



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

LUANA PUCCI DE LIMA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PREBIÓTICOS OU SIMBIÓTICOS NOS  
MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO DO FERRO EM  
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO,  
PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLO CEGO**

FLORIANÓPOLIS

2019

LUANA PUCCI DE LIMA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PREBIÓTICOS OU SIMBIÓTICOS NOS  
MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO DO FERRO EM  
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO,  
PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLO CEGO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal Santa Catarina em cumprimento a requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, linha de pesquisa Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional, sob a orientação do Professor Doutor Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade.

FLORIANÓPOLIS

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Luana Pucci

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PREBIÓTICOS OU SIMBIÓTICOS NOS  
MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO DO FERRO EM  
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA: ENSAIO CLÍNICO  
RANDOMIZADO, PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLO CEGO / Luana  
Pucci Lima ; orientador, Erasmo Benicio Santos de Moraes  
Trindade, 2019.

145 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Obesidade. 3. Microbiota Intestinal. 4.  
Metabolismo do Ferro. I. Trindade, Erasmo Benicio Santos  
de Moraes. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Luana Pucci de Lima

**Efeito da suplementação de prebióticos ou simbióticos nos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida: ensaio clínico randomizado, placebo-controlado e triplo cego**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.<sup>a</sup> Elisabeth Wazlawik UFSC. Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina Fernandes, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Daniela Barbieri Hauschild, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Nutrição.

---

Prof.<sup>a</sup> Patricia Faria Di Pietro, Dra.  
Coordenadora do Curso

---

Erasmu Benicio Santos de Moraes Trindade, Dr.  
Orientador e Presidente da banca

Florianópolis

2019

*Dedico este trabalho para todas as pessoas que, assim como eu, são consideradas “minorias” e lutam contra a exclusão social. Somos luta e coragem e este trabalho é um pequeno reflexo do que podemos construir quando temos uma oportunidade!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a essa força maior que nos guia e nos dá a oportunidade de evoluirmos enquanto pessoas.

Agradeço a toda minha família por nunca me deixar esquecer minhas origens e renovar minhas energias sempre, agradeço principalmente ao meu pai Adalberto, minha mãe Fátima, meu irmão Anderson, meus sobrinhos Eduarda e Guilherme e meu primo-irmão Guilherme que, mesmo sem entenderem o que tudo isso significa, me apoiaram e estiveram ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, professor Erasmo, pela orientação e parceria quanto a pesquisa, quanto à docência e muitas vezes quanto a vida, obrigada por nos mostrar onde podemos chegar e não nos deixar desistir, és um exemplo de luta.

Agradeço aos membros do grupo de pesquisa. Tanto aos que foram, aos que permanecem e aos que estão chegando: Ricardo, Michel, Ethiene, Dayanne, Victória, Camila, e em especial à Júlia Pessini, por estar tão presente nas horas mais difíceis, pela amizade e parceria que vem sendo construída e ao Arthur pelos imensos áudios de reflexões sobre a pesquisa e a vida.

Agradeço as minhas amigas de longa data Nádia, Jaqueline e Michelle, Mariana Neves, Andrea, Analu Lopes, Clorine, Andressa, Mayara, Paloma e Graziela pela paciência das minhas não respostas e ausência e por me escutarem.

Agradeço a equipe de nutrição do CEPON por me apoiarem e mostrarem empatia com tudo que vivi nesses últimos meses com vocês.

Agradeço aos companheiros de moradia Letícia, Rafael e Lilian, por entenderem entre outras coisas os meus cafés nas madrugadas.

Agradeço aos pacientes e toda equipe do HU, por colaborarem para que esta pesquisa acontecesse, espero de alguma maneira retribuí-los.

E por último, mas não menos importante, a minha bike BlueBird, (carinhosamente apelidada de azulzinha). Minha parceira de sol, chuva, calor, frio, risos, choros, viagens, concentração absoluta e *insights* durante todo esse período.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.  
O saber se aprende com mestres e livros.  
A Sabedoria, com o corriqueiro, com a vida e com os humildes.  
O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada”*

