidação (TBARS), Teste de Proteínas Carboniladas (Carbonil) e Dano ao grupamento Sulfidril (SH) no Fígado.

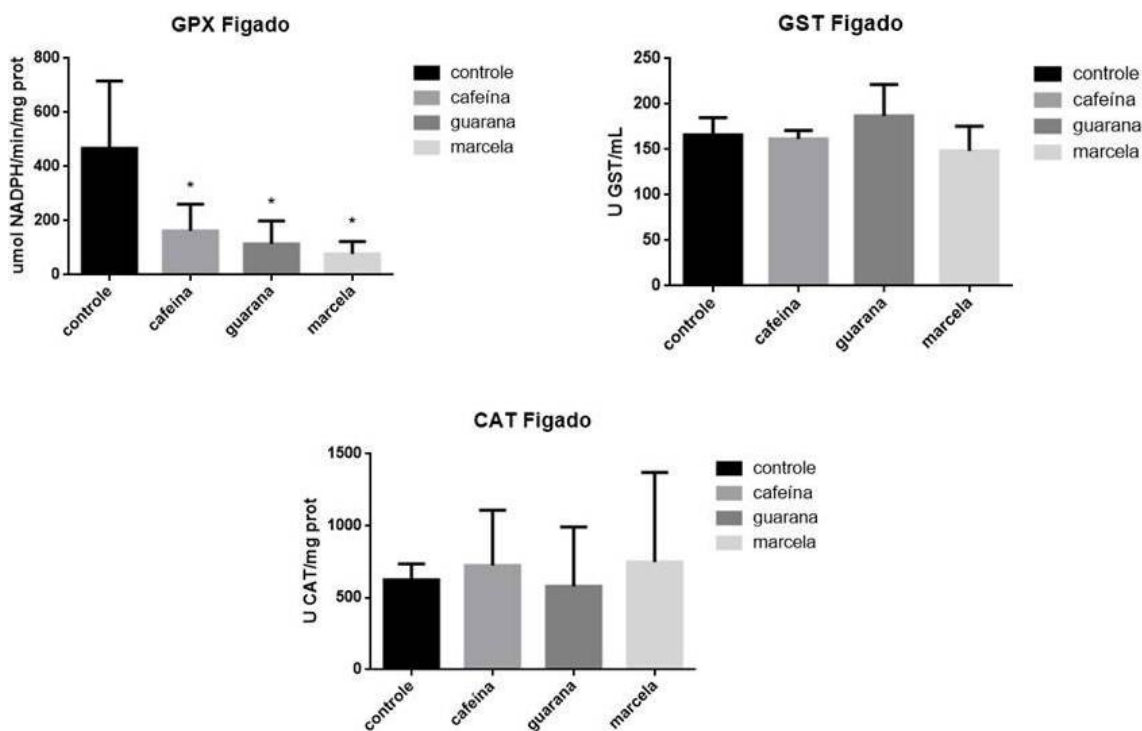


Fig. 7 Atividade das enzimas antioxidantes: Catalase (CAT) e Glutathiona peroxidase (GPX) e Atividade da enzima de detoxificação Glutathiona-S-transferase (GST) no Fígado.

3.6 Flavonoides modulam a atividade enzimática sem causar dano:

O epitélio intestinal funciona literalmente como uma barreira para bactérias patogênicas. Essa barreira não pode ser estritamente fechada, visto que a permeabilidade do intestino é essencial para a homeostase do sistema digestório.

É necessário um balanço entre a permeabilidade para reabsorver os sais biliares e nutrientes na digestão e um bloqueio da entrada de organismos potencialmente patogênicos. Essa barreira intestinal é formada por 3 camadas: um endotélio vascularizado na porção mais interna, uma camada e células epiteliais e uma cobertura de muco.

Esse muco é produzido por células de Goblet inseridas no epitélio intestinal através da secreção de mucina, que é glicosilada e polimerizada, formando uma camada de proteção. Quando temos uma disbiose intestinal podemos ter um desbalanço na permeabilidade do intestino, levando à uma maior entrada de toxinas ou de agentes patogênicos ou à uma menor absorção dos nutrientes e fluidos necessários para a homeostase corporal. (Zuckerman et al. 1993). Sabemos que a microbiota intestinal libera compostos secundários do seu metabolismo no lúmen do intestino, esses compostos secundários podem ser benéficos para o hospedeiro, como bacteriocinas específicas contra patógenos (Rea et al. 2011), ou maléficos como citocinas pró inflamatórias.

No caso das enzimas oxidantes, vimos uma diminuição da atividade da Catalase intestinal nos grupos tratados (Fig. 5). Essa diminuição pode significar que os polifenóis presentes no tratamento estão quelando os radicais livres intestinais. Essa diminuição dos radicais livres, que precisariam ser detoxificados, gera um menor recrutamento das enzimas, explicando a diminuição que vimos na Catalase. Essa menor atividade enzimática também se mostrou presente no fígado, onde tivemos uma diminuição na enzima GPX em todos os grupos tratados (Fig. 7). Essa diminuição na necessidade de enzimas antioxidantes é comprovada no teste de danos ao fígado, onde observamos uma menor peroxidação lipídica nos grupos tratados com extratos (Fig. 6). Essa diminuição corrobora com a hipótese de que os flavonóides dos extratos estão reagindo com os radicais livres que causariam um dano. Mesmo que os grupos controle sejam animais saudáveis, sabemos que o dano por estresse oxidativo ocorre naturalmente em todos os organismos que fazem respiração.

