

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

JESSICA MARIA ALVES BRASIL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SIMBIÓTICO *in vitro* DO NUTRACÊUTICO
FORMULADO COM *Limosilactobacillus Fermentum*, QUERCETINA E
RESVERATROL SOBRE A COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE METABÓLICA DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

João Pessoa

2024

JESSICA MARIA ALVES BRASIL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SIMBIÓTICO *in vitro* DO NUTRACÊUTICO
FORMULADO COM *Limosilactobacillus Fermentum*, QUERCETINA E
RESVERATROL SOBRE A COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE METABÓLICA DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciência da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Linha de pesquisa: Intervenção e diagnóstico nutricional.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves.

João Pessoa
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B823a Brasil, Jessica Maria Alves.

Avaliação do potencial simbiótico in vitro do nutracêutico formulado com
Limosilactobacillus Fermentum, quercetina e resveratrol sobre a composição e
atividade metabólica da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e com
hipertensão arterial / Jessica Maria Alves Brasil. - João Pessoa, 2024.

75 f. : il.

Orientação: José Luiz de Brito Alves. Dissertação
(Mestrado) - UFPB/CCS.

UFPB/BC

CDU 616.12-008.331.1(043)

JESSICA MARIA ALVES BRASIL

Avaliação do potencial simbiótico *in vitro* do nutraceutico formulado com *Limosilactobacillus Fermentum*, quercetina e resveratrol sobre a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e com hipertensão arterial

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 / agosto / 2024

BANCA EXAMINADORA

José Luiz de Brito Alves

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves
Orientador
PPGCN/DN/CCS/UFPB
Presidente da Banca examinadora

Kataryne Áraabe Rimá de Oliveira

Profa. Dra. Kataryne Áraabe Rimá de Oliveira
Examinador interno
PPGCN/DN/CCS/UFPB

Nathalia C.O. Melo

Profa. Dra. Nathalia Caroline de Oliveira Melo
Examinador externo
DN/CCS/UFPE

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço á minha família, por me mostrar, cada um de um jeito diferente, que a educação é responsável por nos fazer quebrar paradigmas e desbravar novos horizontes. Sei que sem vocês a necessidade de buscar cada dia por mais não teria nascido em mim.

Ao meu orientador, professor Dr. José Luiz de Brito Alves, por todos os ensinamentos, por todo tempo disponibilizado e por toda a paciência e vontade de fazer com que não só eu, mas todos os seus alunos apaixonem-se pela ciência e pela busca de novos desafios e conhecimento. Ele, mesmo com todas as provações e dificuldades inerentes a educação pública no nosso país, consegue ser um verdadeiro exemplo de dedicação e amor pelo o que faz.

Aos doadores voluntários das amostras fecais utilizadas na pesquisa, que se prontificaram e colaboraram com este trabalho.

Agradeço imensamente a todos os colegas de pesquisa que poderão trocar conhecimento comigo durante o processo, assim como todos os professores, técnicos e funcionários do Programa da Pós-graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) que de alguma forma contribuíram e enriqueceram minha trajetória.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos financiamentos concedidos a projetos de pesquisa que permitiu o desenvolvimento do presente estudo. E, por fim, a Universidade Federal da Paraíba que me proporcionou todas as oportunidades acadêmicas desempenhadas por mim até o momento.

RESUMO

A relação bidirecional entre a disbiose intestinal e a hipertensão arterial vem sendo descrita. Por esse motivo, a melhora da saúde intestinal vem sendo sugerida como uma estratégia promotora de saúde e de tratamento para a hipertensão. Mais recentemente, a ingestão do produto simbiótico formulados com cepas de *Limosilactobacillus (L.) fermentum* 139, 263 e 296 e com fenólicos prebióticos, quercetina e resveratrol, representa uma alternativa possivelmente moduladora da microbiota intestinal, capaz de beneficiar a saúde geral e o controle pressórico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial simbiótico do produto composto pelo mix de cepas de *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol sobre a diversidade e composição microbiológica e produção de metabólitos em inóculos fecais de pacientes saudáveis e portadores de hipertensão arterial. Para isso, foi elaborado o produto nutracêutico composto por cepas de *L. fermentum* 139, 263 e 296 liofilizadas com FOS (200 mg), adicionadas de quercetina (160 mg) e resveratrol (150 mg) (LfQR), o qual foi exposto a digestão gastrointestinal simulada. Posteriormente, foram elaborados 4 meios de fermentação colônica *in vitro*: i) Inóculo fecal com fezes de indivíduos saudáveis e meio de crescimento microbiano (CTL); ii) Inóculo fecal com fezes de indivíduos saudáveis, meio de crescimento microbiano e LfQR (CTL+LfQR); iii) Inóculo fecal com fezes de indivíduos hipertensos e meio de crescimento microbiano (HTN); iiiii) Inóculo fecal com fezes de indivíduos hipertensos, meio de crescimento microbiano e LfQR (HTN+LfQR). Em seguida, foi avaliada a diversidade, riqueza e abundância relativa de populações bacterianas intestinais e produção de metabólitos presentes nos dos meios colônicos *in vitro* após 48h de fermentação. Os meios CTL+LfQR e HTN+LfQR, em comparação a CTL e HTN, respectivamente, apresentaram menor diversidade alfa e o meio HTN+LfQR em comparação a HTN, apresentou menor riqueza microbiológica. Foi observada nos meios com nutracêutico meios CTL+LfQR e HTN+LfQR em comparação a CTL e HTN, respectivamente, maior abundância relativa de bactérias presentes no filo Proteobacteria, na família Entobacteriaceae e nos gêneros *Escherichia-shigella* e *Klebsiella*. Também foi observada menor abundância relativa em ambos os meios com nutracêutico do filo comensal Bacteroidota, da família Bacteroidaceae e do gênero *Bacteroides*, em comparação aos meios CTL e HTN. Os meios com nutracêutico apresentaram maior abundância relativa de comunidades bacterianas produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, sendo no meio CTL+LfQR em comparação ao CTL, observada maior abundância de bactérias da família Ruminococcaceae e Bifidobacteriaceae e do gênero *Feacalibacterium*, e no meio HTN+LfQR, em comparação a HTN, maior abundância da família Lachnospiraceae e do gênero *Lachnospirales*. Além disso, os meios CTL+LfQR e HTN+LfQR apresentaram maior teor de açúcares (maltose, frutose e glicose), ácido lático, etanol, ácido succínico e ácido acético, em comparação aos meios CTL e HTN ($p \leq 0,05$), respectivamente. A presença do produto nutracêutico nos meios foi eficaz na modulação da composição e dos parâmetros ligada à atividade metabólica microbiana presente na microbiota fecal de indivíduos saudáveis e hipertensos durante uma fermentação colônica *in vitro*. No entanto, devido à heterogeneidade dos resultados, é muito cedo para determinar se os efeitos na saúde do hospedeiro são benéficos ou não, e mais estudos são necessários para esclarecer esse resultado

Palavras-chave: microbiota intestinal; hipertensão; simbiótico; compostos fenólicos; probióticos.

ABSTRACT

The bidirectional relationship between intestinal dysbiosis and arterial hypertension has been described. For this reason, improving intestinal health has been suggested as a health-promoting and treatment strategy for hypertension. More recently, the ingestion of the symbiotic product formulated with strains of *Limosilactobacillus* (L.) *fermentum* 139, 263 and 296 and with prebiotic phenolics, quercetin and resveratrol, represents an alternative that possibly modulates the intestinal microbiota, capable of benefiting general health and blood pressure control. The objective of this study was to evaluate the symbiotic potential of the product composed of the mix of strains of L. *fermentum* 139, 263 and 296, quercetin and resveratrol on the microbiological diversity and composition and production of metabolites in fecal inoculum of healthy patients and those with arterial hypertension. For this purpose, a nutraceutical product composed of strains of L. *fermentum* 139, 263 and 296 lyophilized with FOS (200 mg), added with quercetin (160 mg) and resveratrol (150 mg) (LfQR) was prepared, which was exposed to simulated gastrointestinal digestion. Subsequently, 4 *in vitro* colonic fermentation media were prepared: i) Fecal inoculum with feces from healthy individuals and microbial growth medium (CTL); ii) Fecal inoculum with feces from healthy individuals, microbial growth medium and LfQR (CTL+LfQR); iii) Fecal inoculum with feces from hypertensive individuals and microbial growth medium (HTN); iv) Fecal inoculum with feces from hypertensive individuals, microbial growth medium and LfQR (HTN+LfQR). Then, the diversity, richness and relative abundance of intestinal bacterial populations and production of metabolites present in the *in vitro* colonic media after 48h of fermentation were evaluated. The CTL+LfQR and HTN+LfQR media, compared to CTL and HTN, respectively, presented lower alpha diversity and the HTN+LfQR medium, compared to HTN, presented lower microbiological richness. A higher relative abundance of bacteria present in the phylum Proteobacteria, in the family Entobacteriaceae and in the genera *Escherichia-shigella* and *Klebsiella*, was observed in the media with nutraceuticals, compared to CTL and HTN, respectively. A lower relative abundance of the commensal phylum Bacteroidota, of the family Bacteroidaceae and of the genus *Bacteroides*, was also observed in both media with nutraceuticals, compared to CTL and HTN media. The media with nutraceuticals showed a higher relative abundance of bacterial communities producing short-chain fatty acids, with a higher abundance of bacteria from the Ruminococcaceae and Bifidobacteriaceae families and the *Feecalibacterium* genus in the CTL+LfQR medium compared to CTL, and a higher abundance of the Lachnospiraceae family and the *Lachnospirales* genus in the HTN+LfQR medium compared to HTN. In addition, the CTL+LfQR and HTN+LfQR media showed a higher content of sugars (maltose, fructose and glucose), lactic acid, ethanol, succinic acid and acetic acid, compared to CTL and HTN media ($p \leq 0.05$), respectively. The presence of the nutraceutical in the media was effective in modulating the composition and parameters linked to the microbial metabolic activity present in the fecal microbiota of healthy and hypertensive individuals during an *in vitro* colonic fermentation. However, due to the heterogeneity of the results, it is too early to determine whether the effects on host health are beneficial or not, and further studies are needed to clarify this result.

Keywords: intestinal microbiota; hypertension; symbiotic; phenolic compounds; probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1:	Mecanismos fisiológicos na hipertensão arterial.....	15
Figura 2:	Interação do eixo intestino-cérebro no desenvolvimento da hipertensão arterial.....	18
Figura 3:	Estrutura química do resveratrol e da quercetina.....	21
Figura 4:	Fluxograma do desenho experimental.....	24
Figura 5:	Critérios de inclusão e exclusão utilizados para seleção dos doadores das amostras fecais.....	27

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO (APÊNDICE C)

Figure 1:	Beta diversity of fecal microbiota after 48h of <i>in vitro</i> fecal fermentation.....	64
Supplementary Figure 1:	Microbiota alpha diversity in media with and without a nutraceutical formulated with <i>L. fermentum</i> , quercetin and resveratrol after 48h of <i>in vitro</i> fecal fermentation with health and hypertensive individual	66
Supplementary Figure 2:	Relative abundance of microbial phyla <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1:	Classificação da pressão arterial para indivíduos a partir de 18 anos de idade.....	14
Tabela 2:	Descrição dos cenários utilizados na simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> ..	26

TABELAS DA ARTIGO (APÊNDECE C)

Table 1:	General characteristics of health and hypertensive donors of fecal samples	63
Table 2:	Contents of sugar and organic acids in medium with and without a nutraceutical formulated with <i>L. fermentum</i> , quercetin and resveratrol after 48h <i>in vitro</i> fecal fermentation with health and hypertensive individuals.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	13
2.2	MICROBIOTA INTESTINAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	16
2.3	MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA NA HAS.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA.....	23
3.2	CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO.....	24
3.3	PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO NUTRACÊUTICA.....	25
3.4	DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA DO NUTRACÊUTICO.....	25
3.5	FERMENTAÇÃO COLÔNICA <i>IN VITRO</i>	26
3.5.1	Inóculo fecal.....	26
3.5.1.1	Procedimentos éticos.....	26
3.5.1.2	Preparação do inóculo fecal.....	28
3.5.2	Elaboração das culturas de fermentação colônica <i>in vitro</i> e meio de crescimento microbiano.....	28
3.6	ANÁLISES PÓS-FERMENTAÇÃO.....	29
3.6.1	Quantificação das populações bacterianas nos sistemas de fermentação colônica.....	28
3.6.2	Determinação da atividade metabólica microbiana.....	30
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
4	RESULTADOS.....	30
	REFERÊNCIAS.....	33
	APÊNDICES.....	39

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PROJETO MOMITHA: MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: UM ESTUDO RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO.....	39
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PROJETO AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS COMPOSTAS POR <i>LIMOSILACTOBACILLUS</i> <i>FERMENTUM</i>, QUERCETINA E/OU RESVERATROL.....	41
APÊNDICE C – ARTIGO.....	44
ANEXOS.....	68
ANEXO A - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO PROJETO MOMITHA: MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: UM ESTUDO RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO.....	68
ANEXO B - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO PROJETO AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS COMPOSTAS POR <i>LIMOSILACTOBACILLUS</i> <i>FERMENTUM</i>, QUERCETINA E/OU RESVERATROL.....	73

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial (PA), é uma doença crônica não transmissível (DCNT) com etiologia multifatorial e manifestação frequente na população contemporânea (Tousoulis, 2020). A HAS é considerada fator de risco evitável para diversas comorbidades, dentre elas as doenças cardiovasculares, nefropatias crônicas e doenças neurológicas (Barroso *et al.*, 2021). Dada a gravidade da patologia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera prioridade, no âmbito da saúde pública, o estudo e desenvolvimento de medidas preventivas e de tratamento relacionadas à HAS (OMS, 2013).

Igualmente, evidências têm destacado a existência de uma relação bidirecional entre a HAS e a microbiota intestinal (Wang *et al.*, 2022), a qual pode ser definida como o ecossistema de micro-organismos que habitam o intestino em condição simbiótica com o hospedeiro (Adak; Khan, 2019). Desequilíbrios qualitativos e/ou quantitativos nos nichos microecológicos presentes no intestino (Klepinowski *et al.*, 2023) podem causar modificações orgânicas, como inflamação sistêmica de baixo grau e disfunção endotelial vascular, promovendo mecanismos de hiperativação simpática e consequente desenvolvimento da HAS (Grylls; Seidler; Neil, 2021). Por outro lado, a hiperativação simpática e a elevação da PA previamente instaladas podem promover modificações estruturais no epitélio do intestino e alterações negativas na composição microbiológica residente no órgão (Wang *et al.*, 2020).

Considerando a relação entre disbiose intestinal e HAS, estudos têm demonstrado que a modulação da microbiota intestinal pode se configurar como uma estratégia terapêutica promissora para a prevenção e tratamento desta comorbidade (Robles-Vera *et al.*, 2017; Chi *et al.*, 2020). A modulação da microbiota intestinal pode ser promovida principalmente através do manejo dietético, e com suplementação de simbióticos, substâncias prebióticas e/ou probióticos (Bilal; Ashraf; Zhao, 2022).

A ingestão combinada de prebióticos com probióticos em um mesmo produto tem demonstrado ser uma estratégia promissora para modular a saúde intestinal (Nguyen *et al.*, 2022). Os prebióticos são definidos como “substratos alimentares que alcancem o cólon humano e seja seletivamente fermentado por micro-organismos hospedeiros, conferindo, assim, efeitos benéficos à saúde” (Gibson *et al.*, 2017). Apesar da função prebiótica ser predominantemente desempenhada por substâncias oriundas de carboidratos indigeríveis (Yadav *et al.*, 2022), moléculas bioativas presentes em alimentos vegetais, denominadas compostos fenólicos, também exercem função prebiótica, promovendo o crescimento de

populações bacterianas benéficas no intestino (Singh *et al.*, 2019). Dentre esses compostos estão a quercetina e o resveratrol, os quais, além da prebióticos (Chen *et al.*, 2022), também desempenham função biológica antiinflamatória e antioxidante bem estabelecidas (Deepika; Maurya., 2022; Santos *et al.*, 2023).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Hill *et al.*, 2014). Esses podem ser empregados no tratamento de diferentes patologias como, por exemplo, na atenuação dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica através da promoção da melhora da função endotelial, redução do estresse oxidativo e perfil inflamatório, produção de peptídeos bioativos responsáveis pela inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), além de atuar nas vias metabólicas dependentes de óxido nítrico (de Brito *et al.*, 2016).

Ademais, os probióticos também são capazes de metabolizar os compostos fenólicos remanescentes que não foram absorvidos no intestino delgado, promovendo biotransformação dessas substâncias, ampliando sua absorção e funcionalidade (de Souza *et al.*, 2019). Dessa forma, a ingestão combinada de probióticos e polifenóis tem sido colocada como uma alternativa para melhorar reciprocamente as suas propriedades benéficas (Plamada; Vodnar, 2021).

Considerando as propriedades de benefícios à saúde do hospedeiro atribuídas aos probióticos e compostos fenólicos supracitados, Sampaio et al (2021), em um estudo prévio, desenvolveu um produto potencialmente nutracêutico formulado com quercetina, resveratrol, e cepas potencialmente probióticas de *Limosilactobacillus (L.) fermentum* 139, 263 e 296. A partir de análises *in vitro*, essa formulação mostrou-se como uma opção potencialmente terapêutica, com propriedades antioxidantes benéficas à saúde (Sampaio *et al.*, 2021).

Apesar dos achados, o efeito do bioproduto sobre o microbioma intestinal permanece como uma lacuna do conhecimento a ser investigada. Sendo assim, este estudo levantou a hipótese que o produto formado pelo mix de cepas *L. fermentum* 139, 263 e 296, associadas à quercetina e ao resveratrol promove efeitos prebióticos e probióticos, impactando positivamente na composição e na atividade metabólica da microbiota intestinal humana de pessoas saudáveis e com hipertensão arterial. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito exercido pelo mix de cepas de *L. fermentum* associado à quercetina e ao resveratrol sobre a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e com hipertensão arterial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A HAS é uma comorbidade caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial, onde são encontrados valores de pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg (Barroso *et al.*, 2021). Sua etiologia é complexa e multicausal, estando ligada ao aumento do débito cardíaco e da resistência vascular periférica (Jordan; Jurschat; Reuter, 2018). Esses mecanismos são regulados pela relação entre fatores genéticos e de estilo de vida, como ingestão excessiva de álcool, tabagismo, inatividade física e fatores dietéticos inadequados como os baseados em um consumo elevado de gordura saturada, gordura trans, colesterol dietético e sódio (Mills; Stefanescu; He, 2020; Muzaffar *et al.*, 2021).

A HAS é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, sendo estas responsáveis por causar, entre 1980 e 2016, cerca de 10,4 milhões de mortes em todo o mundo (GBD, 2017). O aumento nas taxas de HAS ocorre de forma inversamente proporcional à economia, sendo o seu crescimento de 31,5% nos países de renda média e baixa e 28,5% nos países de alta renda. No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde do ano de 2019, mais de 38 milhões de brasileiros com 18 anos ou mais foram diagnosticados com a doença (Mills; Stefanescu; He, 2020).

A partir da sua origem, é possível classificar a HAS como primária ou secundária. A HAS primária está ligada a modificações genéticas, como mutações no gene fosfodiesterase 3A e alterações monogênicas raras, ou ainda ligada a fatores comportamentais, como alta ingestão de sódio e álcool, má qualidade do sono e elevados níveis de estresse mental (Barroso *et al.*, 2021). Já a secundária tem seu aparecimento relacionado a outras comorbidades e alterações fisiológicas prévias, como estenose da artéria renal, aldosteronismo primário, tumores nas glândulas adrenais ou em outros tecidos neuroendócrinos (Oparil *et al.*, 2018).