*CORA CORALINA*

## RESUMO

Introdução: O ferro é um recurso primordial para o crescimento e sobrevivência de todas as células, incluindo bactérias e células eucarióticas. Indivíduos obesos apresentam alterações na microbiota e no metabolismo do ferro e a relação entre estas condições tem sido alvo de pesquisas atualmente. Estudos em *in vitro*, em animais e humanos, principalmente crianças, mostram uma relação entre a microbiota e o status de ferro, porém essa condição ainda não foi investigada em indivíduos com obesidade mórbida. Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação de fruto-oligosacarídeo (FOS) ou simbiótico em marcadores do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida. Métodos: Ensaio clínico randomizado, placebo-controlado e triplo cego conduzido em 22 indivíduos adultos com três braços paralelos, um grupo recebeu prebiótico (FOS), um grupo recebeu simbiótico (FOS, três cepas de lactobacilos e uma cepa de bifidobactéria) e o outro grupo recebeu placebo (maltodextrina) na dosagem de 11g/dia fracionados 2 vezes ao dia por 30 dias. Marcadores bioquímicos e de ingestão alimentar do metabolismo do ferro foram avaliados antes e após a suplementação. Resultados: As análises não mostraram diferenças significativas entre os grupos após a suplementação. Nas avaliações intragrupo, houve redução significativa no marcador de reserva de ferro CLFL no grupo simbiótico ( $p= 0,018$ ) e nos marcadores funcionais do ferro HCM no grupo prebiótico ( $p= 0,019$ ) e CHCM no grupo placebo ( $p= 0,014$ ). Apenas a saturação de transferrina estava abaixo do valor de referência no momento basal nos grupos prebiótico e simbiótico. As concentrações séricas de ferro apresentaram valores próximos ao limite inferior para mulheres no momento basal e final. Em relação a ingestão dietética, os grupos placebo e simbiótico apresentaram valores de ingestão abaixo do recomendado pela EAR no momento basal. Discussão: Estudos em *in vitro*, em animais e humanos, principalmente crianças, mostram uma relação entre a microbiota e o status de ferro, porém essa condição ainda não foi investigada em indivíduos com obesidade mórbida. Em nosso estudo, marcadores do compartimento funcional e de armazenamento do ferro mostraram redução dos seus valores após suplementação. Contudo, alguns parâmetros do metabolismo do ferro são considerados proteínas de fase aguda, influenciados pela inflamação, condição presente nestes indivíduos. Portanto, para averiguar tal relação são necessários mais estudos em humanos, com maior representatividade amostral, que avaliem a microbiota intestinal e a dosagem do hormônio hepcidina, regulador negativo do metabolismo do ferro estimulado pela inflamação. Palavras-chave: Obesidade. Microbiota intestinal. Prebióticos. Simbióticos. Proteínas Reguladoras do Ferro



## ABSTRACT

**Introduction:** Iron is a prime resource for the growth and survival of all cells, including bacteria and eukaryotic cells. Obese individuals have changes in microbiota and iron metabolism and the relationship between these conditions has been the subject of research today. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the effect of fructooligosaccharide (FOS) or symbiotic supplementation on markers of iron metabolism in morbidly obese individuals. **Methods:** This randomized, placebo-controlled, triple-blind clinical trial was conducted in 22 adult subjects with three parallel arms, one group received prebiotic (FOS), one group received symbiotic (FOS, three lactobacilli strains and one bifidobacterium strain) and the other group received placebo (maltodextrin) at a dosage of 11g / day for a period of 30 days. Biochemical and food intake markers of iron metabolism were evaluated before and after supplementation. **Results:** The analyzes showed no significant differences between groups after supplementation. In the intragroup evaluations, there was a significant reduction in the CLFL iron reserve marker in the symbiotic group ( $p = 0.018$ ) and in the functional HCM iron markers in the prebiotic group ( $p = 0.019$ ) and CHCM in the placebo group ( $p = 0.014$ ). Only transferrin saturation was below baseline at prebiotic and symbiotic groups. Serum iron concentrations were close to the lower limit for women at baseline and at the end. Regarding dietary intake, the placebo and symbiotic groups had intake values below the recommended by EAR at baseline. **Discussion:** In vitro studies in animals and humans, especially children, show a relationship between microbiota and iron status, but this condition has not been investigated in morbidly obese individuals. In our study, functional compartment and iron storage markers showed a reduction in their values after supplementation. However, some parameters of iron metabolism are considered acute phase proteins, influenced by inflammation, a condition present in these individuals. Therefore, to investigate this relationship, further studies in humans, with greater sample representativeness, are needed to evaluate the intestinal microbiota and the dosage of hepcidin hormone, a negative regulator of inflammation-stimulated iron metabolism.