Na enzima de detoxificação Glutathione-S-Transferase do intestino, observamos um aumento no grupo tratado com Guaraná. Esse aumento provavelmente se deve à necessidade de detoxificar os xenobióticos presentes no extrato e excretá-los. Uma maior entrada de xenobióticos associados com GST pode ser interpretado com um aumento na permeabilidade intestinal. Como sabemos que o aumento da permeabilidade acompanha uma disbiose (Zuckerman et al. 1993), isso explica os resultados observados no sequenciamento, onde vemos o aumento na proporção F/B. Considerando que a

proporção de Firmicutes/Bacteroidetes pode ser considerada um parâmetro diretamente afetado no estado inflamatório crônico em síndromes metabólicas, como diabetes e obesidade, imaginávamos que o Guaraná causaria uma diminuição nessa proporção. Nossos resultados mostram que ambos os tratamentos com cafeína e guaraná aumentaram a proporção de Firmicutes/Bacteroidetes. As alterações nos dois grupos foram muito semelhantes, indicando que elas se devem principalmente à presença de cafeína no extrato. Utilizando apenas os filos como parâmetro podemos ter ideia de uma disbiose específica na microbiota intestinal dos animais tratados com o extrato de Guaraná (Fig. 3).

4 Conclusão

Considerando que a microbiota inicial dos ratos deste estudo corresponde a de indivíduos saudáveis, nossos resultados apresentam o extrato de *A. saturoioides* como um tratamento que não causa disbiose, capaz de manter as proporções naturais da microbiota intestinal, mesmo modulando a atividade enzimática. Já no extrato de *Paullinia cupana*, apesar de não observarmos dano oxidativo, fica claro que a utilização desses extratos gera uma disbiose intestinal. Essa disbiose se assemelha às alterações observadas em síndromes metabólicas, como obesidade e diabetes, onde temos um quadro pró inflamatório crônico.

5 Perspectivas Futuras

Agora que sabemos os efeitos dos extratos de *A. saturoioides* e *P. cupana* na microbiota de ratos saudáveis, podemos pensar em como utilizar esses extratos aliados à dieta. É possível pensar que a Marcela possa amenizar a disbiose causada por uma dieta hiperlipídica, assim como o Guaraná pode piorar o quadro inflamatório decorrente da síndrome metabólica e conseqüentemente disbiose, porém só com estudos futuros poderemos comprovar essas teorias.

Pensando no método de sequenciamento, essa técnica abre uma gama de opções para o nosso grupo de pesquisa, grande parte dos experimentos com modelo animal poderão ser visto de uma perspectiva nova. A ecologia microbiana geralmente é afetada junto com a homeostase corporal, quando observamos alterações em outros fatores corporais decorrente dos tratamentos, é possível que também vejamos uma disbiose.

6 Referências

- Bittencourt, L. da S. et al., 2014. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) Prevents β -Amyloid Aggregation, Generation of Advanced Glycation-end Products (AGEs), and Acrolein-Induced Cytotoxicity on Human Neuronal-Like Cells. *Phytotherapy research : PTR*, 28(11), pp.1615–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840232>.
- Borre, Y.E. et al., 2014. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), pp.509–518. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491414000811>.
- Carabotti, M. et al., 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, 28(2), pp.203–209. Available at: www.annalsgastro.gr.
- Cuervo, A. et al., 2014. Pilot study of diet and microbiota: Interactive associations of fibers and polyphenols with human intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23), pp.5330–5336.
- Etxeberria, U. et al., 2015. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(6), pp.651–660. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286315000352>.
- Galland, L., 2014. The Gut Microbiome and the Brain. *Journal of Medicinal Food*, 17(12), pp.1261–1272. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2014.7000>.

- Roud, J.L., 2014. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(5), pp.313–323.
- Carini, J.P. & Bassani, V.L., 2014. RSC Advances Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. , pp.3131–3144.
- Rea, M.C. et al., 2011. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), pp.4639–4644. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1001224107>.
- Del Regno, M. et al., 2015. Nivalenol induces oxidative stress and increases deoxynivalenol pro-oxidant effect in intestinal epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 285(2), pp.118–127. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X15001222>.
- La Rosa, P.S. et al., 2014. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), p.1409497111–. Available at: <http://www.pnas.org/content/early/2014/08/06/1409497111.abstract.html?etoc>.
- Zuckerman, M.J. et al., 1993. Intestinal permeability to [⁵¹Cr]EDTA in infectious diarrhea. *Digestive Diseases and Sciences*, 38(9), pp.1651–1657.
- Matsunaga, et al., 2001. *Legionella pneumophila* replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechins. *Infection and immunity*, 69(6), 3947-3953.
- Eumkeb, G. et al., 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 247-253.
- Palmer, C. et al., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(7), e177.
- Turnbaugh, P.J., et al., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444.7122 - 1027-131.
- Yatsunencko, T., et al 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486.7402: 222-227
- Sonaglio, D., et al. 1987. Padronização de Extrato Hidroalcoólico das Sumidades

Floridas de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae (Marcela),
Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

7 Agradecimentos

Agradeço à todas as pessoas que tornaram esse trabalho possível. O aprendizado científico não é uma tarefa trivial e exige prática e bons professores, tenho a sorte de ter os dois disponíveis no laboratório 32. Um agradecimento especial à M^a Karla Suzana Moresco por seus esforços incondicionais no projeto e nos ensinamentos, tanto dentro quanto fora do laboratório. Agradeço ao Prof. José Claudio Fonseca Moreira pela orientação ao longo da graduação e por mostrar que é possível um ensino dinâmico e interessante do conteúdo. Também agradeço à todos que me auxiliaram no trabalho de conclusão, os colegas e amigos do laboratório 32, do laboratório 310 e do IPR na PUCRS. À todas as pessoas que participaram da minha formação acadêmica e pessoal, o meu mais sincero obrigado.