O diagnóstico precoce da HAS é de grande importância para o prognóstico de saúde do indivíduo já que se trata de uma doença com evolução silenciosa e de rápida progressão, repercutindo em danos a órgãos com notável importância sistêmica (Olsen *et al.*, 2016). A fim de classificá-la, com finalidade diagnóstica, são realizadas duas ou mais aferições da PA, com intervalos diários ou semanais, e os valores obtidos são comparados com valores de corte padronizados (tabela 1) (Barroso *et al.*, 2021).

Tabela 1. Classificação da pressão arterial para indivíduos a partir de 18 anos de idade.

Classificação	Pressão arterial sistólica (mmHg)		Pressão arterial diastólica (mmHg)
Pressão arterial ótima	< 120	E	< 80
Pressão arterial normal	120-129	e/ou	80-84
Pré-hipertensão	130-139	e/ou	85-89
Hipertensão arterial Estágio 1	140-159	e/ou	90-99
Hipertensão arterial Estágio 2	160-179	e/ou	100-109
Hipertensão arterial Estágio 3	≥ 180	e/ou	≥ 110

Fonte: Adaptado de Barroso *et al.* (2020)

Guyton, Coleman e Granger (1972) descrevem que os mecanismos de controle fisiológicos clássicos da PA estão ligados à interação entre vários sistemas, a exemplo do cardiovascular, renal, neural e endócrino. Inicialmente, os mecanismos de controle são desencadeados por alterações no volume plasmático que são percebidos por sinalizadores, como o receptores de volume atrial, células endócrinas, barorreceptores e quimiorreceptores, os quais enviam mensagens ao sistema nervoso desencadeando respostas compensatórias, aumentando ou reduzindo a PA (Guyton; Coleman; Granger, 1972).

Mecanismos para promoção da elevação da PA ocorrem quando o volume sanguíneo se encontra diminuído, promovendo redução do tônus vascular, ativando respostas de controle. A curto prazo o sistema cardiovascular promove elevação do débito cardíaco e vasoconstrição, enquanto a longo prazo o sistema renal, mais especificamente o sistema renina-angiotensina-aldosterona, promove o aumento da retenção hídrica e de sais (Jordan; Kurschat; Reuter, 2018) (Figura 1). Em contrapartida, quando o volume sanguíneo se encontra aumentado o tônus vascular aumenta, ativando respostas de controle para atenuação da PA. A curto prazo ocorre a diminuição do débito cardíaco e vasodilatação, ambas promovidas pelo sistema cardiovascular, enquanto a longo prazo ocorre aumento da excreção de água e sais pela urina promovidos pelo sistema renal (Jordan; Kurschat; Reuter, 2018).

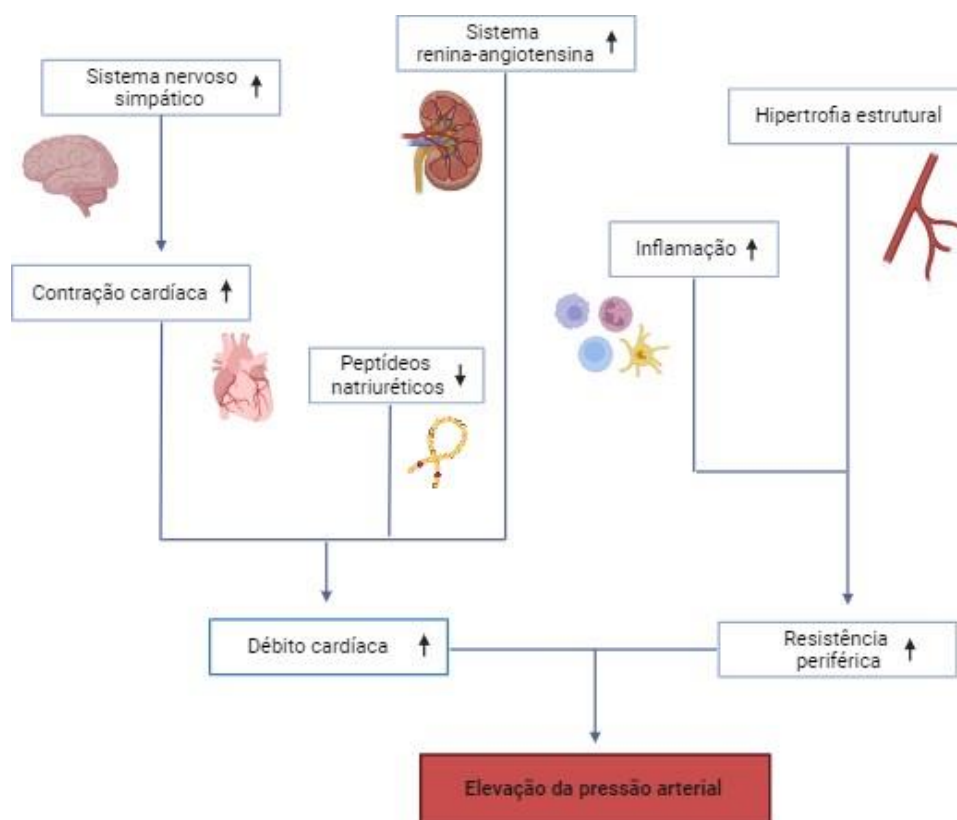
Entretanto, quando um ou mais elementos que participam do controle homeostático da PA não funciona de maneira adequada, ou sua hiperativação, induzida por estímulos hipertensivos constantes, desencadeiam respostas sistêmicas como fibrose, disfunções endoteliais e orgânicas, os níveis da pressão arterial tendem a se manter elevados de forma

constante, causando repercussões em vários órgãos, como em vasos, rins, coração e cérebro (Bleakley *et al.*, 2015).

Sabe-se também que níveis hipertensivos permanentes desencadeiam a ativação do sistema imunológico, induzindo a inflamação sistêmica (Mcmaster *et al.*, 2015). Nesse processo ocorre a liberação de células T e de macrófagos, estruturas que podem atingir órgãos-alvo e danificá-los, ampliando os prejuízos desencadeados pela HAS, além de prejudicar ainda mais o processo de controle fisiológico da PA, agravando a patogenia hipertensiva (Bartolomaeus *et al.*, 2019) (Figura 1).

Os níveis de pressão arterial sistêmica vêm sendo correlacionados com a composição da microbiota residente no intestino devido a influência exercida pelos metabólitos microbianos sobre vias mecanicistas cruciais no controle da PA, a exemplo das envolvidas no sistema vascular e nos mecanismos inflamatórios do organismo (Agita; Alsagaff, 2017; Maiuolo *et al.*, 2022).

Figura 1. Mecanismos fisiológicos na HAS.



Fonte: Adaptado de Jordan, Kurschat e Reuter, 2018 e Madhur *et al.* (2021).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A relação estabelecida entre o sistema nervoso, o intestino e a composição da microbiota intestinal pode exercer influência sobre vários processos fisiológicos (Ribeiro *et al.*, 2022). O intestino tem suas funções coordenadas pelo sistema nervoso entérico, sendo innervado principalmente por derivações de neurônios aferentes intrínsecos primários que se comunicam diretamente com as vias aferentes espinhais e vagais, enviando sinalizações periféricas ao sistema nervoso central (Gershon; Margolis, 2021). Essa conexão explica a ligação entre o intestino e o cérebro e justifica como as alterações excitatórias e inibitórias iniciadas no sistema nervoso repercutem no intestino e vice-versa (Ribeiro *et al.*, 2022).

A presença de níveis elevados de PA promove elevada atividade do sistema nervoso simpático no intestino, desencadeando modificações estruturais no órgão, como aumento da rigidez e fibrose das suas camadas musculares, diminuição das células caliciformes, menor quantidade de muco epitelial, diminuição das vilosidades e alteração nas proteínas envolvidas na sua vedação, aumentando a permeabilidade do endotélio intestinal (Richards *et al.*, 2022). Ademais, a elevação do tônus simpático no intestino promove disbiose intestinal (Li; Raizada; Richards, 2021; Santisteban *et al.*, 2017), situação caracterizada pela alteração tanto a nível taxonômico quanto funcional na composição das populações microbianas residentes no órgão (Kim *et al.*, 2018).

Em contrapartida, o intestino também pode exercer tanto influências positivas quanto negativas sobre os níveis de PA (Zubcevic *et al.*, 2019). Quando a microbiota presente no intestino encontra-se em homeostase, situação caracterizada pela adequada diversidade e proporcionalidade de micro-organismos comensais habitando todas as parcelas do órgão humano, a microbiota intestinal estabelece uma relação simbiótica com o hospedeiro, promovendo benefícios sistêmicos (Oliveira *et al.*, 2017). Esses micro-organismos comensais utilizam fontes prebióticas como substrato para produção de ácidos orgânicos, dentre eles o ácido acético, láctico, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e succínico (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021).

Os ácidos orgânicos, também denominados de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), desempenham diversas ações importantes que modulam positivamente os níveis da PA sistêmica. Dentre essas ações, os AGCC atuam epigeneticamente como componentes anti-inflamatórios por meio da inibição das histonas deacetilases (HDAC), suprimindo assim a produção de componentes pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral α , interleucina-12 e interferon- γ , e estimulando a produção de componentes anti-inflamatórios, a exemplo da

interleucina-10 (Calderón-Pérez *et al.*, 2020). Além disso, agem em diversos tecidos estimulando a expressão de receptores acoplados à proteína G, dentre eles o receptor de ácido graxo livre 2, culminando em respostas vasodilatadoras (Tan *et al.*, 2017). Outro mecanismo, dessa vez no eixo intestino-cerébro, acontece através da ativação do sistema nervoso parassimpático e da sua ligação aos receptores presentes no nervo vago, modulando positivamente os níveis de PA (Calderón-Pérez *et al.*, 2020).

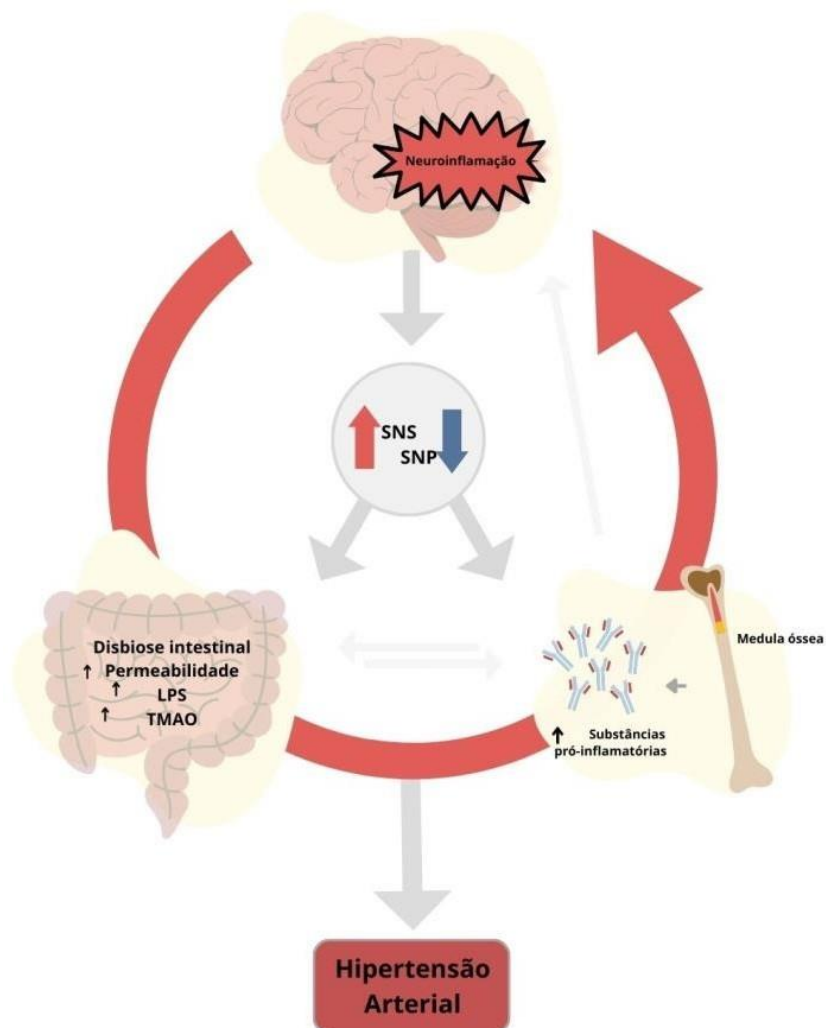
Entretanto, em situações onde o intestino encontra-se em disbiose, é comum haver uma quantidade elevada de bactérias gram-negativas, as quais possuem, dentre seus componentes estruturais, uma endotoxina denominada lipopolissacarídeo (LPS), substância pertencente à classe prototípica de padrões moleculares associados à patógenos (Zhu *et al.*, 2023). O LPS é responsável por causar repercussões negativas nos mecanismos fisiológicos de controle da PA, através, por exemplo, da promoção de disfunções no endotélio vascular. Essa molécula é responsável por ativar o receptor endotelial toll-like 4 (TLR4), que por sua vez, desencadeia vias oxidativas, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais reduzem a biodisponibilidade endotelial do óxido nítrico, repercutindo em disfunções vasculares (Grylls; Seidler; Neil, 2021).

A ativação dos TLR4 pelo LPS também desencadeia processos inflamatórios por meio da estimulação da transcrição de moléculas inflamatórias, como a interleucina 6, molécula de adesão intercelular 1, molécula de adesão vascular 1 e a E-selectina, culminando em inflamação vascular (Grylls; Seidler; Neil, 2021). Além disso, o LPS é responsável por elevar a propagação de impulsos simpáticos à medula óssea, estimulando a liberação de moléculas pró-inflamatórias produzidas no tecido medular, dentre elas as células progenitoras mieloides, causando inflamação periférica e neuroinflamação, retroalimentando mecanismos de hiperativação das vias simpáticas que podem desencadear HAS (Daí *et al.*, 2023).

Ademais, em um cenário de disbiose intestinal, é comum encontrar um aumento de bactérias patogênicas, como as da família Clostridiaceae e Enterobacteriaceae. Essas bactérias produzem o metabólito trimetilamina (TMA) a partir de componentes dietéticos como a colina, fosfatidilcolina, glicerol-fosfocolina, carnitina, betaína, lecitina e L-carnitina, o qual, após ser oxidado por células hepáticas, produz uma molécula denominada de N-óxido de trimetilamina (TMAO) (Gatarek; Kaluzna-Czaplinska, 2021). O TMAO desempenha mecanismos de ação que incluem aumento da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), o qual é responsável pela regulação positiva de sinais inflamatórios e pela adesão de leucócitos às células endoteliais. Também exerce a regulação negativa da expressão das citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10, que protegem o endotélio de danos causados pelo

aumento da inflamação e estresse oxidativo (Tang *et al.*, 2014). Outra ação desse metabólito é elevar a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir a produção de óxido nítrico, causando prejuízos na função vascular (Kirichenko *et al.*, 2020), além de prejudicar a capacidade das células endoteliais em corrigir os danos oxidativos, levando à disfunção endotelial irreversível (Maiuolo *et al.*, 2022). Esses diferentes mecanismos de interação entre a microbiota intestinal e HAS podem ser observados na figura 2.

Figura 2. Interação do eixo intestino-cérebro no desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica.



Fonte: Adaptado de Santisteban *et al.* (2016).

Abreviações: SNS, sistema nervoso simpático; SNP, sistema nervoso parassimpático; LPS, lipopolissacarídeo; TMAO, trimetilamina-N-óxido.

2.3 MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA NA HAS

A modulação da composição da microbiota intestinal pode representar uma medida terapêutica promissora para o controle da HAS, tendo em vista a relação bidirecional estabelecida entre ambas (Wang *et al.*, 2023). Atualmente, dentre as terapias direcionadas para a modulação da microbiota intestinal, estão àquelas baseadas na prescrição de intervenções de padrões dietéticos completos, alterando a ingestão qualitativa e quantitativa de macro e micronutrientes, assim como às baseadas na ingestão de fatores dietéticos isolados, como, por exemplo, a suplementação de probióticos, prebióticos e simbióticos (Yang *et al.*, 2023).

As intervenções baseadas na prescrição de padrões dietéticos completos, a exemplo da dieta denominada *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH) e da dieta do mediterrâneo, nas quais são preconizadas a ingestão de alimentos ricos em fibras, frutas, vegetais e boas fontes de gordura, são recomendadas para o tratamento das doenças cardiovasculares (Petersen *et al.*, 2021). Além disso, esses padrões dietéticos também são vistos como capazes de modular a microbiota intestinal humana por meio do fornecimento de substâncias responsáveis por aumentar a produção de AGCC no intestino, como compostos fenólicos, antioxidantes e gorduras poli e monoinsaturadas (Gou *et al.*, 2023).

As intervenções baseadas na suplementação de compostos dietéticos isolados, principalmente probióticos, prebióticos e simbióticos, também modulam benéficamente a microbiota intestinal (Markowiak; Śliżewska, 2017). Por definição, probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Hill *et al.*, 2014). A ingestão de probióticos modula a microbiota por meio de diferentes mecanismos, a citar: competição com bactérias patogênicas por nutrientes e por adesão ao epitélio, produção de substâncias antimicrobianas, modulação do sistema imunológico intestinal e melhora da integridade da barreira do intestinal (Hussain *et al.*, 2017; Markowiak; Śliżewska, 2017).

Sugere-se também que o uso desses micro-organismos desencadeia repercussões extraintestinais, como redução da PA em condições hipertensivas (Dong *et al.*, 2013; Khalesi *et al.*, 2014; Aoyagi *et al.*, 2017). Os mecanismos promotores da redução da PA desencadeada pelos probióticos aparentemente estão ligados ao aumento na diversidade bacteriana no intestino, produção de AGCC e melhora da função barreira intestinal (Gomez-Arango *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2017). Os probióticos também previnem a colonização do intestino por

bactérias fontes de LPS e por aquelas produtoras de metabólitos indesejáveis no órgão, a exemplo das produtoras de substratos precursores de TMAO (Chi *et al.*, 2020).

Dados reportados sobre a suplementação de probióticos no controle da HAS são bem divergentes, o que se deve aos distintos efeitos promovidos por diferentes micro-organismos, variando conforme a cepa utilizada (Mcfarland, 2014). As cepas potencialmente probióticas de *L. fermentum* 139, 263 e 296, isoladas respectivamente de subprodutos de processamento de manga, abacaxi e morango, (Garcia *et al.* 2016) caracterizadas como seguras (Cruz Neto *et al.*, 2023), imunomoduladoras (Freire *et al.*, 2021) e antioxidantes (Freire *et al.*, 2023), também têm demonstrado exercer efeitos benéficos sobre a saúde cardiovascular. Quando utilizadas em modelos animais, o mix dessas cepas promoveu a melhora do perfil lipídico, dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica, além de melhorar o cenário oxidativo e atenuar respostas excitatórias simpáticas (de Araújo *et al.*, 2022; de Oliveira *et al.*, 2020; do Nascimento *et al.*, 2022; Freire *et al.*, 2021; Freire *et al.*, 2023).