**Keywords:** Obesity. Intestinal microbiota. Prebiotics. Symbiotics. Iron Regulatory Proteins

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Absorção do ferro proveniente da dieta no enterócito.....	31
<b>Figura 2-</b>	Degradação das hemácias senescentes nos macrófagos.....	33
<b>Figura 3-</b>	Captação e transporte do ferro nas células.....	34
<b>Figura 4-</b>	Regulação intracelular da expressão de proteínas no metabolismo do ferro.....	35
<b>Figura 5-</b>	Ação da hepcidina na regulação sistêmica do metabolismo do ferro.....	36
<b>Figura 6-</b>	Esquema gráfico do problema de pesquisa.....	43
<b>Figura 7-</b>	Fluxograma de inserção do projeto de pesquisa .....	46
<b>Figura 8-</b>	Delineamento do estudo com os momentos experimentais.....	51

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Classificação do estado nutricional segundo o Índice de Massa Corporal.....	21
<b>Quadro 2-</b> Principais proteínas envolvidas no metabolismo e regulação do ferro e suas funções.....	28
<b>Quadro 3-</b> Distribuição de ferro em indivíduos adultos.....	30
<b>Quadro 4-</b> Informações da composição Placebo, FiberFOS® e Simbioflora® .....	48
<b>Quadro 5-</b> Informações nutricionais Placebo, FiberFOS® e Simbioflora® .....	49
<b>Quadro 6-</b> Determinação dos parâmetros do metabolismo do ferro e marcadores inflamatórios.....	54
<b>Quadro 7-</b> Classificação do estado nutricional segundo o Índice de Massa Corporal.....	55
<b>Quadro 8-</b> Variáveis de exposição, desfecho, controle e de caracterização da amostra, unidades de medida e respectiva classificação teórica que será utilizada para as análises estatísticas.....	59

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AMP-Q	Monofosfato-adenosina proteína quinase
ANS	Agência Nacional de Saúde
AP -1	Proteína ativadora 1
CD14	Proteína receptora CD14
CD36	Receptor de hemácias
CFM	Conselho Federal de Medicina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLFL	Capacidade ligação do ferro livre
CLFT	Capacidade total de ligação do ferro
CO	Monóxido de carbono
Dcytb	Ferriredutase Citocromo B duodenal
DEs	Disruptores endócrinos
DMT1	do inglês - <i>divalent metal transporter 1</i> (Transportadora de metais bivalente 1)
DNA	do inglês: <i>desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
Fe	Ferro
Fe <sup>2+</sup>	Ferro ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Ferro férrico
FIAF	do inglês - <i>Fasting Induced Adipose Factor</i> (Fator adiposo induzido por jejum)
FOS	Fruto-oligossacarídeo
FPN	Ferroportina
FTP	Fichas técnicas de preparações
GBD	do inglês - <i>Global Burden of Disease Brasil</i> (Carga global de doenças no brasil)
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GpIM	Grupo de Pesquisa em Imunonutrição e Metabolismo
GPR41 e 43	do inglês- <i>G protein-coupled receptors</i> (Receptores acoplados a proteína G)
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCP1	do inglês - <i>Haem carrier protein 1</i> (Proteína Carreadora de Heme 1)
HFE	do inglês – <i>Human hemochromatosis protein</i>

HJV	Hemojuvelina
HO1	Hemeoxigenase
HU/UFSC	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRE	do inglês - <i>Iron regulatory elements</i> (Elementos reguladores do ferro)
IRP 1 e 2	do inglês - <i>Iron regulatory proteins</i> (Proteínas reguladoras do ferro 1 e 2)
LBP	do inglês - <i>LPS-binding proteins</i> (Proteínas de ligação ao LPS)
LPL	Lipase de lipoproteína
LPS	Lipopolissacarídeo
NF-kB	do inglês - <i>Factor nuclear kappa B</i> (Fator Nuclear kappa B)
NTBI	do inglês - <i>Non-transferrin-bound serum iron</i> (Ferro não ligado a transferrina)
PCR	Proteína C reativa
NPY	Neuropeptídeo Y
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Steap 3	Seis antígenos epiteliais transmembranares da próstata 3
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tf	Transferrina
TfR 1 e 2	Receptor de transferrina 1 e 2
TLR4	do inglês - <i>Toll-like Receptor 4</i> (Receptor do tipo Toll)
TNF- $\alpha$	do inglês - <i>Tumor necrosis fator <math>\alpha</math></i> (Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ )
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USDA	do inglês - <i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
VCM	Volume Corpuscular médio
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WHO	do inglês - <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
ZTN	Zona de termoneutralidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
2.1 OBESIDADE.....	19
2.1.1 Epidemiologia.....	19
2.1.2 Diagnóstico.....	19
2.1.3 Etiologia.....	20
2.1.4 Tratamento.....	22
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL.....	24
2.2.1 Microbiota intestinal e obesidade.....	25
2.3 METABOLISMO DO FERRO.....	27
2.3.1 Absorção e transporte.....	29
2.3.2 Homeostase do ferro .....	34
2.3.3 <i>Status</i> de ferro e obesidade.....	38
2.3.4 <i>Status</i> e microbiota intestinal.....	38
2.4 PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS.....	39
<b>3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....</b>	<b>43</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 GERAL.....	44
4.2 ESPECÍFICOS.....	44
<b>5 MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	45
5.2 ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLO CEGO.....	46
<b>5.2.1 População e amostra do estudo.....</b>	<b>46</b>
5.2.1.1 Cálculo do tamanho amostral.....	47
<b>5.2.2 Características das intervenções.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2.3 Desfechos.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.4 Protocolo do estudo.....</b>	<b>50</b>
5.2.4.1 Momentos do estudo.....	50
5.2.4.2 Randomização e cegamento.....	51
5.2.4.3 Instrumentos e técnicas de coleta de dados.....	52
5.2.4.3.1 <i>Caracterização dos indivíduos</i> .....	52
5.2.4.3.2 <i>Coleta e preparo do material biológico</i> .....	52

5.2.4.3.3. <i>Determinação de indicadores antropométricos do estado nutricional</i> .....	55
5.2.4.3.4. <i>Estimativa da ingestão dietética atual</i> .....	56
5.2.4.3.5. <i>Parâmetros clínicos</i> .....	57
5.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	57
5.4 RISCOS.....	58
5.5 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	59
5.5.1 Variáveis de exposição, desfecho, controle e de caracterização.....	59
5.5.2 Análises estatísticas.....	60
6 RESULTADOS.....	62
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
REFERÊNCIAS.....	119
Apêndice A – Orientações aos pacientes durante o período da suplementação.....	128
Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	129
Apêndice C – Caracterização dos indivíduos.....	134
Apêndice D – Avaliação antropométrica e laboratorial.....	135
Apêndice E – Parâmetros clínicos.....	137
Apêndice F – Formulário para registro de ingestão do suplemento.....	139
Anexo A - Orientação nutricional oferecida aos pacientes durante a pesquisa.....	141
Anexo B – Parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	143
Anexo C – Registro do estudo na plataforma de registro de ensaios clínicos.....	144
Anexo D – Comprovante de submissão do projeto ao edital Universal CNPq 2016.....	145

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o avanço da obesidade tem se dado de forma acelerada em todo mundo e, atualmente, é um dos maiores problemas de saúde pública que os países enfrentam, devido não só à complexidade da sua etiologia, mas por ser precursora para desenvolvimento de outras doenças como Diabetes Mellitus, doenças cardiovasculares, câncer de cólon, reto e de mama e cirrose (WHO, 2018).

Considerada uma doença crônica, a obesidade é caracterizada primordialmente pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. Sua etiologia é complexa e multifatorial, e envolve a interação entre ambiente inadequado, fatores emocionais, mecanismos neurais, hormonais, além de fatores genéticos e epigenéticos (ABESO, 2016).

Entre os fatores causais adicionais investigados atualmente, encontra-se a microbiota intestinal, que consiste em um sistema complexo e dinâmico de micro-organismos que quando em equilíbrio participam de processos benéficos ao hospedeiro (BOULANGÉ et al., 2016). A falha em manter ou alcançar o equilíbrio entre o hospedeiro e sua microbiota resulta na disbiose, que pode ser desencadeada por fatores ambientais como uma dieta rica em gordura e açúcar, estresse, uso de medicamentos, infecções e inflamação, condição presente em indivíduos obesos (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012).

Como consequências a essa alteração, são observadas mudanças não apenas na composição, mas também na diversidade de espécies e funções metabólicas da microbiota. As alterações de composição relatadas incluem menor diversidade de espécies, com predomínio de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos como: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus* *Campylobacter*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* e *Anaerostipes* (LE CHATELIER et al., 2013; OKEKE et al., 2014).

Essas, entre outras bactérias, fazem uso do fornecimento contínuo de micronutrientes para sua replicação e metabolismo como, por exemplo, o ferro (Fe). Considerado o segundo metal mais abundante na crosta terrestre, é um metal de transição e pode assumir vários estados de oxidação. A habilidade do Fe em aceitar e doar elétrons o torna um mineral vital para a homeostase celular e imprescindível para diversas reações biológicas de quase todas as células procarióticas e eucarióticas (PANTOPOULOS et al., 2012).

Assim como as células eucarióticas, as bactérias intestinais desenvolveram vários mecanismos para obter ferro de seus hospedeiros para sobrevivência e proliferação (YILMAZ, 2018). Sob condições de baixo teor de ferro, a produção de sideróforos, os compostos quelantes de ferro de alta afinidade e produção de toxinas pode ser regulada



positivamente. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que o ferro disponível pode induzir diretamente a expressão de genes de virulência, especialmente *S. Typhimurium*, e a adesão bacteriana às células epiteliais intestinais parece ser estimulada quando o ferro é altamente disponível (KORTMAN et al., 2014). Portanto, observa-se que condições de alto e baixo teor de ferro podem ser capazes de estimular diferentes aspectos da virulência bacteriana (YILMAZ, 2018).