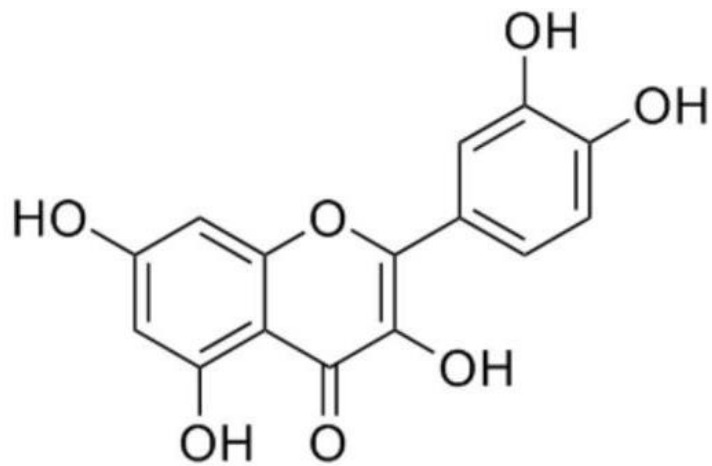
Outros compostos que também se destacam por sua capacidade de modular a composição da microbiota intestinal são os prebióticos. Essas substâncias são resistentes a acidez gástrica e a hidrólise enzimática, chegando ao colón com sua estrutura inicial preservada, sendo então fermentadas pela microbiota intestinal, modulando-a através da estimulação seletiva de seu crescimento e da sua atividade metabólica (Holscher *et al.*, 2017).

Inicialmente, Gibson e Roberfroid definiram os prebióticos como “um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de bactérias no cólon, e assim melhora a saúde do hospedeiro” (Gibson *et al.*, 2004). Porém, posteriormente, esse conceito foi revisado e redefinido como “um composto não digerível que, através da sua metabolização por micro-organismos no intestino, modula a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo assim um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro” (Bindels *et al.*, 2015). Um dos fatos que explica essa atualização é que, apesar da maioria dos prebióticos serem derivados de fibras alimentares, outros compostos também são capazes de exercer essa função, a exemplo dos compostos fenólicos (Holscher, 2017).

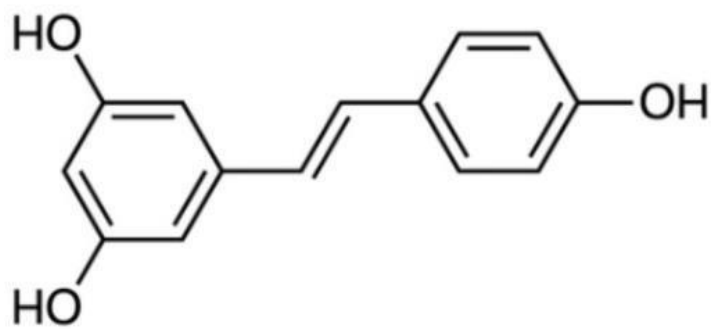
Os compostos fenólicos são substâncias que fazem parte de um grupo de metabólitos secundários produzidos por plantas sob condições adequadas ao seu desenvolvimento ou sob situações de estresse (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014). Um exemplo desses é a quercetina (2- (3,4-dihidroxifenil) -3,5,7-trihidroxicromen-4-ona), flavonóide frequentemente encontrado em alimentos (Lesjak *et al.*, 2018), como chá, vinho tinto, frutas vermelhas, maçãs, tomates e cebolas (Ting *et al.*, 2018) e o resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) que pode ser

extraído ou isolado da casca da uva e dos subprodutos da produção do vinho (Soleymani *et al.*, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do resveratrol e da quercetina.



Quercetina



Resveratrol

Fonte: Adaptado de Valookaran *et al.* (2022).

Ambos os compostos conferem benefícios à saúde por meio da execução de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórias (Hashemzaei *et al.*, 2017; Lesjak *et al.*, 2018; 2018; Ting *et al.*, 2018). Além disso, a associação dos dois compostos em um estudo desenvolvido por Castrejón-Téllez *et al.* (2020), utilizando modelo animal, desempenhou função hipotensora no grupo estudado através da elevação da produção de componentes relacionados à via do óxido nítrico, como o óxido nítrico sintetase endotelial e o superóxido dismutase 2.

A ingestão de produtos simbióticos, formados por micro-organismos probióticos e compostos bioativos prebióticos, também se apresenta como alternativa potencialmente terapêutica na melhora da saúde (Cheng *et al.*, 2023) uma vez que possibilita a interação entre ambos, ampliando, com isso, seus efeitos benéficos (de Souza *et al.*, 2018). A relação estabelecida entre os compostos fenólicos e micro-organismos benéficos, sejam aqueles presentes naturalmente na microbiota intestinal ou probióticos ingeridos, possibilita sua maior biodisponibilidade e, conseqüentemente, maior absorção e funcionalidade (Duda-Chodak *et al.*, 2015). Em contrapartida, os fenólicos também ampliam a ação dos micro-organismos probióticos por exercer efeito prebiótico sobre os mesmos, modulando positivamente a microbiota intestinal (Kawabata *et al.*, 2019).

Um exemplo desta interação é a estabelecida entre a quercetina e micro-organismos comensais benéficos, onde esses micro-organismos metabolizam o polifenol através da clivagem de seus anéis aromáticos liberando metabólitos como o ácido 2- (3,4-di-hidroxifenil) acético, ácido 2-(3-hidroxifenil) acético, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, floroglucinol, 3- (3,4-di-hidroxifenil), ácido propiônico e ácido 3-(3-hidroxifenil) propiônico (Stevens; Maier, 2016; Cueva *et al.*, 2017; Yammine *et al.*, 2021), além do metiladoisorhamnetina, substância mais presente no soro após ingestão e metabolização da quercetina pelos micro-organismos (Shi *et al.*, 2020).

Em contrapartida, a quercetina exerce influência sobre os micro-organismos benéficos devido a seu efeito prebiótico sobre a microbiota (Shabbir *et al.*, 2021). Em estudos *in vivo*, o fenólico melhorou a diversidade da comunidade bacteriana intestinal, causou recuperação da função de barreira intestinal, melhorou a estrutura das vilosidades e mucosa do intestino (Etxeberria *et al.* 2015), além de reduzir os níveis de micro-organismos fontes de LPS, melhorando conseqüentemente parâmetros de inflamação sistêmica (Zhou; Liu; Li, 2020).

Já o resveratrol é metabolizado por micro-organismos resultando em substâncias como o diidroresveratrol, 3,4'-di-hidroxi- trans -estilbeno e 3,4'-di-hidroxibenzil (BODE *et al.*, 2013). Além disso, a microbiota também metaboliza os precursores de resveratrol, como é o caso do piceídeo, produzindo assim moléculas como dihidropeide e diidroresveratrol (Wang *et*

al., 2011). Compensatoriamente, em estudos *in vivo*, o resveratrol modulou a microbiota intestinal beneficamente, estimulando o crescimento de abundâncias relativas bacterianas potencialmente probióticas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Chen *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2009), além de promover redução da abundância relativa de gêneros de bactérias patogênicas como a *Prevotella*, *Anaerotruncus*, *Alistipes*, *Helicobacter* e Peptococcaceae (Chen *et al.*, 2016).

Ademais, a administração conjunta da quercetina e do resveratrol também vem sendo sugerida como capaz de modular a microbiota intestinal. Em um estudo desenvolvido por Zhao *et al.* (2017), com modelo animal, a combinação dos dois fenólicos exerceu efeito prebiótico, promovendo a diminuição da abundância relativa de Desulfovibrionaceae, Acidaminococcaceae, Coriobacteriaceae e Lachnospiraceae presentes no intestino dos animais.

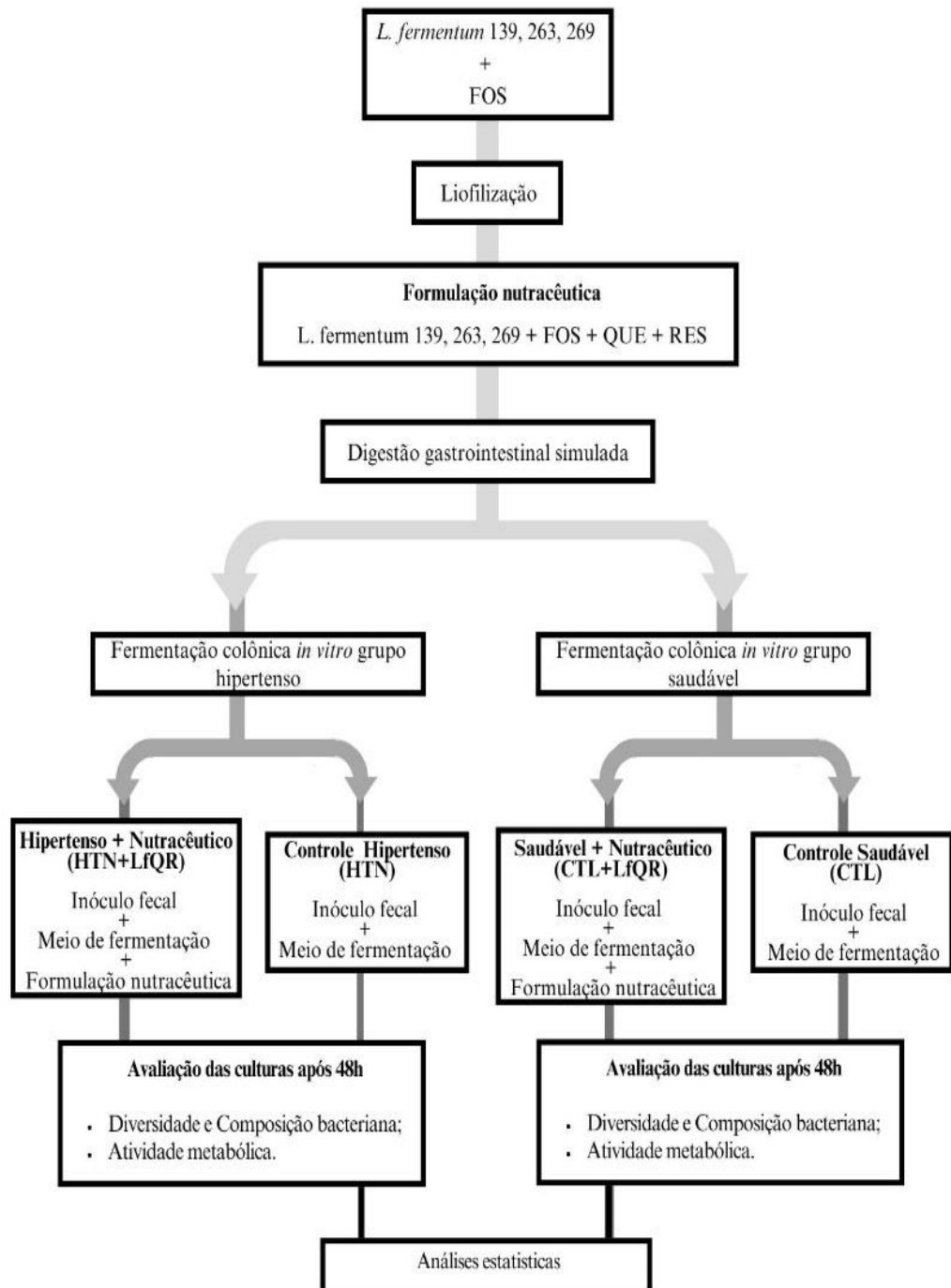
Diante do exposto, a associação de quercetina e resveratrol a cepas probióticas pode exercer efeito benéfico à saúde do hospedeiro. Por esse motivo, um produto bioterapêutico composto pelo mix de cepas de *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol com propriedades antioxidantes foi desenvolvido (Sampaio *et al.*, 2021), entretanto a capacidade de modular a microbiota de adultos saudáveis ou de portadores de HAS ainda não foi elucidada. Diante disso, o desenvolvimento do estudo justifica-se para obtenção de informações sobre a possível propriedade simbiótica produto, aumentando as opções capazes de modular a microbiota intestinal podendo assim serem utilizadas como suplemento dietético promotor de benefícios a portadores de HAS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados, em sua maioria, no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Campus I, João Pessoa – PB. A execução das análises cromatográficas ocorreu no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF Sertão-PE), Petrolina – PE, e a execução da análise da identificação das populações bacterianas presentes nos meios foram realizadas pela empresa de biotecnologia Neoprospecta, Florianópolis – SC. De forma a melhor elucidar, a condução desse desenho do estudo encontra-se apresentado na figura 4.

Figura 4. Fluxograma do desenho experimental



Fonte: Autoria própria (2024)

3.2 CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

O mix de cepas *L. fermentum* 139, 263 e 296 isoladas respectivamente dos subprodutos do processamento de manga, abacaxi e morango e previamente caracterizadas como probióticas foram utilizadas para produção do nutracêutico (Garcia *et al.*, 2016; Albuquerque *et al.*, 2017; Cavalcante *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020).

Os estoques das cepas foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (20 mL/100mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Antes da utilização no ensaio, as cepas foram cultivadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) em caldo MRS (HiMedia) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 - 24 h (para alcance da fase estacionária de crescimento), centrifugadas (4000 rpm $\times$ 10 min., $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e lavadas em solução salina esterilizada (0,85 g/100 mL). Posteriormente as cepas foram ressuspensas em água destilada estéril e misturado em proporções iguais (1:1:1, v/v) para obter uma suspensão de células com leitura de densidade óptica a 625 nm (OD625) de 2,5 e contagens de células viáveis de aproximadamente 10 log de Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) (Silva *et al.*, 2023).

3.3 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO NUTRACÊUTICA

O mix de cepas *L. fermentum* 139, 263, 296 foi suspenso em água destilada esterilizada (1 mL) com 200 mg de frutooligossacarídeos [FOS, 20% p/v (200 mg) F8052, Sigma-Aldrich; reconhecido como crioprotetor para células bacterianas (Romano *et al.*, 2016)]. A formulação foi submetida ao congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, sendo seguida de liofilização a uma temperatura de $-55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com pressão de vácuo $<138\text{ }\mu\text{HG}$, taxa de liofilização de 1 mm/h, por aproximadamente 40 horas, utilizando liofilizador de bancada (LIOTOP, Modelo L-101, São Carlos-SP, Brasil).

Às cepas liofilizadas foi adicionado 150mg de resveratrol e 160mg de quercetina, sendo essas quantidades selecionadas de acordo com doses efetivas e seguras sugeridas por estudos prévios (Dower *et al.*, 2015, EFSA, 2016), e então a mistura recém adquirida foi agitada em vórtex por 20 minutos e armazenadas em frascos com tampa de rosca e sob proteção de luz, os quais foram mantidos em dessecadores contendo sílica gel para controle da umidade relativa e armazenados sob refrigeração ($4 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Sampaio *et al.*, 2021).

3.4 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA DO NUTRACÊUTICO

A formulação nutracêutica foi submetida à digestão simulada *in vitro*, a fim de reproduzir sua passagem pelo trato gastrointestinal anterior até a sua chegada à porção final do intestino. Para isso, a formulação foi reidratada em água destilada (1:9) a temperatura de $25 \pm 0,5$ °C por 15 minutos em frascos de vidro, onde foram realizadas de forma contínua as fases da digestão, mimetizando a boca, estômago, duodeno e íleo, e os movimentos peristálticos simulados por agitação mecânica. Todos os processos foram realizados em incubadora (TECNAL TE424, São Paulo, Brasil) a $37 \pm 0,5$ °C com ajuste de rotação em cada fase (Albuquerque *et al.*, 2018) (Tabela 2). Todas as enzimas e sais biliares bovinos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Tabela 2. Descrição dos cenários utilizados na simulação gastrointestinal *in vitro*.

Órgão	Simulação do ambiente	Peristaltismo
Boca	100U/mL de α -amilase diluída em CaCl ₂ a 1mM, pH ajustado com NaHCO ₃ a 1M (pH 6,9/2 min)	Agitação (200 rpm)
Estômago	25mg de pepsina em 1mL de HCl a 0,1M, adicionado a uma taxa de 0,05 mL/mL, pH ajustado com HCl a 1M (pH 2/50 min)	Agitação (130 rpm)
Duodeno	2g de pancreatina/L de NaHCO ₃ a 0,1M, 12g de sais biliares bovinos/L de NaHCO ₃ a 0,1M, pH ajustado com NaHCO ₃ a 0,1M (pH 5/30min)	Agitação (45 rpm)
Íleo	PH ajustado com NaHCO ₃ a 0,1M (6,5/60 min)	Agitação (45 rpm)

Fonte: Adaptado de Albuquerque *et al.* (2018).

3.5 FERMENTAÇÃO COLÔNICA *IN VITRO*

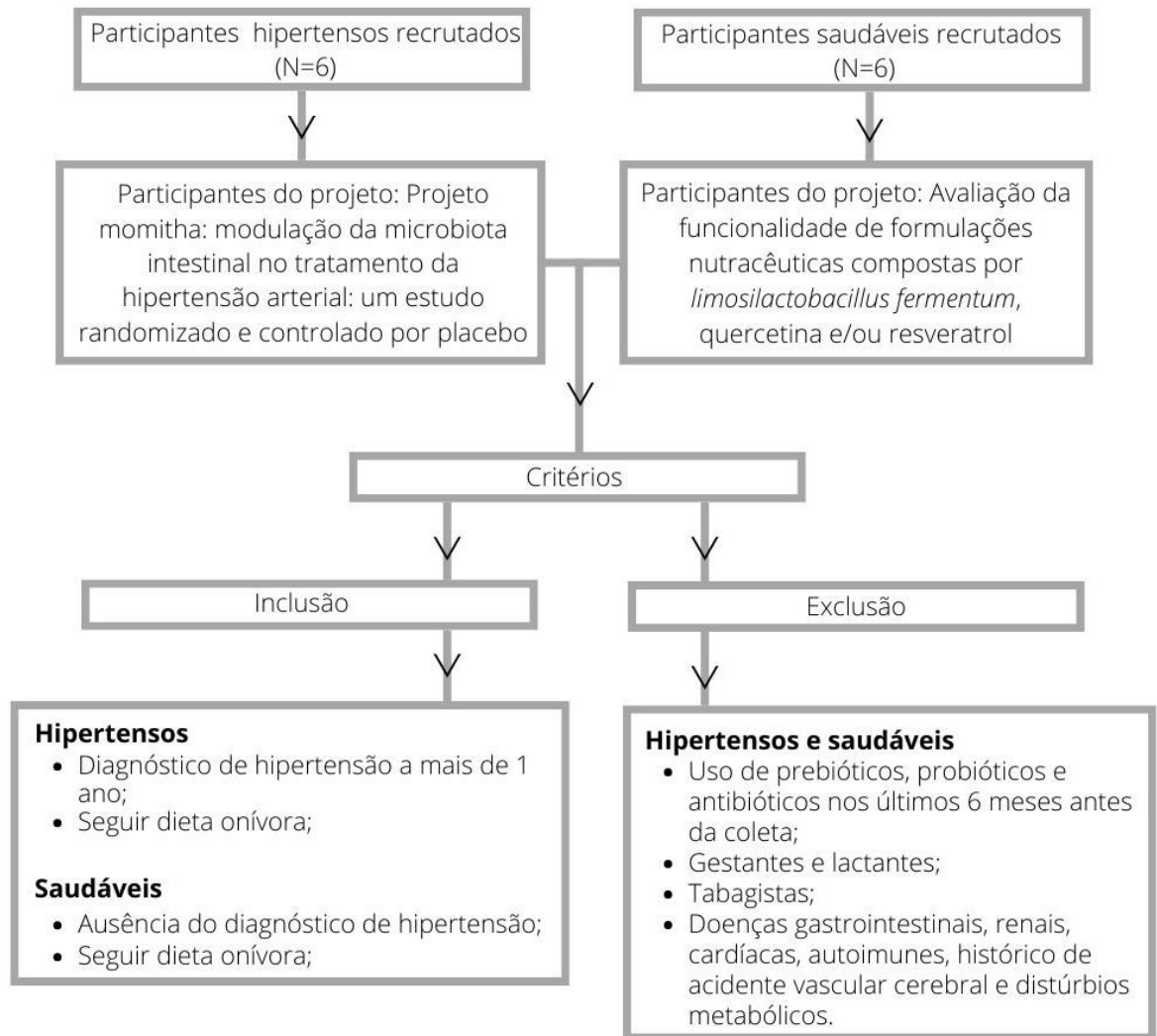
3.5.1 Inóculo fecal

3.5.1.1 Procedimentos éticos

Os voluntários portadores de HAS doadores das amostras fecais foram provenientes de um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo intitulado: “Projeto MOMITHA: modulação da microbiota intestinal no tratamento da hipertensão arterial: um estudo randomizado e controlado por placebo”. Já os indivíduos saudáveis doadores das amostras fecais foram os participantes da pesquisa experimental denominada: “Avaliação da

funcionalidade de formulações nutraceuticas compostas por *Limosilactobacillus fermentum*, quercetina e/ou resveratrol” (Figura 5).