Alterações no metabolismo do ferro também tem sido associada com a obesidade. Os relatos dessa conexão surgiram há mais de 40 anos e embora vários fatores, como deficiência na ingestão alimentar, maiores requerimentos e atividade física, tenham sido previamente propostos para explicá-la, ainda não se pode estabelecer uma causa única para esta condição (WENZEL; STULTS; MAYER, 1962, SELTZER; MAYER, 1963). Atualmente o mecanismo que melhor responde esse paradoxo envolve a descoberta da hepcidina, um hormônio peptídico, que participa da regulação sistêmica do metabolismo do ferro ao se ligar a ferroportina, o único exportador do ferro celular, e bloquear o efluxo de ferro dos tecidos envolvidos no armazenamento e/ou transporte para o plasma. A síntese de hepcidina é inibida pela atividade eritropoiética e estimulada pelo aumento das concentrações plasmáticas de ferro e também pela inflamação, através do estímulo da citocina pró-inflamatória Interleucina-6 (IL-6), que tem sua expressão aumentada em indivíduos obesos (RUCHULA; NEMETH, 2014; GANZ, 2013).

A alimentação pode influenciar negativamente ou positivamente no equilíbrio da microbiota intestinal. Neste sentido o uso de suplementação com prebióticos ou simbióticos para modulação da resposta inflamatória de baixo grau em indivíduos com obesidade, pode ser uma possibilidade para manter e/ou regular a permeabilidade intestinal (GÉRARD, 2016).

Os prebióticos são definidos como ingredientes seletivamente fermentáveis, que resultam em mudanças específicas na composição e/ou ação da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro, como inulina, oligofrutose, galacto-oligossacarídeos, fruto-oligossacarídeos. Já os simbióticos são produtos que contêm prebióticos e probióticos, que são micro-organismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas, como os *Lactobacillus* e *Bifidobactérias* (GUARNER. et al., 2012).

Apesar da ausência de estudos que avaliem o efeito da suplementação com prebióticos ou simbióticos nos parâmetros do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida, alguns investigaram o efeito da deficiência e suplementação de ferro na microbiota intestinal. Estudos realizados *in vitro*, em animais e humanos, focados principalmente no microbioma infantil, apresentaram resultados positivos tanto para diminuição dos efeitos da suplementação

de ferro e como para diminuição da proliferação de bactérias potencialmente patogênicas, evidenciando um possível caminho terapêutico para a regulação desses mecanismos (MEVISSSEN-VERHAGE et al., 1985; ZIMMERMANN et al. 2010).

Dessa forma a justificativa deste trabalho consiste na lacuna no conhecimento teórico sobre o efeito de prebiótico e simbiótico na modulação da microbiota intestinal e seu possível efeito nos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro. Visto que o ferro é um importante mineral para a proliferação de bactérias potencialmente patogênicas e que podem acentuar as alterações presentes na microbiota intestinal desses indivíduos.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de prebiótico ou simbiótico nos parâmetros do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 OBESIDADE

#### 2.1.1 Epidemiologia

De acordo com a *World Health Organization* (WHO), a obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde no mundo, e nos últimos anos o avanço desta doença tem se dado de forma acelerada. Entre os anos de 1975 e 2016 a prevalência mundial da obesidade triplicou, sendo que mais de 1,9 bilhões de adultos (> 18 anos) estavam com excesso de peso e destes 650 milhões apresentavam obesidade em 2016 (WHO, 2018).

No Brasil, a situação não é diferente, dados apontam que a obesidade vem crescendo exponencialmente. De acordo com a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – VIGITEL em que os indivíduos auto relatavam seu peso e altura, houve um aumento de 60% da obesidade nos últimos 10 anos. No Sul do país, os dados se assemelham, informações da mesma pesquisa e no mesmo período, revelaram que a prevalência de obesidade aumentou em 48% na cidade de Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina (VIGITEL, 2017).

O aumento desta condição de saúde repercute no desenvolvimento de outras doenças. Pesquisas do estudo *Global Burden of Disease Brasil* (GBD), que descreve tanto a prevalência ou fatores de risco para uma determinada doença, quanto o dano relativo que a mesma causa, apontam o excesso de peso e a obesidade como o segundo fator de risco mais importante para um conjunto crescente de doenças, que incluem entre outras: doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, câncer de cólon, de reto e de mama e cirrose (SOUZA, FRANÇA e CAVALCANTE, 2017).