Figura 5. Critérios de inclusão e exclusão utilizados para seleção dos doadores das amostras fecais.



Fonte: Autoria própria (2024)

Considerando as exigências do Conselho Nacional de Saúde, ambos os projetos foram devidamente submetidos à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde/UFPB, tendo em vista a utilização de material biológico proveniente de fezes humanas, baseado na Resolução 466/12 (CNS-MS, 2012), que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e estabelece que "toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa".

Os protocolos experimentais foram aprovados sob os números, respectivamente, 5.626.691 (ANEXO A) e 5.049.860 (ANEXO B), de acordo com o parecer consubstanciado. Os indivíduos participantes da pesquisa foram esclarecidos acerca da temática de cada pesquisa e em seguida, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A e B).

Os critérios de inclusão utilizados para seleção dos doadores foram: seguir dieta onívora, possuírem diagnóstico médico de HAS há mais de um ano para os pacientes do grupo hipertensão arterial, e no caso dos saudáveis, a ausência do diagnóstico de HAS, assim como de outras comorbidades. Os critérios de exclusão foram: uso de prebiótico, probiótico e antibióticos em, pelo menos, seis meses antes da coleta das amostras fecais, gestantes e lactantes, tabagistas, diagnóstico de doenças gastrointestinais, renais, cardíacas e autoimunes, acidente vascular cerebral e distúrbios metabólicos (diabetes mellitus tipo 2, hipercolesterolemia familiar) (Figura 5).

3.5.1.2 Preparação do inóculo fecal

As amostras fecais coletadas dos indivíduos do grupo saudável foram misturadas em igual quantidade (1:1:1:1:1:1 p/p), diluídas (1:10 p/v) em tampão fosfato salino (PBS 0,1 M; pH 7,4), esterilizadas e homogeneizadas por 2 minutos sob agitação (200 rpm). Em seguida, foram filtradas com o uso de uma camada tripla de gazes esterilizadas para remoção de partículas grandes e armazenadas ($37 \pm 0,5$ °C) em frascos esterilizados sob condições anaeróbicas (AnaeroGen). O mesmo procedimento foi realizando com as fezes doadas pelos indivíduos com hipertensão arterial.

3.5.2 Elaboração das culturas de fermentação colônica *in vitro* e meio de crescimento microbiano

Foram elaborados quatro meios de fermentação. Os meios saudáveis de fermentação colônica foram: meio controle (CTL), composto por 50% (v/v) de inóculo fecal saudável e 50% (v/v) de meio de fermentação estéril; e meio controle com nutracêutico (CTN+LfQR), composto por 40% (v/v) de inóculo fecal saudável, 40% (v/v) de meio de fermentação estéril e 20% da formulação composta por *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol previamente digeridos. Os meios de fermentação colônica hipertensiva foram: meio hipertensivo (HTN), composto por 50% (v/v) de inóculo fecal hipertensivo e 50% (v/v) de meio de fermentação estéril; e um meio hipertensivo com nutracêutico (HTN+LfQR), composto por

40% (v/v) de inóculo fecal hipertensivo, 40% (v/v) de meio de fermentação estéril e 20% da formulação composta por *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol previamente digeridos. Logo após elaboração, os quatro meios de fermentação foram submetidos à incubação sob anaerobiose (AnaeroGen) por 48 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hu *et al.*, 2013).

O meio de crescimento microbiano utilizado teve composição, para cada 1 litro de produto: 4,5 g de NaCl, 4,5 g de KCl, 1,5 g de NaHCO_3 , 0,69 g de MgSO_4 , 0,8 g de L-cisteína, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,4 g de sal biliar, 0,08 g CaCl_2 , 0,005 g de FeSO_4 , 1 mL de Tween 80 e 4 mL de solução de resazurina (0,025%, v/v) como indicador anaeróbio, diluído em água destilada e esterilizado por autoclavagem ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atm, 15 min) (Hu *et al.*, 2013).

3.6 ANÁLISES PÓS-FERMENTAÇÃO

3.6.1 Quantificação das populações bacterianas nos sistemas de fermentação colônica

Após 48 h de fermentação, uma alíquota de 0,5 ml de cada meio de fermentação foi coletada para sequenciamento 16S RNA. A diversidade, riqueza e abundância relativa bacteriana foi avaliada através de sequenciamento de alto rendimento da região 16S rRNA V3/V4 empregando primers 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT).

Após o sequenciamento, filtros de qualidade foram aplicados aos arquivos fastq, incluindo a remoção de leituras truncadas e de baixa qualidade (pontuação Phred <20) utilizando a ferramenta Trimmomatic (Quast, Pruesse *et al.*, 2013). Leituras pareadas de sentido e antisense foram mescladas em contigs, e os singletons e quimeras foram removidos. Os arquivos de sequência foram importados para o QIIME2 versão 2021 e processados para remoção de sequências ruidosas, quiméricas e singletons, união de leituras finais emparelhadas, desreplicação e obtenção de variantes de sequência de amplicon (ASVs) usando o plugin DADA2.

Uma árvore filogenética foi construída usando o plugin SEPP de inserção de fragmentos do QIIME2 com o banco de dados de referência Silva (Quast, Pruesse *et al.*, 2013), e a composição taxonômica foi avaliada com o plugin q2-feature-classifier do QIIME2. Os arquivos resultantes do QIIME2 foram importados para R usando o pacote phyloseq. Gráficos de taxa de barras e análises de diversidade foram realizados usando o pacote microViz R. A diversidade alfa foi calculada como o índice de Shannon e a métrica de diversidade beta consistiu na

distância Bray-Curtis/UniFrac não ponderada. A análise diferencial foi conduzida com o pacote R microbiomeMarker usando a ferramenta ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx2) e análise discriminante linear Effect Size (LEfSe) (Quast, Pruesse *et al.*, 2013).

3.6.2 Determinação da atividade metabólica microbiana

Após 48 h de fermentação, uma alíquota de 1,5 ml de cada meio de fermentação foi coletada para a quantificação do conteúdo de AGCC (acético, butírico e propiônico), açúcares, etanol e ácidos orgânicos. Esses compostos foram quantificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um cromatógrafo líquido (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, EUA) equipado com uma bomba de solvente quaternário (G1311C modelo), desgaseificador, compartimento de coluna termostática (modelo G1316A e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a um diodo detector de matriz (DAD) (modelo G1315D) e detector de índice de refração (RID) (modelo G1362A).

As condições analíticas foram: Uma coluna AgilentHiPlex H (7,7 × 300 mm, 8 µ), fase móvel 0,004 mol/L H₂SO₄ em água ultrapura e vazão de 0,7 mL/min. O OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies) processou os dados. Os picos de amostra de HPLC foram identificados comparando sua retenção vezes com padrões de açúcar e ácidos orgânicos (Sigma Aldrich). Áreas médias de pico foram consideradas para quantificar açúcares e ácidos orgânicos com resultados expressos em g/L (Menezes *et al.*, 2021).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A atividade metabólica da microbiota intestinal foi avaliada no programa STATA (v15.0, College Station, TX, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e foi utilizado o teste de variância *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Os resultados e discussões desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo original apresentado no apêndice C, denominado “*Investigating the potential effects of a nutraceutical formulated with *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and resveratrol on the fecal microbiota of healthy and hypertensive subjects*”, com perspectiva de publicação na revista *Food Bioscience*.

O artigo avaliou os impactos da formulação nutracêutica composto por cepas probióticas de *L. fermentum* 139, 263 e 296 ($\sim \log 10$ UFC/mL; proporção 1:1:1), quercetina (160 mg) e resveratrol (150 mg) após 48h de fermentação em um meio de fermentação colônica desenvolvido com inóculo fecal de indivíduos saudáveis e em um meio de fermentação colônica desenvolvido com inóculo fecal de indivíduos com hipertensão arterial sobre a diversidade, composição e atividade metabólica da microbiota intestinal.

A diversidade β da microbiota fecal diferiu entre os grupos CTL e HTN, conforme mostrado pela razão de dissimilaridade de Bray-Curtis e distâncias UniFrac ponderadas (Figura 1a), indicando uma composição distinta da microbiota intestinal. O nutracêutico formulado com *L. fermentum*, quercetina e resveratrol modulou a diversidade β de forma semelhante nos grupos CTL e HTN após a fermentação fecal.

A diversidade α não diferiu entre os grupos CTL e HTN. De acordo com o ALDEX2, um método de análise de abundância diferencial, o grupo CTL teve uma abundância relativa reduzida de Firmicutes e uma abundância relativa aumentada de Fusobacteriota a nível do filo após a fermentação fecal. Em contraste, o grupo HTN teve uma abundância relativa aumentada de Firmicutes após a fermentação fecal. O nutracêutico reduziu a abundância relativa do filo Fusobacteriota e aumentou a abundância relativa do filo Proteobacteria nos grupos CTL e HTN após a fermentação fecal.

Foi observado também que o nutracêutico aumentou a abundância relativa das famílias Enterobacteriaceae e Lachnospiraceae tanto no grupo CTL (CTL versus CTL + LfQR) quanto no grupo HTN (HTN versus HTN + LfQR) após a fermentação fecal, respectivamente. O nutracêutico aumentou a abundância relativa dos gêneros *Escherichia-Shigella* tanto no grupo CTL quanto no grupo HTN.

A análise de LDA mostrou um enriquecimento de Lachnospiraceae e *Lachnospirales* no grupo HTN + LfQR (HTN versus HTN + LfQR), bem como de Proteobacteria, Gammaproteobacteria, *Enterobacteriales* e *Escherichia-Shigella* no grupo CTL + LfQR (CTL versus CTL + LfQR) (Figura 1b).

Os conteúdos de maltose, glicose, frutose, ácido láctico, ácido acético e ácido succínico foram maiores nos grupos HTN+LfQR e CTL+LfQR em comparação com CTL e HTN após fermentação fecal ($p \leq 0,05$), enquanto os conteúdos de ramnose foram menores nos grupos HTN e CTL em comparação com os grupos HTN + LfQR e CTL + LfQR ($p \leq 0,05$). Além disso, o grupo HTN + LfQR apresentou menor teor de ácido propiônico em comparação ao grupo HTN após fermentação fecal ($p \leq 0,05$).

O produto nutracêutico com propriedades simbióticas formado pela cultura mista *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol foi capaz de impactar de forma variada nos parâmetros de diversidade, riqueza e abundância relativa de grupos microbiológicos, como também foi capaz de modificar a composição de metabólitos presentes nos meios em que estava presente. De forma geral, foram observados que os meios com o produto bioterapêutico apresentaram menor diversidade alfa e riqueza microbiológica, além de maior abundância relativa gêneros bacterianos diversos. A composição metabólica dos meios também sofreu alteração, sendo identificado diferenças significativas entre os meios com e sem nutracêutico. A partir da heterogeneidade dos resultados levantados, mais estudos precisam ser desenvolvidos a fim de determinar a natureza dos efeitos promovidos pelo produto a saúde humana.

REFERENCIAS

- ADAK. A. & KHAN M. R. An insight into the intestinal microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 76, n. 3, p. 473–493, 2019.
- AGITA. A. & ALSAGAFF, M. T. Inflammation, Immunity and Hypertension. **Acta Medica Indonesiana**. v. 49, n. 2, p. 158-165, 2017.
- AOYAGI Y., *et al.* Habitual intake of fermented dairy products containing *Lactobacillus casei* Shirota strain and reduced risk of hypertension in the elderly. **Benefits Microbes**. v. 8, n. 1, p.23–29, 2017.
- BARROSO, W. K. S., *et al.* Brazilian Guidelines of Hypertension - 2020. **Brazilian Archives of Cardiology**, v. 116, n. 3, p. 516-658, 2021.
- BARTOLOMAEUS, H. *et al.* Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects from Hypertensive Cardiovascular Damage. **Circulation**. v. 139, n. 11, p. 1407-1421, 2019.
- BILAL M, ASHRAF S, ZHAO X. Dietary Component-Induced Inflammation and Its Amelioration by Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. **Frontiers in Nutrition**.v. 22, n.9. p. 931458, 2022.
- BINDELS, L. B., *et al.* Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 12, n. 5, p.303-1, 2015.
- BLEAKLEY, C. *et al.* Endothelial Function in Hypertension: Victim or Culprit? **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 8, p. 651-654, 2015.
- BODE, L. M., *et al.* In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. **The American journal of clinical nutrition**. v. 97, n. 2, p. 295–309, 2013.
- CALDERÓN-PÉREZ, L., *et al.* Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. **Scientific reports**, v.10, n. 1, p. 6436, 2020.
- CASTREJÓN-TÉLLEZ, V., *et al.* Effect of a Resveratrol/Quercetin Mixture on the Reversion of Hypertension Induced by a Short-Term Exposure to High Sucrose Levels Near Weaning and a Long-Term Exposure That Leads to Metabolic Syndrome in Rats. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 2231, 2020.
- CHEN, M. L., *et al.* Resveratrol attenuates trimethylamine N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis by regulating TMAO synthesis and bile acid metabolism through gut microbiota remodeling. **MBio**. v. 7, n. 2, p. e02210-15, 2016.
- CHEN, X., *et al.* Plant-derived bioactive compounds and potential health benefits: involvement of gut microbiota and their metabolic activity. **Biomolecules**. v. 12, n. 12, p. 1871, 2022.
- CHENG, H., *et al.* Interactions between gut microbiota and polyphenols: A mechanistic and metabolomics review, **Phytomedicine**, v. 119, p. 154979, 2023.
- CHI, C. *et al.* Effects of probiotics in patients with hypertension: a systematic review and meta-analysis. **Current reports of hypertension**, v.22, n.5, 2020.
- CRUZ NETO, J. P, R., *et al.* Safety evaluation of a novel potentially probiotic *limosilactobacillus fermentum* in rats. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 16, n. 1, p. 1 – 11, 2023.
- CUEVA, C. *et al.* An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 99, 2017.
- DAI, Y., *et al.* Unraveling mechanistic insights into the role of microbiome in neurogenic hypertension: A comprehensive review. **Pathology, research and practice**, v. 249, n. 154740, 2023.

- DE ARAÚJO, H. F. G. Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 2, p. 349-359, 2022.
- DE BRITO, J. L. A., *et al.* New Insights on the Use of Dietary Polyphenols or Probiotics for the Management of Arterial Hypertension. **Frontiers in physiology**, v. 7, n. 448, p. 1 – 8, 2016.
- DE OLIVEIRA Y. *et al.* Oral administration of *Lactobacillus fermentum* after weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in the offspring of rats exposed to maternal dyslipidemia. **Food & function**, v. 11, n. 6, p. 5581–5594, 2020.
- DEEPIKA e MAURYA, P. K. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 27, n. 8, p. 2498, 2022.
- DE SOUZA, E. L., *et al.* Potential interactions between phenolic compounds and probiotics to mutually reinforce their health-promoting properties and food functionalities – A review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645-1659, 2019.
- DO NASCIMENTO, L., C., P., *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* prevents gut-kidney oxidative damage and the rise in blood pressure in male rat offspring exposed to a maternal high-fat diet. **Journal of developmental origins of health and disease**, v.13, n. 6, p.719–726, 2022.
- DONG JY., *et al.* Effect of probiotic fermented milk on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **British Journal of Nutrition**. v.110, n.7, p. 1188–1194, 2013.
- DUDA-CHODAK A., *et al.* Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. **European Journal of Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 325–341, 2015.
- ETXEBERRIA, U. *et al.* Metabolic faecal fingerprinting of trans-resveratrol and quercetin following a high-fat sucrose dietary model using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. **Food & function**, v. 6, n. 8, p. 2758-2767, 2015.
- FREIRE M. O. L., *et al.* Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 9, p. 2202, 2021.
- FREIRE, M. O. L., *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* Strains with Claimed Probiotic Properties Exert Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties and Prevent Cardiometabolic Disorder in Female Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.15, n. 3, p. 601-613, 2023.
- GARCIA, E. F. *et al.* Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2016.
- GATAREK, P.; KALUZNA-CZAPLINSKA, J. Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health. **EXCLI Journal**, v. 11, n. 20, p. 301-319, 2021.
- GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980- 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**. v. 390, n. 10100, p. 1151-1210, 2017.
- GERSHON, M. D., & MARGOLIS, K. G. The gut, its microbiome, and the brain: connections and communications. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 18, p. e143768, 2021.
- GIBSON, G. R., *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics, **Nutrition Research Reviews**. v. 17, n. 2, p. 259-375, 2004.
- GIBSON, G. R., *et al.* Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

- GOMEZ-ARANGO, L. F., *et al.* Increased systolic and diastolic blood pressure is associated with altered gut microbiota composition and butyrate production in early pregnancy. **Hypertension**. v. 68, n. 4, p. 974–81, 2016.
- GOU, W., *et al.* Nutri-microbiome epidemiology, an emerging field to disentangle the interplay between nutrition and microbiome for human health. **Protein & cell**, v. 14, n. 11, p. 787–806, 2023.
- GRYLLS, A.; SEIDLER, K.; NEIL, J. Link between microbiota and hypertension: Focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, n. 111334, p. 1 – 16, 2021.
- GUYTON AC, COLEMAN TG, GRANGER HJ. Circulation: general regulation. **Annual Review of Physiology**. v.34, p. 13–46, 1972.
- HASHEMZAEI, M., *et al.* Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. **Oncology reports**, p. 38, n. 2, p. 819–828, 2017.
- HILL, C. *et al.* Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and proper use of the term probiotic, **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.
- HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**. v. 8, n. 2, p.172-184, 2017.
- HUSSAIN, S. A., *et al.* Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) supplemented with probiotic lassi prevents *Shigella* infiltration of the epithelial barrier into systemic blood flow in mouse model. **Microbial Pathogenesis**. v. 102, p. 143–147, 2017.
- JORDAN, J.; KURSCHAT, C.; REUTER, H. Arterial hypertension. **DeutschesÄrzteblatt international**. v. 20, n. 115, p. 557-568, 2018.
- JUNG, C. M., *et al.* Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 297, n. 2, p. 266–273, 2009.
- KAWABATA K., YOSHIOKA Y., TERAJO J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. **Molecules**. v. 24, n. 2, p. 370, 2019.
- KHALESI S., *et al.* Effect of probiotics on blood pressure, a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Hypertension**. v. 64, n. 4, p. 897, 2014.
- KIM, S., *et al.* Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 132, n. 6, p. 701–718, 2018.
- KIRICHENKO, T. V., *et al.* A new view on atherogenesis: the role of the microbiome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 8, n. 586189, p. 1 – 10, 2020.
- KLEPINOWSKI, T., *et al.* Gut microbiome in intracranial aneurysm growth, subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm: a systematic review with a narrative synthesis. **Frontal neuroscience**, v. 17, n. 1247151, p. 1 – 12, 2023.
- LESJAK, M. *et al.*Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivati/ves. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. 1, p. 68–75, 2018.
- LI, J., RAIZADA, M. K., RICHARDS, E. M. Gut-brain-bone marrow axis in hypertension. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 30, n. 2, p.159–165, 2021.
- MADHUR, M.S., *et al.*Hypertension: are inflammation and immunity the key to solving this epidemic?.**Circulation Research**. v. 128, n. 7, p.908-933, 2021.

- MAIUOLO, J. *et al.* The Contribution of Intestinal Microbiota and Endothelial Dysfunction in the Development of Arterial Hypertension in Animal Models and in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 7, p. 3698, 2022.
- MARKOWIAK, P. & ŚLIŻEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.
- MARQUES F. Z., *et al.* High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. **Circulation**. v. 135, n. 10, p. 964–77, 2017.
- MARTIN-GALLAUSIAUX, C. *et al.* SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 80, n. 1, p. 37-49, 2021.
- MCFARLAND, L.V. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. **BMJ Open**. v. 4, n. 8, p. e005047, 2014.
- MCMASTER, W. G., *et al.* Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 1022–1033, 2015.
- MILLS, K. T.; STEFANESCU, A.; HE, J. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n.4, p. 223-237, 2020.
- MUZAFFAR, R. *et al.* Hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for coronary heart disease. comparison with conventional risk factors. **Brazilian Journal of Biology**, v. 6, n. 83, p. 249104, 2021.
- NGUYEN, T. T., *et al.* Synbiotics: a New Route of Self-production and Applications to Human and Animal Health. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 14, n. 5, p. 980–993, 2022.
- OLIVEIRA, G. L. V., *et al.* Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. **Immunology**. v. 152, n. 1, p. 1–12, 2017.
- OLSEN, M. H., *et al.* A call to action and a life course strategy to address the global burden of raised blood pressure on current and future generations: The Lancet Commission on hypertension. **Lancet**. v. 388, n. 10060, p. 2665-2712, 2016.
- OMS. Acompanhamento da declaração política da reunião de alto nível da assembléia geral sobre prevenção e controle de doenças não transmissíveis. Organização mundial da saúde; genebra, suíça: 2013. [(acessado em 29 de maio de 2022)]. **Plano de ação global para prevenção e controle de doenças não transmissíveis 2013–2020**; p. 68-69.
- OPARIL, S. *et al.* Hypertension. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 22, n. 4, p. 18014, 2018.
- PETERSEN, K. S., & KRIS-ETHERTON, P. M. Diet Quality Assessment and the Relationship between Diet Quality and Cardiovascular Disease Risk. **Nutrients**. v. 13, n. 12, p. 4305, 2021.
- PETERSEN, K. S., & KRIS-ETHERTON, P. M. Diet Quality Assessment and the Relationship between Diet Quality and Cardiovascular Disease Risk. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4305, 2021.
- PLAMADA, D., & VODNAR, D. C. Polyphenols—Gut microbiota interrelationship: A transition to a new generation of prebiotics. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 137, 2021.
- RIBEIRO G., *et al.*, Diet and microbiota – gut – brain axis: a primer for clinical nutrition. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v.25, n. 6, p. 443-450, 2022.
- RICHARDS, E. M., *et al.* Gut Microbiome and Neuroinflammation in Hypertension. **Circulation research**, v. 130, n. 3, p. 401–417, 2022.
- ROBLES-VERA I., *et al.* Antihypertensive effects of probiotics. **Current Hypertension Reports**. v. 19, n. 4, p. 26, 2017.

RODRIGUES, D. *et al.* In vitro fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. **LWT - Food Science and Technology**, v.73, n. 9, p. 131-139, 2016.

SAMPAIO, K. B. *et al.* Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. **Food Chemistry**, v. 342, n. 128264, p. 128-264, 2021

SANTISTEBAN, M. M., *et al.* Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the gut. **Circulation research**, v. 120, n. 2, p. 312–323, 2017.

SANTOS, M. A., *et al.*, Resveratrol has its antioxidant and anti-inflammatory protective mechanisms decreased in aging. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 107, p. 104895, 2023.

SHABBIR, U. *et al.* Curcumin, Quercetin, Catechins and Metabolic Diseases: The Role of Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 206, 2021.

SHI, T., *et al.* . Quercetin improves gut dysbiosis in antibiotic-treated mice. **Food & function**, v. 11, n. 9, p. 8003–8013, 2020.

DA SILVA J. Y. P. *et al.*,. Revealing the Potential Impacts of Nutraceuticals Formulated with Freeze-Dried Jaboticaba Peel and *Limosilactobacillus fermentum* Strains Candidates for Probiotic Use on Human Intestinal Microbiota. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 1, p.1 – 17, 2023.

SINGH, K. A, *et al.* Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency. **Nutrients**. v. 11, n. 9, p. 2216, 2019.

SOLEYMANI S, *et al.* Implications of grape extract and its nanoformulated bioactive agent resveratrol against skin disorders. **Archives of dermatological research**,v. 311, n. 8, p. 577-588, 2019.

STEVENS, J. F.; MAIER, C. S. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 3, p. 425–444, 2016.

TAN, J. K., *et al.* Metabolite-sensing G protein–Coupled Receptors—Facilitators of diet-related immune regulation. **Annual Review of Immunology**. v. 35, n. 1, p. 371–402, 2017.

TANG, W.H. W., *et al.* The gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to development of Renal Failure and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. **Circulation Research**. v. 116, p. 448–455, 2014.

TING, Y. *et al.* Antiobesity efficacy of quercetin-rich supplement on diet-induced obese rats: effects on body composition, serum lipid profile, and gene expression. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 1, p. 70-80, 2018.

TOUSOULIS, D. Arterial hypertension: New concepts in diagnosis and treatment?.**Hellenic journal of cardiology**, v. 61, n. 3, p. 145-147, 2020.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. *et al.* Phenolic compounds: their journey after intake. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 189–197, 2014.

WANG D., *et al.* Investigation of piceide metabolites in rats by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science**. v. 879, p. 69–74, 2011.

WANG, M., *et al.* Microglia-Mediated Neuroinflammation: A Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. **Journal of inflammation research**. v. 15, p. 3083–3094, 2022.

YADAV, M. K., *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: safe options for next generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 106, n. 2, p. 505-521, 2022.

YAMMINE, A. *et al.* Polyphenols of the mediterranean diet and their metabolites in the prevention of colorectal cancer. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3483, 2021.

YANG Z., *et al.* Gut microbiota and hypertension: association, mechanisms and treatment, **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 45, n. 1, p. 2195135, 2023.

YANG, Z. H., *et al.* Traditional Chinese medicine against COVID-19: role of the gut microbiota. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 149, n. 112787, p 1 – 37, 2022.

ZHAO, L. *et al.* A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. **Food &Function**, v. 8, n. 12, p. 4644– 4656, 2017.

ZHOU, X., LIU, J., LI, J. F. Effects and mechanism of quercetin on blood pressure, intestinal flora and ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. **Natural Product Research and Development**. v. 32, n. 9, p. 1449–1455, 2020.

ZHU J., *et al.* Intestinal macrobiotics and their metabolic pathways modulate cardiovascular diseases. **Front Microbiology**. v. 14, n. 1272479, p. 1 – 12, 2023.

ZUBCEVIC, J., *et al.* Impaired Autonomic Nervous System-Microbiome Circuit in Hypertension. **Circulation research**, v. 125, n. 1, p. 104–116, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre avaliação da funcionalidade de nutracêuticos (Compostos por frutooliosacarídeos, *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetina e resveratrol) utilizando inóculo fecal humano e está sendo desenvolvida pela pesquisadora Karoliny Brito Sampaio, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob a orientação do Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Departamento de Nutrição (UFPB).

Os objetivos do estudo são avaliar o potencial prebiótico das formulações utilizando sistemas de fermentação *in vitro*, com o inóculo fecal humano. A realização desta pesquisa trará informações científicas atualmente escassas no campo de estudo acerca da relação do potencial prebiótico de um novo produto nutracêutico. A pesquisa apresenta abordagem inovadora considerando os aspectos tecnológicos, econômicos e de saudabilidade, por apresentar uma alternativa de coadministração de diferentes componentes bioativos em um único produto. A execução deste projeto de tese apresenta o potencial de gerar informações que subsidiem a elaboração de novas formulações a base destes componentes em nutracêuticos e como ingredientes funcionais.

Em virtude que este TCLE se encontra em mais de uma página, as demais serão rubricadas pelo pesquisador e sujeito da pesquisa.

Solicitamos a sua colaboração para realizar a doação de material fecal, o qual será colhido no referido dia e armazenado em frasco anaeróbico cedido pelos envolvidos na pesquisa, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e, eventualmente, publicação em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde, uma vez que os resultados obtidos servirão de base para definir os efeitos prebióticos dos nutracêuticos.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pela Pesquisadora. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura da testemunha

Contato do Pesquisador (a) Responsável: Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora: Karoliny Brito Sampaio.

Endereço (Setor de Pesquisa): Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I - Cidade Universitária – CEP 58051-900 – João Pessoa – PB Telefone: (83) 3216-7807/ (83) 99692-3028

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus I - Cidade Universitária - 1º Andar – CEP 58051-900 – João Pessoa/PB (83) 3216-7791 – E-mail: **comitedeetica@ccs.ufpb.br**

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

]

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE)

Prezado(a) **PARTICIPANTE DE PESQUISA,**

Os pesquisadores **Ludmilla Christine Silva de Sales** e o orientador **Drº José Luiz de Brito Alves** convidam você a participar da pesquisa intitulada “**Projeto MOMITHA: Modulação da Microbiota Intestinal no Tratamento da Hipertensão Arterial: Um estudo randomizado e controlado por placebo**”. Para tanto você precisará assinar o TCLE que visa assegurar a proteção, a autonomia e o respeito aos participantes de pesquisa em todas as suas dimensões: física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e/ou espiritual e que a estruturação, o conteúdo e forma de obtenção dele observamos diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos preconizadas pela **Resolução 466/2012 e/ou Resolução 510/2016**, do Conselho Nacional de Saúde e Ministério da Saúde.

Sua decisão de participar neste estudo deve ser voluntária e que ela não resultará em nenhum custo ou ônus financeiro para você (ou para o seu empregador, quando for este o caso) e que você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo ou punição caso decida não participar desta pesquisa. Todos os dados e informações fornecidos por você serão tratados de forma anônima/sigilosa, não permitindo a sua identificação.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar os efeitos da modulação intestinal com probióticos e fibras alimentares sobre a microbiota intestinal, parâmetros antropométricos, cardiovasculares, metabólicos e inflamatórios em pacientes com hipertensão arterial. **Objetivos específicos:** Avaliar antes e após intervenção: Níveis de pressão arterial e o monitoramento de 24h da pressão arterial; Frequência cardíaca e a variabilidade da frequência cardíaca; Indicadores antropométricos, de composição corporal e de consumo alimentar; Supercrescimento bacteriano de intestino delgado; Ecologia microbiana intestinal; Ácidos graxos de cadeia curta; Parâmetros bioquímicos e biomarcadores de inflamação.

O estudo é um ensaio clínico randomizado e controlado por placebo. Será aplicado um questionário a fim de registrar informações sobre idade, atividade física, história clínica, tabagismo, doenças pregressas, tempo de doença, e uso de medicamentos; além disso, será aplicado o recordatório de 24h para avaliação da ingestão alimentar e variáveis antropométricas e de composição corporal serão mensurados.

Amostras de fezes serão coletadas. Será coletado sangue, em jejum, para análises bioquímicas e de parâmetros inflamatórios. Pressão arterial e eletrocardiograma (ECG) serão registrados e o teste de hidrogênio expirado será aplicado para avaliação de supercrescimento bacteriano do intestino delgado. Após o teste de hidrogênio exalado, os pacientes serão instrumentalizados para monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA) por 24 horas.

Os participantes serão randomizados em grupo placebo e grupo simbiótico. O grupo simbiótico receberá sachês de probióticos e fibras: Psyllium e aveia (15g). O grupo placebo receberá sachês idênticos com povidexose (2 g/dia) e não receberão os sachês contendo as fibras alimentares. Todos os participantes serão instruídos a consumir os sachês no período da manhã, lanches e/ou ceia. Os sachês serão entregues pelo pesquisador responsável após a terceira visita e não haverá ônus para os participantes da pesquisa.

Em ambos os grupos, pacientes serão acompanhados por nutricionistas da equipe, os quais realizarão atividades de orientação nutricional utilizando as recomendações da dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), a qual incentiva o consumo de frutas, legumes, cereais integrais, nozes, sementes, leite com baixo teor de gorduras, carnes magras, além de limitar o sal, bebidas com cafeína e alcoólicas. Após 4 meses de intervenção, todos os participantes retornarão e serão reavaliados quanto ao consumo alimentar, variáveis antropométricas e de composição corporal, pressão arterial e eletrocardiograma, coleta de sangue em jejum, testes respiratórios de glicose e coleta de fezes para avaliação da microbiota intestinal e mensuração dos ácidos graxos de cadeia curta.

Riscos ao(à) Participante da Pesquisa

Informamos que essa pesquisa poderá acarretar em alguns riscos. Na coleta, ou o paciente pode sentir alguns desconfortos associados com a coleta de sangue como: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Para que o paciente não tenha incômodo, a retirada do material será realizada com muito cuidado, por profissional preparado (enfermeira), para evitar sofrimento desnecessário.

A intervenção com probióticos, fibras ou placebo possivelmente pode resultar em alguma alergia, intolerância ou desconfortos gastrointestinais. Pode-se experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados. A ingestão dos sachês será monitorada pela pesquisadora e assim se houver algum desconforto, será solicitado a suspensão imediatamente e acompanhamento médico, caso necessário, sem custo para o participante.

Benefícios ao(à) Participante da Pesquisa

A intervenção com probióticos e fibras nesse estudo busca modular a microbiota intestinal durante o tratamento da hipertensão arterial, e a participação na pesquisa irá contribuir na busca de novos conhecimentos acerca desta temática. O participante receberá um relatório contendo informações sobre seu estado clínico e orientações nutricionais.

Declaramos que durante a condução do protocolo de pesquisa supracitado, amostras de sangue serão armazenadas no laboratório LACONCHA do Centro de Biotecnologia na UFPA. O armazenamento dessas amostras obedecerá aos requisitos estabelecidos na Resolução Nº 441 de 12 de maio de 2011 do Conselho Nacional de Saúde, para o armazenamento de material biológico humano. Todas as amostras biológicas e os resultados provenientes delas serão usados apenas para as finalidades descritas no protocolo de pesquisa e no termo de consentimento livre e esclarecido. Após a conclusão do estudo, qualquer material remanescente será destruído de acordo com as boas práticas clínicas.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, **sem penalidade ou ônus e sempre juízo ao seu vínculo com a UFPB**. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Informação de Contato do Responsável Principal

Ludmilla Christine Silva de Sales- Doutoranda em Ciências Fisiológicas / UFPB E-mail: nutriludmillasales@gmail.com

Telefonesdecontato:(83)98603-8298

Endereço e Informações de Contato do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/CCS/UFPB

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Centro de Ciências da Saúde (1º andar) da Universidade Federal da Paraíba Campus I –
Cidade Universitária / CEP: 58.051-900 – João Pessoa-PB

Telefone:+55(83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Horário de Funcionamento: de 07h às 12h e de 13h às
16h.Homepage:<http://www.ccs.ufpb.br/eticaccsufpb>

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Ao colocar sua assinatura ao final deste documento, **VOCÊ**, de forma voluntária, na qualidade de **PARTICIPANTE** da pesquisa, expressa o seu **consentimento livre e esclarecido** para participar deste estudo e declara que está suficientemente informado(a), de maneira clara e objetiva, acerca da presente investigação. E receberá uma cópia deste **Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)**, assinada pelo(a) Pesquisador(a) Responsável.

João Pessoa-PB, _____ de _____ de _____.

Assinatura, por extenso, do(a) Participante da Pesquisa

Assinatura, por extenso, do(a) Pesquisador(a) Responsável pela pesquisa

APÊNDICE C – ARTIGO

Investigating the potential effects of a nutraceutical formulated with *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and resveratrol on the fecal microbiota of healthy and hypertensive subjects

Abstract

Strategies targeting the gut microbiota represent a promising strategy to improve the gut microbiome in hypertensive conditions. This study evaluated the effects of a potential nutraceutical product composed of three strains of *Limosilactobacillus* (*L. fermentum*, quercetin, and resveratrol) on the intestinal microbiome of healthy and hypertensive subjects. The nutraceutical product consisting of strains of *L. fermentum* 139, 263 and 296, fructooligosaccharides (200 mg), quercetin (160 mg), and resveratrol (150 mg) (LfQR) was added to the *in vitro* fecal fermentation for 48h. Fecal samples of healthy and hypertensive subjects were allocated in four groups: i) control healthy (CTL); ii) control healthy with the addition of LfQR (CTL+LfQR); iii) hypertensive (HTN); and iv) hypertensive with the addition of LfQR (HTN+LfQR). The diversity and composition of the fecal microbiota and the production of microbial metabolites were evaluated. CTL and HTN groups exhibited a distinct gut microbiota composition as shown by the β -diversity assessment. The addition of the potential nutraceutical modulated β -diversity similarly in CTL and HTN, suggesting a similar gut microbiome composition after nutraceutical addition. The addition of nutraceutical product increased the abundance of *Enterobacteriaceae* in the CTL group and *Lachnospiraceae* in the HTN group. The nutraceutical media showed higher levels of sugars (maltose, fructose, and glucose), lactic acid, ethanol, succinic acid, and acetic acid compared to the CTL and HTN media. Although the results are heterogeneous between healthy and hypertensive fermentation media, it has been demonstrated that the nutraceutical formulation can modulate the intestinal microbiota and its metabolic activity.

Keywords: Bioactive compounds; intestinal microbiota; hypertension; prebiotic, probiotic.

33 1. Introduction

34 Arterial hypertension is a public health problem with a complex and multifactorial
35 etiology (de Brito Alves and Costa-Silva 2018), and evidence suggests a bidirectional
36 relationship between the onset and maintenance of hypertension and gut dysbiosis (Yang,
37 Wang et al. 2023). Intestinal dysbiosis is characterized as a qualitative and/or quantitative
38 change in the composition of the intestinal microbiota, both at a taxonomic and functional
39 level. Intestinal dysbiosis can be triggered by endogenous and exogenous factors, such as
40 the host physiology and immune system, health-damaging dietary patterns, recurrent
41 antibiotic use, and/or pre-existing comorbidities (Kim, Goel et al. 2018).