Dessa forma, denota-se que a condição de obesidade tem um grande impacto na vida do indivíduo e um importante papel na economia do país, já que se mostra como precursora para outros problemas de saúde. E por ser caracterizada como uma doença multifatorial, o desenvolvimento de tratamentos e políticas de prevenção para a obesidade necessita de uma abordagem multiprofissional e transdisciplinar (GBD, 2017)

#### 2.1.2 Diagnóstico

O padrão utilizado pela WHO e o mais comumente empregado para o diagnóstico de obesidade em indivíduos adultos é o Índice de Massa Corporal (IMC), que é determinado pela relação entre peso (kg) e altura ao quadrado (m). O indivíduo é classificado em: eutrofia, sobrepeso, obesidade grau I, obesidade grau II e obesidade grau III, conforme quadro 1 (WHO, 2000).

Quadro 1 - Classificação do estado nutricional segundo o Índice de Massa Corporal.

<b>Classificação</b>	<b>Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Eutrofia	18,50-24,99
Sobrepeso	≥ 25,00
Obesidade grau I	30,00-34,99
Obesidade grau II	35,00-39,99
Obesidade grau III	≥ 40,00

Fonte: WHO (2000).

### 2.1.3 Etiologia

A obesidade é considerada uma doença crônica caracterizada primordialmente pelo acúmulo de gordura corporal. Sua etiologia é complexa e multifatorial, e envolve a interação entre ambiente inadequado, fatores emocionais, mecanismos neurais, hormonais, além de fatores genéticos e epigenéticos (ABESO, 2016).

A epidemia da obesidade é considerada uma das maiores preocupações de saúde pública que os países têm enfrentado nas últimas décadas. No entanto, as suas causas não são totalmente compreendidas (DAVIS; PLAISANCE; ALLISON, 2018).

Entre os fatores adicionais atualmente investigados, encontram-se os disruptores endócrinos (DEs), fatores reprodutivos e intrauterinos, epigenética, idade materna, microbiota intestinal, redução da variabilidade da temperatura ambiente, cessação do tabagismo, débito do sono e iatrogenia farmacológica. Alguns desses fatores apresentam melhores associações com a obesidade, enquanto outros, ainda são objetos de pesquisas para confirmar sua real contribuição para desenvolvimento desta doença (ABESO, 2016).

Em síntese, fatores ambientais como os DEs, que são substâncias lipofílicas ambientalmente estáveis, produzidas industrialmente como diclorodifeniltricloroetano, e também presentes na soja pelos fitoestrógenos podem afetar a função endócrina induzindo a adipogênese pela simulação do efeito de alguns hormônios no organismo. Já a teoria da

termoneutralidade, relata que permanecer mais tempo na zona de termoneutralidade (ZTN) caracterizado pelo intervalo de temperatura ambiente em que o gasto de energia não é necessário para homeotermia, pode promover adiposidade (DAVIS; PLAISANCE; ALLISON, 2018).

Em relação aos fatores comportamentais, a privação do sono mostra relação inversa com a obesidade devido as alterações na liberação de hormônios que regulam o apetite como leptina e grelina. A cessação do tabagismo também tem relação com o aumento da obesidade, principalmente em mulheres, já que a nicotina tem efeitos termogênicos e redutores do apetite (ABESO, 2016).

No que diz respeito aos fatores reprodutivos, a idade materna também tem sido relacionada com a obesidade, o risco de obesidade na criança aumenta em cerca de 15% para cada incremento de 5 anos na idade materna (ABESO, 2016).

Ainda, vários medicamentos são conhecidos por sua influência no ganho de peso, como os que apresentam propriedades psicotrópicas, anti-hipertensivos, antidiabéticos, hormônios esteroides, contraceptivos, inibidores de protease e anti-histamínicos. E o aumento do uso destes fármacos nos últimos anos é concomitante ao aumento na obesidade (DHURANDHAR; KEITH, 2014).

O fenômeno da relação entre a ingestão e o gasto de energia é bem consolidado, e ocorre quando a ingestão de energia excede o gasto energético. Esse excesso é armazenado em grande parte na forma de gordura corporal, sendo prejudicial à saúde do indivíduo. Esse fator causal é intensificado pelo ambiente obesogênico presente nas últimas décadas, que é caracterizado pelo aumento na disponibilidade de alimentos industrializados, de fácil acesso e com alta densidade energética, aliado a diminuição ou falta de atividade física. Nesse contexto é importante salientar que essa transição do consumo alimentar, onde há o predomínio de uma dieta ocidental rica em gorduras, açúcares e sódio e redução da presença de fibras alimentares pode levar ao desequilíbrio da microbiota intestinal nesses indivíduos, e assim, relacionar a microbiota intestinal como um fator ambiental para o desenvolvimento da obesidade (DAVIS; PLAISANCE; ALLISON, 2018).