42 High blood pressure can affect the structure and function of the gut and increase gut
43 permeability, favoring or exacerbating intestinal dysbiosis, which facilitates the translocation
44 of microbial metabolites into the bloodstream and activates inflammatory processes via
45 sympathetic hyperactivity, promoting the elevation and maintenance of arterial
46 hypertension (Santisteban, Qi et al. 2017). Adjuvant therapeutic strategies related to
47 intestinal microbiota modulation have been proposed for preventing and treating arterial
48 hypertension (de Brito Alves, de Sousa et al. 2016), and dietary management and
49 supplementation with prebiotics, probiotics, or synbiotics are often indicated (Cavalcanti
50 Neto, Aquino et al. 2018).

51 Prebiotics are dietary compounds that are selectively used by the intestinal
52 microbiota to provide health benefits to the host (Gibson, Hutkins et al. 2017). Although the
53 prebiotic function is mainly exerted by substances derived from indigestible carbohydrates,
54 bioactive molecules present in plant foods, such as phenolic compounds, also exert a
55 prebiotic function (Kumar Singh, Cabral et al. 2019, Yadav, Kumari et al. 2022). Phenolic
56 compounds, including quercetin and resveratrol, have well-established functional
57 properties, including anti-inflammatory, antioxidant, and cardioprotective effects (Xia,
58 Daiber et al. 2017, Ting, Chang et al. 2018, Costa, de Souza et al. 2022). In addition, phenolic

compounds have been shown effective in modulating the intestinal microbiota, stimulating the growth of beneficial bacteria and reducing pathogenic bacteria (Chen, Pan et al. 2022).

Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host when administered in adequate doses. These microorganisms are responsible for modulating the intestinal microbiota and exerting anti-inflammatory and protective effects on the intestinal epithelium (de Luna Freire, do Nascimento et al. 2021, Maia, de Souza et al. 2024), with evidence that the interactions between phenolic compounds and probiotics may enhance their beneficial effects on host health (Duda-Chodak, Tarko et al. 2015, de Souza, de Albuquerque et al. 2019).

Considering this mutually beneficial interactions, the ingestion of both probiotics and phenolic compounds in potentially symbiotic products could be an option to improve and extend their functionalities targeting the intestinal microbiota (Plamada and Vodnar 2021). Recently, a nutraceutical formulated with probiotic strains of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, and 296, quercetin and resveratrol (LfQR) with proven antioxidant properties has been developed (Sampaio, do Nascimento et al. 2021), but its effect on the intestinal microbiota of healthy and hypertensive adults has not yet been elucidated.

This study aimed to evaluate the effects of this novel nutraceutical on the composition, diversity, and metabolic activity of the fecal microbiota of healthy and hypertensive adults during an *in vitro* fecal fermentation. The hypothesis tested is that a nutraceutical consisting of a mix of *L. fermentum* strains, quercetin, and resveratrol would induce beneficial changes in the composition, diversity, and metabolic activity of the fecal microbiota of healthy and hypertensive adults.

2. Methods

2.1 Microorganisms

L. fermentum 139, 263, and 296 strains were used for the study. To obtain the cell suspensions, the strains were maintained individually under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) and cultured in MRS broth (Mann, Rogosa and Sharpe, HiMedia, Mumbai, India) at 37° C for 20-24 h until reaching the stationary growth phase. The cell cultures were harvested (4,000 x g, 10 min, 4° C), washed with sterile saline (0.85 g/100 mL NaCl), and resuspended in sterile distilled water. The cell suspensions had viable cell counts of approximately 10 log CFU/mL when plated on MRS agar (HiMedia), and a mix of suspended cells in a 1:1:1 ratio was obtained.

2.2 Preparation of nutraceutical with *L. fermentum*, quercetin, and resveratrol

For the formulation of the nutraceutical, the mix suspension of *L. fermentum* strains 139, 263, and 296, sterile distilled water (1 mL), and fructooligosaccharides (200 mg) [FOS, 20% w/v], a well-known cryoprotectant for bacterial cells, was used. The mixture was frozen at -80° C for 24 h and lyophilized (temperature -55±2° C, vacuum pressure <138 µHG, lyophilization rate 1 mm/h) for approximately 40 h using a bench-top lyophilizer (Liotop®, Model L-101, São Carlos, SP, Brazil).

Quercetin (160 mg; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and resveratrol (150 mg; Sigma-Aldrich) were added to the powder. The mixture was homogenized and transferred to sterile amber bottles with screw caps, placed in desiccant with silica gel, and stored at 4 ± 0.5° C with controlled relative humidity until use (Brito Sampaio, Luiz de Brito Alves et al. 2022). The nutraceutical was rehydrated with sterile distilled water (10 mL, 25 ± 0.5° C) for 15 min and subjected to a simulated gastrointestinal digestion.

2.3 Simulated gastrointestinal digestion of the nutraceutical

Continuous chemical processes and mechanical stirring were carried out in an incubator (37 ± 0.5 °C) to simulate the conditions and peristalsis movements of the mouth, stomach, duodenum, and ileum. For the stomach condition (exposure time 120 min, 37 ± 0.5 °C, 130 rpm), the pH was adjusted to 2.0 with 1 M HCl, and a solution of pepsin (25 mg/mL) in 0.1 M HCl was added (0.05 mL/mL). For the duodenum conditions (exposure time 30 min, 37 ± 0.5 °C, 45 rpm), the pH was increased to 5 with NaHCO_3 0.1 M, and a solution with 12 g of bovine bile salt/L was added. For ileal conditions (exposure time 60 min, 37 ± 0.5 °C, 45 rpm), the pH was increased to 6.5 with 0.1 M NaHCO_3 for 60 min (Brito Sampaio, Luiz de Brito Alves et al. 2022). Enzymes, bile salts, and reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.4 Preparation of human fecal inoculum

The experimental procedures were approved by an Institutional Committee for Ethics in Human Research (Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil) under protocol 5.626.691 and 5.049.860, and followed the guidelines of the National Health Council (Resolution 466, 2012).

Fecal samples were donated by six healthy adults (control group - CTL, consisting of three men and three women over 18 years old) and six hypertensive adults (hypertension group - HTN, consisting of three men and three women over 18 years old). The samples were collected from healthy donors who reported no medical conditions and from hypertensive donors diagnosed with the disease for at least one year with no other comorbidity. The selected healthy and hypertensive donors had not taken any prebiotic or probiotic supplements in the six months before stool collection, had not taken any

130 antibiotics or other medications that affect the gut microbiota composition, except for
131 antihypertensive medications commonly used in hypertensive individuals (Table 1).

132 Fecal samples were deposited in sterile flasks using an anaerobic generator system
133 (AnaeroGen). For each deposited sample, 20 g of fresh feces were homogenized, mixed
134 in equal proportions (1:1:1:1:1:1:1, w/w), diluted (1:10, w/v) in sterile phosphate-
135 buffered saline (PBS; 0.1 mol/L; pH 7.4), homogenized by stirring (2 min, 200 rpm), and
136 filtered with a sterile triple-layer gauze to remove larger particles.

137

138 **2.5 *In vitro* fecal fermentation of the nutraceutical**

139 The fecal fermentation system was designed according to an early study (Brito
140 Sampaio, Luiz de Brito Alves et al. 2022) and following the separation of the healthy group
141 from the hypertensive group, comprising four different groups: Medium composed of
142 50% (v/v) of healthy subjects fecal inoculum and 50% (v/v) of sterile fermentation
143 medium (control group – CTL); medium with nutraceutical composed of 40% (v/v) of
144 healthy subjects fecal inoculum, 40% of (v/v) sterile fermentation medium, and 20% of
145 pre-digested nutraceutical (w/v) (CTL + LfQR group); medium composed of 50% (v/v) of
146 hypertensive subjects fecal inoculum and 50% (v/v) of sterile fermentation medium (HTN
147 group); and medium with nutraceutical composed of 40% (v/v) of hypertensive subjects
148 fecal inoculum, 40% (v/v) of sterile fermentation medium, and 20% of predigested
149 nutraceutical (HTN + LfQR group).

150 The sterile fermentation medium used in the fecal fermentation was formulated
151 with 4.5g NaCl, 4.5g KCl, 1.5g NaHCO₃, 0.69g MgSO₄, 0.8g L-cysteine, 0.5g KH₂PO₄, 0.5g
152 K₂HPO₄, 0.4g bile salt, 0.08g CaCl₂, 0.005g FeSO₄, 1 mL of Tween 80, and 4 mL of resazurin
153 solution (0.025%, v/v) as an anaerobic indicator, diluted in 1 L of distilled water and
154 sterilized in autoclave (121° C, 1 atm, 15 min). Aliquots were collected after 48 h of fecal

fermentation, centrifuged (4000 x g, 10 min, 4° C), and the supernatants were used to measure the contents of organic acids and the pellets were used for metagenomic analysis.

2.6 Identification and quantification of bacterial groups during fecal fermentation

A 0.5 mL aliquot of each fecal fermentation medium was collected for identification and quantification of bacterial groups using 16S RNA sequencing technique. The bacterial diversity was assessed via high-throughput sequencing of 16S rRNA V3/V4 region employing 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primers. The 16S rRNA libraries were sequenced with the MiSeq sequencing system (Illumina Inc., USA) using the standard Illumina primers provided in the kit 300 cycles (paired-end sequencing with 200 bp). Libraries were prepared and sequenced by Neopropecta (Florianópolis, SC, Brazil).

After sequencing, quality filters were applied to the fastq files, including the removal of truncated and low-quality reads (Phred score <20) using the Trimmomatic tool (Quast, Pruesse et al. 2013). Sense and antisense paired reads were merged into contigs, and the singletons and chimeras were removed. The sequence files were imported into QIIME2 version 2021 and processed for removal of noisy, chimeric sequences and singletons, joining of paired end reads, dereplication, and obtainment of amplicon sequence variants (ASVs) using the DADA2 plugin.

A phylogenetic tree was constructed using QIIME2's fragment-insertion SEPP plugin with the Silva reference database (Quast, Pruesse et al. 2013), and the taxonomic composition was assessed with QIIME2's q2-feature-classifier plugin. QIIME2 resulting files were imported into R using the the phyloseq package. Taxa bar plots and diversity analyses were performed using the microViz R package. Alpha diversity was calculated as

the Shannon index and beta diversity metric consisted of Bray-Curtis/Unweighted UniFrac distance. Differential analysis was conducted with the R package microbiomeMarker using the ANOVA-Like Differential Expression tool (ALDEx2) and linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe).

2.7 Evaluation of the metabolic activity of the intestinal microbiota

After fermentation, 1.5 mL aliquots of each medium were used for the determination of the contents of sugars, lactic acid, and short-chain fatty acids with high-performance liquid chromatography technique (HPLC) using a chromatograph model 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, St. Clara, CA, USA) with a quaternary solvent pump (model G1311C), thermostatic column (model G1316A), automatic degasser and autosampler (model G1329B), coupled to a diode array detector (DAD) (model G1315D) and a refractive index detector (RID) (model G1362A). The following analytical conditions were used: an Agilent Hi-Plex H column (7.7 300 mm, 8 μ), mobile phase 0.004 mol/L H₂SO₄ in ultrapure water, and flow rate 0.7 mL/min. Data were processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Agilent, St. Clara, CA). The peaks of the HPLC samples obtained in the analysis were identified by comparing their retention times with those of the sugar and organic acid patterns (Sigma Aldrich, St. Louis, MA, USA), and the average areas of the peaks were used for quantification.

2.8 Statistical analysis

All tests were performed in triplicate in three different occasions and the results were expressed as average $\pm$ standard deviation. The normality of the data was evaluated by the Shapiro-Wilk test and the one-way ANOVA test, followed by the Bonferroni post-test was used. A p -value<0.05 was considered statistically significant. The statistical

205 analysis was performed using the software STATA program (v15.0, College Station, TX,
206 USA).

207

3. Results

The general characteristics of healthy and hypertensive donors of the fecal samples are shown in **Table 1**. The β -diversity of fecal microbiota differed between CTL and HTN groups, as shown by the Bray-Curtis dissimilarity ratio and weighted UniFrac distances (**Figure 1a**), indicating a distinct gut microbiota composition. The nutraceutical formulated with *L. fermentum*, quercetin, and resveratrol modulated the β -diversity similarly in CTL and HTN groups after fecal fermentation (**Figure 1a**).

The α -diversity did not differ between CTL and HTN groups (**Supplementary Figure 1**). According to ALDEX2, a method of differential abundance analysis, CTL group had a reduced relative abundance of Firmicutes and an increased relative abundance of Fusobacteriota at the phylum level after fecal fermentation. In contrast, HTN group had an increased relative abundance of Firmicutes after fecal fermentation (**Figure 1 c**; **Supplementary Figure 2**). The nutraceutical reduced the relative abundance of the phylum Fusobacteriota and increased the relative abundance of the phylum Proteobacteria in CTL and HTN groups after fecal fermentation (**Figure 1 c**; **Supplementary figure 2**).

The nutraceutical increased the relative abundance of Enterobacteriaceae and Lachnospiraceae family in both CTL group (CTL versus CTL + LfQR) and HTN group (HTN versus HTN + LfQR) after fecal fermentation, respectively (**Figure 1 d**). The nutraceutical also increased the relative abundance of *Escherichia-Shigella* genera in both CTL and HTN group (**Figure 1 e**).

LDA analysis showed an enrichment of Lachnospiraceae and Lachnospirales in HTN + LfQR group (HTN versus HTN + LfQR), as well as of Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, and *Escherichia-Shigella* in CTL + LfQR group (CTL versus CTL + LfQR) (**Figure 1b**).

233 The contents of maltose, glucose, fructose, lactic acid, acetic acid, and succinic acid
234 were higher in HTN+LfQR and CTL+LfQR groups compared to CTL and HTN after fecal
235 fermentation ($p \leq 0.05$), while the contents of rhamnose were lower in HTN and CTL groups
236 compared to HTN + LfQR and CTL + LfQR groups ($p \leq 0.05$). In addition, HTN + LfQR group
237 had lower content of propionic acid compared to HTN group after fecal fermentation ($p \leq$
238 0.05) (**Table 2**).

239

240 4. Discussion

241 The results of this study showed that a novel nutraceutical formulated with *L.*
242 *fermentum* strains, quercetin, and resveratrol promoted changes in the composition,
243 diversity, and microbial metabolic activity during an *in vitro* fermentation with fecal
244 inoculum from healthy and hypertensive subjects. It has been demonstrated that *L.*
245 *fermentum* strains used to formulate the tested nutraceutical have probiotic aptitudes
246 linked to the modulation of the gut microbiota and improvements in metabolic
247 parameters, besides exerting an antibacterial effect (de Luna Freire, Cruz Neto et al.
248 2024). In addition, quercetin and resveratrol can modulate gut microbiota and reduce
249 cardiometabolic diseases (Zhao, Zhang et al. 2017).

250 Alpha diversity of fecal microbiota after 48 h of fermentation in CTL + LfQR and
251 HTN + LfQR groups was lower than in CTL and HTN groups, while the fecal media with
252 nutraceutical had a similar beta diversity after fecal fermentation. Although the
253 nutraceutical did not increase the richness of taxons in HTN, an increase in the relative
254 abundance of the Lachnospiraceae family and Lachnospirales order was observed in the
255 HTN group. A previous study showed that the administration of *L. fermentum* 139, 263,
256 and 296 strains for four weeks reduced alpha diversity and increased the relative
257 abundance of Lachnospiraceae family in the gut microbiota of rats fed a high-fat diet (de
258 Araujo Henriques Ferreira, Magnani et al. 2022), suggesting a possible pattern of gut
259 microbiota modulation linked to these *L. fermentum* strains.

260 The increased diversity and richness of bacterial species present in the gut
261 microbiota have been proposed as an important marker of gut health, as it is associated
262 with a condition of gut stability and better performance of different microbial functions,
263 benefiting the local and systemic host health (Fassarella, Blaak et al. 2021). The
264 enrichment of Lachnospiraceae in the fecal microbiota of HTN + LfQR group highlights the

265 need for further studies to understand if the significant reduction in the diversity of
266 different bacterial groups to the detriment of the increase of this family is or not a
267 beneficial mechanism promoted by *L. fermentum* strains used to formulate the tested
268 nutraceutical.

269 The family Lachnospiraceae colonizes the intestinal lumen from birth and its
270 abundance and richness increase during the host life, depending on its diet and lifestyle.
271 Among the 80 genera of Lachnospiraceae family, some are major producers of short-chain
272 fatty acids (SCFAs) (ex., *Blautia* and *Roseburia*), while others, such as *Blautia* and
273 *Ruminococcus*, in high abundance are associated with various intra- and extraintestinal
274 diseases, such as Chron's disease, obesity, and glucose metabolism disorders, giving to
275 this family controversial effects on host health (Vacca, Celano et al. 2020).

276 The presence of the nutraceutical in fermentation media containing fecal
277 inoculum from healthy and hypertensive individuals increased the relative abundance of
278 the Proteobacteria phylum and one of its bacterial families, Enterobacteriaceae.
279 Proteobacteria are classified as Gram-negative and lipopolysaccharide (LPS)-producing
280 bacteria, with evidenced of its association with increased risk of gut microbiota dysbiosis
281 (Shin, Whon et al. 2015). Although Enterobacteriaceae are present in the human intestinal
282 tract and are a normal part of the gut microbiota, a cohort showed that an increased
283 relative abundance of Enterobacteriaceae was directly associated with increased blood
284 pressure and inflammatory markers in adults with obesity and cardiovascular disease (de
285 la Cuesta-Zuluaga, Huus et al. 2023). However, whether the increase in Proteobacteria
286 and Enterobacteriaceae abundance promoted by tested nutraceutical could promote
287 health damage remains to be investigated.

288 At the genus level, *Escherichia-Shigella*, which also belongs to the phylum
289 Proteobacteria and the family Enterobacteriaceae, was the abundant in CTL + LfQR and

290 HTN + LfQR group after fecal fermentation. These genera could play an important role in
 291 hypertensive condition (Naik, Ramphall et al. 2022). *Escherichia-Shigella* can degrade
 292 choline to trimethylamine-N-oxide (TMAO), a metabolite associated with increased
 293 cardiovascular risk due to inducing inflammatory response, oxidative stress, and vascular
 294 endothelial damage (Hayashi, Yamashita et al. 2018, Witkowski, Weeks et al. 2020).

295 In contrast, HTN + LfQR showed a higher relative abundance of some beneficial
 296 bacterial groups after fecal fermentation, such as the Lachnospiraceae family, while
 297 CTL+LfQR group had an increase in the relative abundance of the genus *Feacalibacterium*.
 298 The bacterial species forming this family and genus are fermentative microorganisms
 299 capable of producing SCFAs due to dietary fiber fermentation (Morrison and Preston
 300 2016). Results from a cohort showed a negative correlation between Lachnospiraceae
 301 fecal abundance and blood pressure, and a positive correlation between Lachnospiraceae
 302 fecal abundance and intestinal butyrate contents (Lan, Ning et al. 2022).

303 Furthermore, an increase in Lachnospiraceae abundance was observed in the gut
 304 microbiota of adults after adopting a healthy dietary pattern, and this increase was
 305 positively associated with a reduction in systolic and diastolic blood pressure (Ahrens,
 306 Culpepper et al. 2021). An early study showed that the treatment with quercetin and
 307 resveratrol in rats fed a high-fat diet decreased the abundance of Lachnospiraceae family
 308 (Zhao, Zhang et al. 2017). It suggests that *L. fermentum* strains may have a beneficial
 309 effect on the abundance of Lachnospiraceae when combined with quercetin and
 310 resveratrol.

311 Increased abundance of *Feacalibacterium* in the gut microbiota is associated with
 312 improved renal function and decreased inflammation in the kidneys of rats with chronic
 313 kidney disease (Li, Xu et al. 2022). Although the impacts of the intestinal abundance of
 314 *Feacalibacterium* on blood pressure regulation are not clarified, the increased abundance

315 of this bacterial genus may be beneficial for preventing hypertensive pathology due to
316 the close relationship between renal function and blood pressure control.

317 The increase in the relative abundance of genus *Bifidobacterium*, as detected in
318 the CTL+LfQR group after fecal fermentation, has been associated with antihypertensive
319 effects. Administration of *Bifidobacterium breve* reduced blood pressure in
320 spontaneously hypertensive rats (Robles-Vera, de la Visitacion et al. 2020). Similarly,
321 supplementation of obese adult mice with *Bifidobacterium longum* promoted increased
322 expression of angiotensin-converting enzyme 2, supporting its potential beneficial effects
323 on blood pressure control (Machado, Oliveira et al. 2021).

324 When evaluating the effect of the nutraceutical on the metabolic activity during
325 fecal microbiota, it was observed that the CTL+ LfQR and HTN + LfQR groups had higher
326 contents of sugars, such as fructose, glucose, and maltose, than CTL and HTN,
327 respectively. In addition, there was an increase in the contents of lactic acid in CTL+ LfQR
328 and HTN + LfQR groups, which could be linked to the capability of *L. fermentum* to produce
329 lactifrom carbohydrate metabolism (Hossain 2022). Lactic acid-producing bacteria
330 stimulate enterocyte proliferation and maintain intestinal epithelial integrity (Okada,
331 Fukuda et al. 2013), besides suppressing inflammation by modulating the gut microbiota
332 (Sun, Xu et al. 2021).

333 When the production of SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) was examined,
334 CTL+LfQR and HTN+LfQR groups had higher contents of acetic acid rather than of
335 propionic and butyric acid, especially when compared to CTL and HTN groups. Even
336 though butyric acid was not quantified in some fermentation media, the ratio of butiril-
337 CoA: acetate-CoA-transferase is an important pathway for butyric acid biosynthesis.
338 Therefore, although butyric acid was not detected, the presence of the tested
339 nutraceutical could favor an increase in the concentration of its precursor (Ohira, Tsutsui

et al. 2017, Vargas, Andres et al. 2017). In general, SCFAs are microbial metabolites associated with host health benefits, mainly through epigenetic modulation of anti-inflammatory pathways and the immune system (Ohira, Tsutsui et al. 2017, Vargas, Andres et al. 2017).

The results of this study demonstrate that the nutraceutical formulated with *L. fermentum* 139, 263 and 296, quercetin, and resveratrol exerted varied effects on parameters linked to the composition and metabolic activity of the fecal microbiota of healthy and hypertensive subjects. This variability in the microbial composition may have been influenced by a study limitation related to the lack of follow-up of the dietary pattern and other lifestyle factors affecting the fecal sample donors.

5. Conclusion

The nutraceutical formulated with a mix of *L. fermentum* 139, 263 and 296, quercetin, and resveratrol was effective in modifying the composition and parameters linked to the microbial metabolic activity of the fecal microbiota of health and hypertensive subjects during an *in vitro* fermentation. However, due to the variability of the results, it is too early to determine whether the effects on host health are beneficial or not, and further studies are needed to clarify these outcomes.

Acknowledgments

Paraíba State Research Foundation (FAPESQ). The authors thank Professor Marco Vinolo for his collaboration.

Statements and Declarations

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ahrens, A. P., T. Culpepper, B. Saldivar, S. Anton, S. Stoll, E. M. Handberg, K. Xu, C. Pepine, E. W. Triplett and M. Aggarwal (2021). "A Six-Day, Lifestyle-Based Immersion Program Mitigates Cardiovascular Risk Factors and Induces Shifts in Gut Microbiota, Specifically Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Faecalibacterium prausnitzii: A Pilot Study." *Nutrients* **13**(10).
- Brito Sampaio, K., J. Luiz de Brito Alves, Y. Mangueira do Nascimento, J. Fachine Tavares, M. Sobral da Silva, D. Dos Santos Nascimento, M. Dos Santos Lima, N. Priscila de Araujo Rodrigues, E. Fernandes Garcia and E. Leite de Souza (2022). "Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation." *Food Res Int* **161**: 111800.
- Cavalcanti Neto, M. P., J. S. Aquino, L. F. Romao da Silva, R. de Oliveira Silva, K. S. L. Guimaraes, Y. de Oliveira, E. L. de Souza, M. Magnani, H. Vidal and J. L. de Brito Alves (2018). "Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease?" *Pharmacol Res* **130**: 152-163.
- Chen, X., S. Pan, F. Li, X. Xu and H. Xing (2022). "Plant-Derived Bioactive Compounds and Potential Health Benefits: Involvement of the Gut Microbiota and Its Metabolic Activity." *Biomolecules* **12**(12).
- Costa, P., E. L. de Souza, D. C. Lacerda, J. P. R. Cruz Neto, L. C. S. Sales, C. C. Silva Luis, P. B. Pontes, M. P. Cavalcanti Neto and J. L. de Brito Alves (2022). "Evidence for Quercetin as a Dietary Supplement for the Treatment of Cardio-Metabolic Diseases in Pregnancy: A Review in Rodent Models." *Foods* **11**(18).
- de Araujo Henriques Ferreira, G., M. Magnani, L. Cabral, L. R. Brandao, M. F. Noronha, J. de Campos Cruz, E. L. de Souza and J. L. de Brito Alves (2022). "Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet." *Probiotics Antimicrob Proteins* **14**(2): 349-359.
- de Brito Alves, J. L. and J. H. Costa-Silva (2018). "Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **45**(5): 422-429.
- de Brito Alves, J. L., V. P. de Sousa, M. P. Cavalcanti Neto, M. Magnani, V. A. Braga, J. H. da Costa-Silva, C. G. Leandro, H. Vidal and L. Pirola (2016). "New Insights on the Use of Dietary Polyphenols or Probiotics for the Management of Arterial Hypertension." *Front Physiol* **7**: 448.
- de la Cuesta-Zuluaga, J., K. E. Huus, N. D. Youngblut, J. S. Escobar and R. E. Ley (2023). "Obesity is the main driver of altered gut microbiome functions in the metabolically unhealthy." *Gut Microbes* **15**(2): 2246634.
- de Luna Freire, M. O., J. P. R. Cruz Neto, D. E. de Albuquerque Lemos, T. M. R. de Albuquerque, E. F. Garcia, E. L. de Souza and J. L. de Brito Alves (2024). "*Limosilactobacillus fermentum* Strains as Novel Probiotic Candidates to Promote Host Health Benefits and Development of Biotherapeutics: A Comprehensive Review." *Probiotics Antimicrob Proteins*.
- de Luna Freire, M. O., L. C. P. do Nascimento, K. A. R. de Oliveira, A. M. de Oliveira, T. H. Napoleao, M. D. S. Lima, C. J. Lagranha, E. L. de Souza and J. L. de Brito Alves (2021). "Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet." *Foods* **10**(9).
- de Souza, E. L., T. M. R. de Albuquerque, A. S. Dos Santos, N. M. L. Massa and J. L. de Brito Alves (2019). "Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities - A review." *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**(10): 1645-1659.
- Duda-Chodak, A., T. Tarko, P. Satora and P. Sroka (2015). "Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review." *Eur J Nutr* **54**(3): 325-341.
- Fassarella, M., E. E. Blaak, J. Penders, A. Nauta, H. Smidt and E. G. Zoetendal (2021). "Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health." *Gut* **70**(3): 595-605.
- Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, C.

- Stanton, K. S. Swanson, P. D. Cani, K. Verbeke and G. Reid (2017). "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**(8): 491-502.
- Hayashi, T., T. Yamashita, H. Watanabe, K. Kami, N. Yoshida, T. Tabata, T. Emoto, N. Sasaki, T. Mizoguchi, Y. Irino, R. Toh, M. Shinohara, Y. Okada, W. Ogawa, T. Yamada and K. I. Hirata (2018). "Gut Microbiome and Plasma Microbiome-Related Metabolites in Patients With Decompensated and Compensated Heart Failure." *Circ J* **83**(1): 182-192.
- Hossain, T. J. (2022). "Functional genomics of the lactic acid bacterium *Limosilactobacillus fermentum* LAB-1: metabolic, probiotic and biotechnological perspectives." *Heliyon* **8**(11): e11412.
- Kim, S., R. Goel, A. Kumar, Y. Qi, G. Lobaton, K. Hosaka, M. Mohammed, E. M. Handberg, E. M. Richards, C. J. Pepine and M. K. Raizada (2018). "Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure." *Clin Sci (Lond)* **132**(6): 701-718.
- Kumar Singh, A., C. Cabral, R. Kumar, R. Ganguly, H. Kumar Rana, A. Gupta, M. Rosaria Lauro, C. Carbone, F. Reis and A. K. Pandey (2019). "Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency." *Nutrients* **11**(9).
- Lan, Y., K. Ning, Y. Ma, J. Zhao, C. Ci, X. Yang, F. An, Z. Zhang, Y. An and M. Cheng (2022). "High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Potential Medium between Depletion of Lachnospiraceae Genera and Hypertension under a High-Calorie Diet." *Microbiol Spectr* **10**(6): e0234922.
- Li, H. B., M. L. Xu, X. D. Xu, Y. Y. Tang, H. L. Jiang, L. Li, W. J. Xia, N. Cui, J. Bai, Z. M. Dai, B. Han, Y. Li, B. Peng, Y. Y. Dong, S. Aryal, I. Manandhar, M. A. Eladawi, R. Shukla, Y. M. Kang, B. Joe and T. Yang (2022). "Faecalibacterium prausnitzii Attenuates CKD via Butyrate-Renal GPR43 Axis." *Circ Res* **131**(9): e120-e134.
- Machado, A. S., J. R. Oliveira, D. F. Lelis, A. M. B. de Paula, A. L. S. Guimaraes, J. M. O. Andrade, I. V. Brandi and S. H. S. Santos (2021). "Oral Probiotic *Bifidobacterium Longum* Supplementation Improves Metabolic Parameters and Alters the Expression of the Renin-Angiotensin System in Obese Mice Liver." *Biol Res Nurs* **23**(1): 100-108.
- Maia, L. A., J. R. de Souza, L. F. R. da Silva, M. Magnani, E. L. de Souza and J. L. de Brito Alves (2024). "Effects of Probiotics on Inflammatory Biomarkers and Its Associations With Cardiac Autonomic Function in Women With Arterial Hypertension: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial." *Probiotics Antimicrob Proteins*.
- Morrison, D. J. and T. Preston (2016). "Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism." *Gut Microbes* **7**(3): 189-200.
- Naik, S. S., S. Ramphall, S. Rijal, V. Prakash, H. Ekladios, J. Mulayamkuzhiyil Saju, N. Mandal, N. I. Kham, R. Shahid and S. Venugopal (2022). "Association of Gut Microbial Dysbiosis and Hypertension: A Systematic Review." *Cureus* **14**(10): e29927.
- Ohira, H., W. Tsutsui and Y. Fujioka (2017). "Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis?" *J Atheroscler Thromb* **24**(7): 660-672.
- Okada, T., S. Fukuda, K. Hase, S. Nishiumi, Y. Izumi, M. Yoshida, T. Hagiwara, R. Kawashima, M. Yamazaki, T. Oshio, T. Otsubo, K. Inagaki-Ohara, K. Kakimoto, K. Higuchi, Y. I. Kawamura, H. Ohno and T. Dohi (2013). "Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice." *Nat Commun* **4**: 1654.
- Plamada, D. and D. C. Vodnar (2021). "Polyphenols-Gut Microbiota Interrelationship: A Transition to a New Generation of Prebiotics." *Nutrients* **14**(1).
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F. O. Glockner (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue): D590-596.
- Robles-Vera, I., N. de la Visitacion, M. Toral, M. Sanchez, M. Romero, M. Gomez-Guzman, T. Yang, J. L. Izquierdo-Garcia, E. Guerra-Hernandez, J. Ruiz-Cabello, M. K. Raizada, F. Perez-Vizcaino, R. Jimenez and J. Duarte (2020). "Probiotic *Bifidobacterium breve* prevents DOCA-salt hypertension." *FASEB J* **34**(10): 13626-13640.
- Sampaio, K. B., Y. M. do Nascimento, J. F. Tavares, M. T. Cavalcanti, J. L. de Brito Alves, E. F. Garcia and E. L. de Souza (2021). "Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol." *Food Chem* **342**: 128264.
- Santisteban, M. M., Y. Qi, J. Zubcevic, S. Kim, T. Yang, V. Shenoy, C. T. Cole-Jeffrey, G. O.

480 Lobaton, D. C. Stewart, A. Rubiano, C. S. Simmons, F. Garcia-Pereira, R. D. Johnson, C. J. Pepine
 481 and M. K. Raizada (2017). "Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut." Circ
 482 Res **120**(2): 312-323.
 483 Shin, N. R., T. W. Whon and J. W. Bae (2015). "Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis
 484 in gut microbiota." Trends Biotechnol **33**(9): 496-503.
 485 Sun, S., X. Xu, L. Liang, X. Wang, X. Bai, L. Zhu, Q. He, H. Liang, X. Xin, L. Wang, C. Lou, X.
 486 Cao, X. Chen, B. Li, B. Wang and J. Zhao (2021). "Lactic Acid-Producing Probiotic
 487 *Saccharomyces cerevisiae* Attenuates Ulcerative Colitis via Suppressing Macrophage Pyroptosis
 488 and Modulating Gut Microbiota." Front Immunol **12**: 777665.
 489 Ting, Y., W. T. Chang, D. K. Shiao, P. H. Chou, M. F. Wu and C. L. Hsu (2018). "Antiobesity
 490 Efficacy of Quercetin-Rich Supplement on Diet-Induced Obese Rats: Effects on Body
 491 Composition, Serum Lipid Profile, and Gene Expression." J Agric Food Chem **66**(1): 70-80.
 492 Vacca, M., G. Celano, F. M. Calabrese, P. Portincasa, M. Gobbetti and M. De Angelis (2020).
 493 "The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae." Microorganisms **8**(4).
 494 Vargas, J. E., S. Andres, T. J. Snelling, L. Lopez-Ferreras, D. R. Yanez-Ruiz, C. Garcia-Estrada
 495 and S. Lopez (2017). "Effect of Sunflower and Marine Oils on Ruminal Microbiota, In vitro
 496 Fermentation and Digesta Fatty Acid Profile." Front Microbiol **8**: 1124.
 497 Witkowski, M., T. L. Weeks and S. L. Hazen (2020). "Gut Microbiota and Cardiovascular
 498 Disease." Circ Res **127**(4): 553-570.
 499 Xia, N., A. Daiber, U. Forstermann and H. Li (2017). "Antioxidant effects of resveratrol in the
 500 cardiovascular system." Br J Pharmacol **174**(12): 1633-1646.
 501 Yadav, M. K., I. Kumari, B. Singh, K. K. Sharma and S. K. Tiwari (2022). "Probiotics, prebiotics
 502 and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics." Appl Microbiol Biotechnol **106**(2):
 503 505-521.
 504 Yang, Z., Q. Wang, Y. Liu, L. Wang, Z. Ge, Z. Li, S. Feng and C. Wu (2023). "Gut microbiota and
 505 hypertension: association, mechanisms and treatment." Clin Exp Hypertens **45**(1): 2195135.
 506 Zhao, L., Q. Zhang, W. Ma, F. Tian, H. Shen and M. Zhou (2017). "A combination of quercetin
 507 and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota." Food
 508 Funct **8**(12): 4644-4656.
 509

Table 1. General characteristics of healthy and hypertensive donors of fecal samples.

	Don or	Sex	Age (years)	Antibiotic use (last six months)	Probiotic/ prebiotic / symbiotic use (last six months)	Number of Antihypertensi ve (daily use)
Healthy donors	1	Male	37	No	No	-
	2	Male	29	No	No	-
	3	Male	28	No	No	-
	4	Female	28	No	No	-
	5	Female	42	No	No	-
	6	Female	25	No	No	-
Hypertensive donors	7	Male	37	No	No	1
	8	Male	36	No	No	2
	9	Male	42	No	No	2
	10	Female	54	No	No	1
	11	Female	53	No	No	1
	12	Female	47	No	No	1

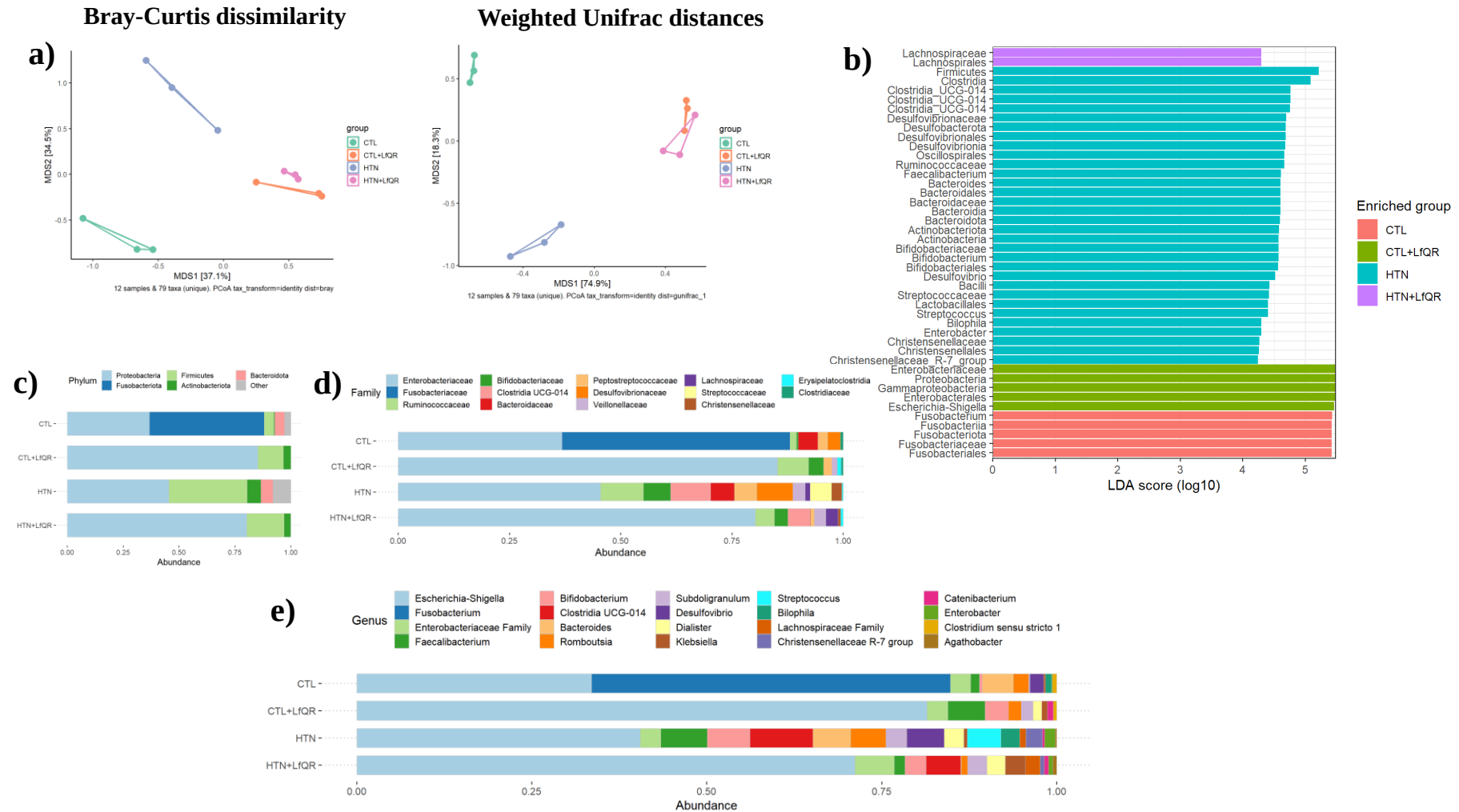
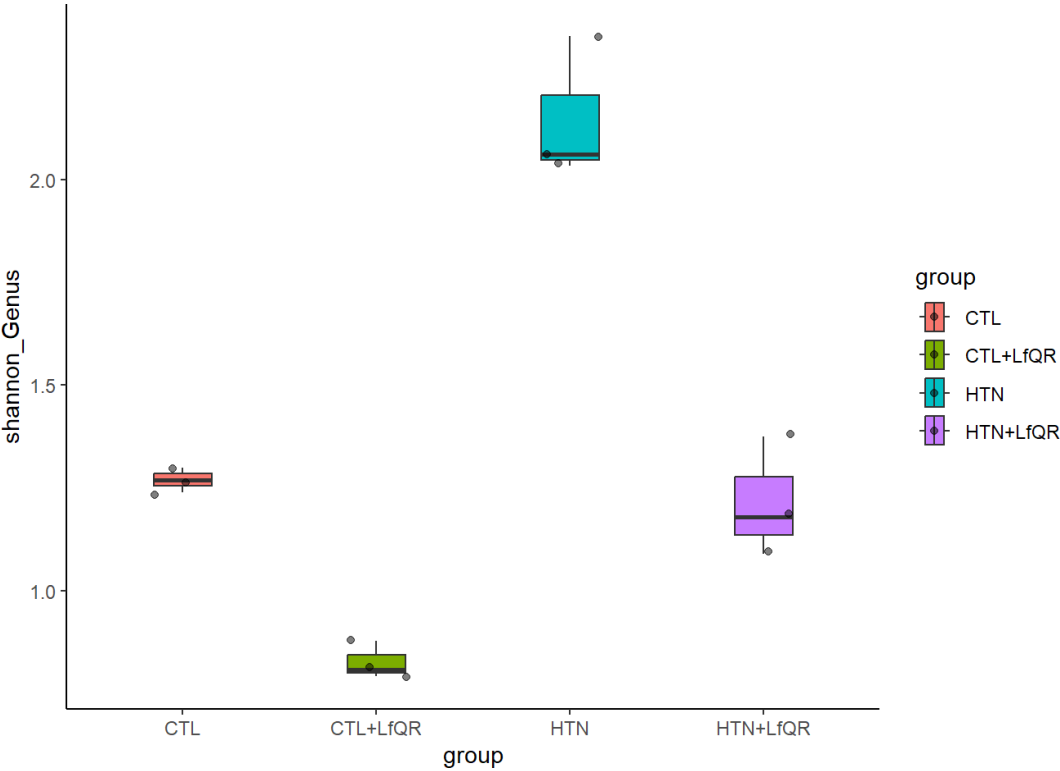