Em síntese, alterações da microbiota intestinal podem levar ao aumento da captação de energia e as alterações nas populações microbianas podem aumentar a permeabilidade do intestino, o que facilita a translocação de bactérias ou de componentes de membrana endotóxicos. Ainda, podem afetar a produção de sinais de indução de saciedade e produtos metabólicos bacterianos, tais como ácidos graxos de cadeia curta (acetato, butirato, propionato) e suas proporções relativas podem alterar a sinalização imune e metabólica mudando a função

do tecido adiposo, cérebro, fígado, músculo e pâncreas e induzindo inflamação de baixo grau, resistência à insulina e aumento de peso (ABESO, 2016).

#### **2.1.4 Tratamento**

Atualmente, identificam-se duas abordagens a serem trabalhadas no tratamento da obesidade: a mudança de hábitos de vida com adoção de uma alimentação saudável associada a prática de atividade física e o tratamento clínico que envolve o tratamento farmacológico e em casos específicos, a realização de cirurgia bariátrica (ANS, 2017).

A abordagem dietética é o passo inicial para o tratamento. Não há controvérsia de que o balanço energético negativo resulte na diminuição da massa corporal, mas o que se discute, é a melhor maneira de promover a redução de consumo de calorias. Embora possam ser usadas estrategicamente por um período, as dietas muito restritivas, artificiais e rígidas não são sustentáveis. Já um planejamento focado na reeducação alimentar e mais flexível, onde se leva em conta além da quantidade de calorias, as preferências alimentares, a condição financeira, o estilo de vida e o requerimento energético para a manutenção da saúde, aliado a atividade física e modificação comportamental, geralmente se obtém resultados mais satisfatórios. Para o sucesso desta abordagem, essas mudanças devem ser mantidas por toda a vida. Vale salientar que estes aspectos são importantes para o sucesso das demais abordagens clínicas (ABESO, 2016).

Casos onde ocorram a falha na perda de peso, decorrente da mudança de hábitos de vida, recomenda-se o início do tratamento adjuvante, o farmacológico. O objetivo do tratamento com medicamentos é tentar atingir a perda de 10% do peso corporal, o que determina melhora das complicações da obesidade, como diabetes e hipertensão arterial (ANS, 2017).

O indivíduo deve ser avaliado individualmente sobre a história do peso e dos problemas de saúde e a motivação para atuar contra os ambientes obesogênicos. A escolha do tratamento, é realizada sob supervisão médica contínua e deve basear-se na gravidade do problema e na presença de complicações associadas, estando indicado quando: IMC maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup>; ou IMC maior ou igual a 25 ou 27 kg/m<sup>2</sup> na presença de comorbidades (dependendo do medicamento); além de falha em perder peso com o tratamento não farmacológico. Indivíduos com IMC normal e aumento da circunferência abdominal são considerados obesos viscerais e devem ser tratados na presença de comorbidades (associadas à obesidade e síndrome metabólica). Existem, atualmente, três medicamentos aprovados para tratamento da obesidade no Brasil: sibutramina, orlistate e liraglutida (ABESO, 2016).

A cirurgia bariátrica é indicada para indivíduos com idade entre 18 a 65 anos, IMC maior a 40 kg/m<sup>2</sup> ou 35 kg/m<sup>2</sup> com uma ou mais comorbidades graves relacionadas com a obesidades e que não apresentaram resposta ao tratamento clínico medicamentoso e mudanças de estilo de vida após acompanhamento regular com endocrinologista por, no mínimo, dois anos (ANS, 2017).

Recentemente o conselho federal de medicina aumentou o número de doenças associadas a IMC superior a 35 kg/m<sup>2</sup>, habilitam paciente ao procedimento cirúrgico como: diabetes, apneia do sono, hipertensão arterial, dislipidemia, doenças cardiovasculares incluindo doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, angina, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, hipertensão e fibrilação atrial, cardiomiopatia dilatada, cor pulmonale e síndrome da hipoventilação da obesidade, asma grave não controlada, hérnias discais, osteoartroses, refluxo gastroesofágico com indicação cirúrgica, colecistopatia calculosa, pancreatites agudas de repetição, incontinência urinária de esforço na mulher, infertilidade masculina e feminina, disfunção erétil, síndrome dos ovários policísticos, veias varicosas e doença hemorroidária, hipertensão intracraniana idiopática (pseudotumor cerebri), estigmatização social e depressão. Nos idosos, com mais de 65 anos, é necessária uma avaliação específica, considerando o risco cirúrgico e anestésico, a presença de comorbidades a expectativa de vida, os benefícios da perda de peso e as limitações da idade. Adolescentes com 16 anos completos e menores de 18 anos poderão ser operados, mas além das exigências anteriores, um pediatra deve estar presente na equipe multiprofissional e seja observada a consolidação das cartilagens das epífises de crescimento dos punhos. A cirurgia em menores de 18 anos é considerada experimental. Acrescenta como precauções para a indicação: a ausência de uso de drogas ilícitas ou alcoolismo, a ausência de quadros psicóticos ou demenciais graves ou moderados, além da compreensão, por parte do paciente e dos familiares, dos riscos e das mudanças de hábitos inerentes a uma cirurgia de grande porte sobre o tubo digestivo e da necessidade de acompanhamento pós-operatório com a equipe multidisciplinar em longo prazo (CFM, 2015)