Figure 1. Beta diversity of fecal microbiota after 48 h of *in vitro* fecal fermentation

Table 2. Contents of sugar and organic acids in medium with and without a nutraceutical formulated with *L. fermentum*, quercetin, and resveratrol after 48 h of *in vitro* fecal fermentation with healthy and hypertensive individuals.

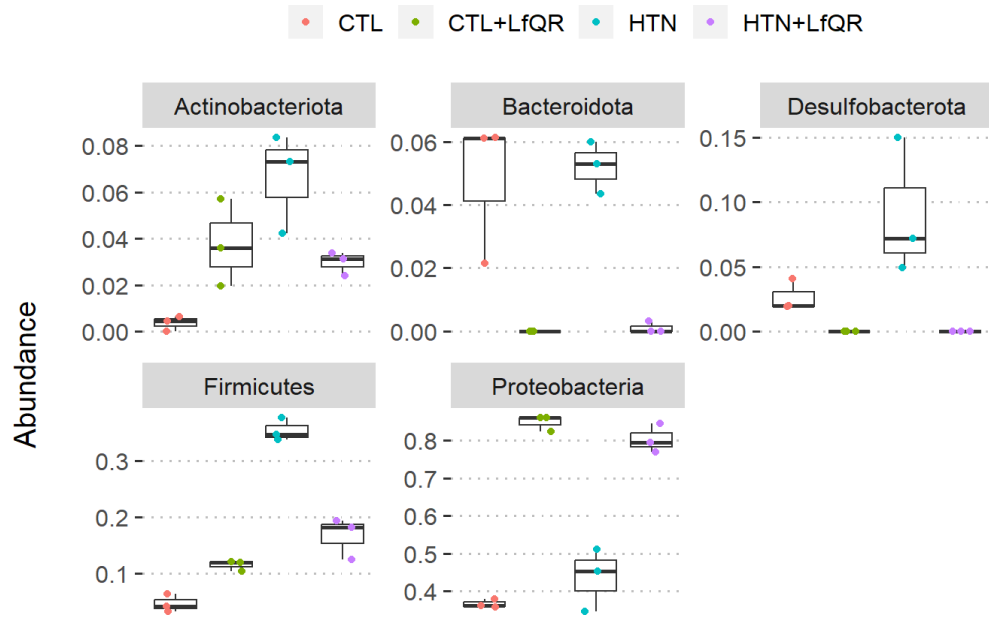
Paremeters	CTL	CTL+ LfQR	HTN	HTN+LfQ R	<i>F value</i>	<i>p value</i>
Sugars						
Maltose	0.00± 0.00	0.93± 0.00 # ^a	0.00± 0.00	0.66± 0.03*	2228.2 5	0.00
Glucose	0.00± 0.00	0.75± 0.00 # ^a	0.00± 0.00	0.54± 0.05*	722.52	0.00
Fructose	0.04± 0.03	3.41± 0.02 # ^a	0.00± 0.00	3.65± 0.03*	17264. 83	0.00
Rhaminose	0.11± 0.05	0.00± 0.00 #	0.09± 0.02	0.00± 0.00*	11.32	0.00
Organic acids						
Lactic acid	0.00± 0.00	1.70± 0.01 # ^a	0.00± 0.00	1.75± 0.02*	35593. 64	0.00
Acetic acid	0.32±0.01 *	0.65± 0.00 # ^a	0.37± 0.01	0.67± 0.00*	2371.9 3	0.00
Propionic acid	0.05±0.09 *	0.04± 0.08	0.45± 0.05	0.21± 0.00*	26.49	0.00
Butyric acid	0.00± 0.00	0.00± 0.00	0.06± 0,10	0.00± 0.00	1.00	0.44

HTN: Hypertensive fermentation medium. HTN-LfQR: Hypertensive fermentation medium with LfQR. CTL: Control fermentation medium; CTL+ LfQR: control fermentation medium with LfQR. LfQR: Nutraceutical formulated with *L. fermentum*, quercetin, and resveratrol. Data are expressed as average ± standard deviation. *p-value* based on the One-way ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. *vs HTN, #vs CTL, ^avs HTN+LfQR.



Supplementary Figure 1. Microbial alpha diversity in media with and without a nutraceutical formulated with *L. fermentum*, quercetin, and resveratrol after 48 h of *in vitro* fecal fermentation with healthy and hypertensive individuals.

HTN: Hypertensive fermentation medium. HTN-LfQR: Hypertensive fermentation medium with LfQR. CTL: Control fermentation medium; CTL+ LfQR: Control fermentation medium with LfQR. LfQR: Nutraceutical formulated with *L. fermentum*, qucetin and resveratrol.

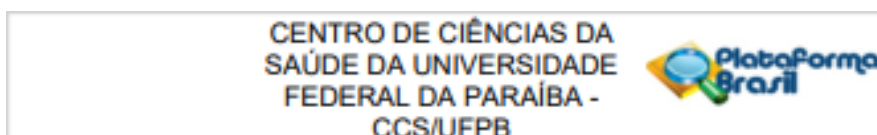


Supplementary Figure 2. Relative abundance of microbial phyla in vitro colonic fermentation.

HTN: Hypertension fermentation medium. HTN-LfQR: Hypertensive fermentation medium with LfQR. CTL: Control fermentation medium; CTL+ LfQR: control fermentation medium with LfQR. LfQR: Nutraceutical formula with *L. fermentum*, quercetin and resveratrol

ANEXOS

**ANEXO A - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO PROJETO
PROJETO MOMITHA: MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO
TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: UM ESTUDO RANDOMIZADO E
CONTROLADO POR PLACEBO**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PROJETO MOMITHA: MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: UM ESTUDO RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO.

Pesquisador: LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58764322.8.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.626.691

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um protocolo de pesquisa egresso do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Avaliar os efeitos da modulação intestinal com probióticos e fibras alimentares sobre a microbiota intestinal, parâmetros antropométricos, cardiovasculares, metabólicos e inflamatórios em pacientes com hipertensão arterial.

Objetivo Secundário:

Avaliar antes e após intervenção: Níveis de pressão arterial e o monitoramento de 24h da pressão arterial; Frequência cardíaca a variabilidade da frequência cardíaca; Indicadores antropométricos, de composição corporal e de consumo alimentar; Supercrescimento bacteriano de intestino delgado; Ecologia microbiana intestinal;

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar
Cidade: Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Protocolo: S.626.691

Ácidos graxos de cadeia curta;

Parâmetros bioquímicos e biomarcadores de inflamação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Informamos que essa pesquisa poderá acarretar em alguns riscos. Na coleta, ou o paciente pode sentir alguns desconfortos associados com a coleta de sangue como: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Para que o paciente não tenha incômodo, a retirada do material será realizada com muito cuidado, por profissional preparado (enfermeira), para evitar sofrimento desnecessário. A intervenção com probióticos, fibras ou placebo possivelmente pode resultar em alguma alergia, intolerância ou desconfortos gastrointestinais. Pode-se experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados. A ingestão dos sachês será monitorada pela pesquisadora e assim se houver algum desconforto, será solicitado a suspensão imediatamente e acompanhamento médico, caso necessário, sem custeio para o participante.

Benefícios:

A intervenção com probióticos e fibras nesse estudo busca modular a microbiota intestinal durante o tratamento da hipertensão arterial, e a participação na pesquisa irá contribuir na busca de novos conhecimentos acerca desta temática. O participante receberá um relatório contendo informações sobre seu estado clínico e orientações nutricionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo será desenhado como um randomizado e controlado por placebo. Na primeira visita, um questionário será aplicado a fim de registrar informações sobre idade, atividade física, história clínica, tabagismo, doenças pregressas, tempo de doença, e uso de medicamentos; além disso, será aplicado o recordatório de 24h para avaliação da ingestão alimentar e variáveis antropométricas e de composição corporal serão mensurados;

finalmente serão ofertados aos pacientes tubo para coleta de fezes com a devidas orientações de coleta e armazenamento. Na segunda visita antes da intervenção, amostras de fezes serão coletadas e armazenadas em freezer -80°C. Nesta segunda visita será coletado sangue, em jejum, para análises bioquímicas e de parâmetros inflamatórios. Por último, na terceira visita antes da intervenção, pressão arterial e eletrocardiograma (ECG) serão registrados e o teste hidrogênio

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedetica@cca.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.626.691

expirado será aplicado para avaliação de supercrescimento bacteriano de intestino delgado. Após o teste de hidrogênio exalado, os pacientes serão instrumentalizados para monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA) por 24 horas. Um total de 120 pacientes com hipertensão arterial serão randomizados em 2 grupos: simbiótico (n = 60) e placebo (n = 60). No grupo simbiótico, os participantes serão orientados a consumir diariamente 2 sachês do probiótico SIMFORT, um mix de probióticos contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium bifidum*, o qual terá a empresa Vitafor como parceira do projeto. Além dos probióticos, o grupo simbiótico receberá, semanalmente, sachês hermeticamente fechados contendo 15g de fibras alimentares. Em decorrência de estudos prévios demonstrarem que Psyllium e Aveia são fibras com potencial de reduzir os níveis de pressão arterial, as mesmas serão escolhidas para condução do ensaio clínico. O grupo placebo receberá sachês idênticos com polidextrose (2 g/dia) e não receberão os sachês contendo as fibras alimentares. Todos os participantes serão instruídos a consumir os sachês no período da manhã, lanches e/ou ceia. Para os probióticos, será orientado dissolver o conteúdo em um copo (200 mL). Para o psyllium será orientado ingerir a fibra com frutas ou sucos de fruta. Os participantes também serão instruídos a não alterar sua atividade física de rotina, ingerir 2L de água ao dia, bem como para relatar quaisquer efeitos colaterais e continuar com as medicações antihipertensivas. Em ambos os grupos, pacientes serão acompanhados por nutricionistas da equipe, os quais realizarão atividades de orientação nutricional utilizando as recomendações da dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), a qual incentiva o consumo de frutas, legumes, cereais integrais, nozes, sementes, leite com baixo teor de gorduras, carnes magras, além de limitar o sal,

bebidas com cafeína e alcoólicas. Após 4 meses de intervenção, todos os participantes retomarão a serem reavaliados quanto ao consumo alimentar, variáveis antropométricas e de composição corporal, pressão arterial e eletrocardiograma, coleta de sangue em jejum, testes respiratórios de glicose e coleta de fezes para avaliação da microbiota intestinal e mensuração dos ácidos graxos de cadeia curta. Ao final desse período, pacientes serão orientados a permanecer com os hábitos alimentares construídos durante os 4 meses, mas sem acompanhamento da equipe de nutricionistas. Após de 4 meses sem acompanhamento dos nutricionistas, os pacientes serão convidados a retornarem para uma última avaliação do consumo alimentar, variáveis antropométricas e de composição corporal, pressão arterial e eletrocardiograma, coleta de sangue em jejum, testes respiratórios e coleta de fezes. Esse período sem acompanhamento será relevante para conhecer se as mudanças promovidas pela modulação da microbiota intestinal são duradouras.

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.626.691

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória forma anexados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do cumprimento das exigências éticas e legais de pesquisas com seres humanos, bem como da lista de pendências descritas no parecer anterior, somos de PARECER APROVADO à execução desse protocolo de pesquisa, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1913535.pdf	13/08/2022 13:41:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Tese Ludmilla corrigido.pdf	13/08/2022 13:40:58	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito
Outros	Certidaoccs.pdf	13/08/2022 11:23:55	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito
Outros	Parecer_projeto_de_Pesquisa_Jos_Luiz.pdf	13/08/2022 11:22:58	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito
Outros	PARECER_PPGMCF.pdf	13/08/2022 11:15:59	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito
Outros	2022_ANUENCIA.pdf	13/08/2022 11:14:26	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderoasto.pdf	16/05/2022 16:19:10	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.626.891

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMOMITHA.pdf	30/03/2022 13:39:07	LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES	Aceito
---	-----------------	------------------------	---	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 06 de Setembro de 2022

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**ANEXO B - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO PROJETO
AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS
COMPOSTAS POR *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM*, QUERCETINA E/OU
RESVERATROL**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da funcionalidade de formulações nutracêuticas compostas por *Limosilactobacillus fermentum*, quercetina e/ou resveratrol

Pesquisador: KAROLINY BRITO SAMPAIO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50815921.0.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.049.860

Apresentação do Projeto:

A capacidade dos probióticos de conferir benefícios à saúde intestinal dos hospedeiros vem despertando interesse a comunidade científica por décadas. A ingestão combinada de probióticos e polifenóis vem sendo citada como uma estratégia para melhorar mutuamente suas propriedades promotoras de saúde. Estudos apontam a quercetina (QUE) e o resveratrol (RES) como agentes benéficos para a proteção de cepas probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, como na modulação da microbiota intestinal. Hipótese: Formulações nutracêuticas compostas por quercetina, resveratrol e cepas potencialmente probióticas de *L. fermentum* exercem sua funcionalidade a partir da manutenção da viabilidade das células bacterianas e da estabilidade dos compostos, além de promover modulação da microbiota intestinal humana em sistemas de fermentação colônica in vitro. Coleta das amostras fecais. As amostras fecais frescas serão doadas por quatro voluntários adultos saudáveis entre professores, técnicos e estudantes da UFPB, sendo dois homens e duas mulheres, entre 19 e 38 anos. Como critérios de inclusão, os doadores seguem uma dieta onívora, sem precedentes de doença no intestino grosso, sem o uso de alimentos probióticos ou prebióticos concentrados, além de não ter feito uso de antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta (GUERGOLETT et al., 2016). Um kit para coleta será disponibilizado para cada doador, contendo frascos coletores esterilizados, luvas, prato e espátula descartável, além de álcool 70%, sendo

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.049.860

instruídos quanto ao manuseio asséptico das amostras. Critério de Inclusão: Seguir uma dieta onívora, sem antecedentes de doença no intestino grosso, sem o uso de alimentos probióticos ou prebióticos concentrados, além de não ter feito uso de antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta.

Critério de Exclusão: Ter patologias no intestino grosso, e estar em uso de probióticos, prebióticos concentrados, antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a funcionalidade de formulações nutracêuticas compostas da cepa potencialmente probiótica *L. fermentum* 296, fruto-oligossacarídeos, quercetina e/ou resveratrol. **Objetivo Secundário:** Produzir formulações nutracêuticas compostas de *L. fermentum* 296, fruto-oligossacarídeos, quercetina e/ou resveratrol; Avaliar de funções

fisiológicas da cepa *L. fermentum* 296 nas formulações nutracêuticas, assim como a concentração dos compostos fenólicos e atividade antioxidante, durante exposição a condições gastrointestinais simuladas in vitro; Avaliar os efeitos das formulações nutracêuticas elaboradas sobre a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal humana em sistemas de fermentação colônica in vitro; Determinar as alterações nos conteúdos de QUE e RES e geração de metabólitos derivados ao longo da fermentação colônica das formulações nutracêuticas elaboradas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Possível risco de constrangimento para o voluntário participante na doação das fezes.

Benefícios: Contribuir para a realização desta pesquisa que trará informações científicas atualmente escassas no campo de estudo acerca da relação do potencial prebiótico de um novo produto nutracêutico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo clínico, com bom desenho científico; e de relevância epidemiológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados pela pesquisadora estão em conformidade com as recomendações deste CEP.

Recomendações:

Vide conclusões ou Pendências e lista de inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.051-900
 UF: PB Município: JOAO PESSOA
 Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.049.860

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1806356.pdf	24/09/2021 12:58:06		Aceito
Outros	curriculum_vitae_Karoliny.pdf	12/08/2021 10:47:19	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Outros	CertidaoAdreferendun_Karoliny.pdf	12/08/2021 10:46:48	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Outros	instrumento_coleta_Karoliny.pdf	12/08/2021 10:45:22	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_CEP_Final.pdf	12/08/2021 10:43:23	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Orçamento	orcamento_Karoliny.pdf	12/08/2021 10:41:11	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_KAROLINY.pdf	12/08/2021 10:41:02	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_Doutorado_Karoliny.pdf	12/08/2021 10:37:32	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Cronograma	cronograma_Karoliny.pdf	12/08/2021 10:36:45	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_karoliny.pdf	12/08/2021 10:36:28	KAROLINY BRITO SAMPAIO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB - 1º Andar
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.051-900
 UF: PB Município: JOAO PESSOA
 Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br