Para avaliação dos indivíduos com indicativo cirúrgico, preconiza-se uma equipe interdisciplinar composta por especialistas: endocrinologia e metabologia, cirurgião bariátrico ou do aparelho digestivo, nutricionista ou nutrólogo, psiquiatra ou psicólogo, anestesista, enfermeiro, assistente social e eventualmente outros (cardiologista, pneumologista, fisioterapeuta, odontologista, etc.), com experiência em obesidade e cirurgia bariátrica (CFM, 2015).

As cirurgias aceitas pelo Conselho Federal de Medicina, consideradas não experimentais (além do balão intragástrico, como procedimento endoscópico), são divididas em não derivativas (banda gástrica laparoscópica ajustável e gastrectomia vertical) e derivativas (derivação gástrica com reconstituição do trânsito intestinal em Y de Roux – ou bypass gástrico – e derivações biliopancreáticas à Scopinaro e à duodenal *switch*). A derivação jejunoileal exclusiva (término-lateral ou látero-lateral ou parcial) está proscrita em vista da alta incidência de complicações metabólicas e nutricionais em longo prazo (ABESO, 2016).

## 2.2. MICROBIOTA INTESTINAL

O corpo humano é colonizado por cerca de 100 trilhões de micro-organismos e estes valores representam aproximadamente 10 vezes mais células microbianas do que as células presentes no corpo. O microbioma humano encontra-se distribuído em cinco principais áreas no organismo: vias respiratórias, pele, cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina (BLUM, 2017). Dentre essas áreas, o microbioma do trato gastrointestinal é considerado o mais complexo. Seu processo de colonização começa no período pré-natal, através da transmissão microbiana da mãe para o feto, a colonização do intestino humano continua após o nascimento e é modulada por fatores como idade gestacional, tipo de parto (natural ou cesariana), dieta (amamentação ou fórmula infantil), higiene e exposição a antibióticos. As características da microbiota adulta são adquiridas entre 2 e 5 anos, portanto o ambiente e a dieta durante os primeiros 3 anos de vida são cruciais para o estabelecimento de uma simbiose entre bactérias e hospedeiro, o que influencia no desenvolvimento dos sistemas imunológico e neurológico (BOULANGÉ et al., 2016).

A microbiota intestinal refere-se às colônias de micro-organismos que residem no intestino dos animais, sendo composta por espécies nativas que colonizam permanentemente o trato gastrointestinal e por um número variável de micro-organismos que vivem temporariamente no trato digestório (KINROSS et al., 2008). A densidade de micro-organismos aumenta significativamente ao longo do trato gastrointestinal, sendo mais alta no cólon. A maioria dos micro-organismos são anaeróbios estritos, seguidos por anaeróbios facultativos e espécies aeróbicas. Entre adultos saudáveis, as espécies mais abundantemente encontradas são membros dos filos Firmicutes (gram-positivas - por exemplo, gêneros *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*), Bacteroidetes (gram-negativas - por exemplo, gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*) e Actinobacteria (gram-positivas), responsáveis por mais de 90% das bactérias (KHANNA, 2018).



O equilíbrio entre as bactérias simbiotes, comensais e patobiontes é característico de uma microbiota intestinal saudável, que participa de processos benéficos ao hospedeiro como: defesa contra patógenos e toxina, desenvolvimento e manutenção do sistema imune intestinal e participação na digestão por fornecimento de capacidade enzimática (BOULANGÉ et al., 2016).

A falha em manter ou alcançar o equilíbrio entre o hospedeiro e sua microbiota resulta na disbiose, que pode ser desencadeada por fatores ambientais como uma dieta rica em gordura e açúcar, estresse, uso de medicamentos e infecções. A disbiose leva ao aumento da permeabilidade celular e o favorecimento de translocação de patógenos, principalmente LPS, também denominado de endotoxina (MARTINEZ; PIERRE; CHANG, 2016).

O LPS é um componente da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua estrutura contém o lipídio A, que é capaz de atravessar a mucosa gastrointestinal através das junções firmes intercelulares (*tight junctions*) ou por meio da infiltração em quilomícrons, lipoproteínas responsáveis pela absorção de triglicerídeos e colesterol do intestino ao plasma. Uma vez na circulação, os LPS ligam-se às proteínas de ligação ao LPS (LBP), presente no plasma. A interação entre estas duas moléculas ativa a proteína receptora CD14 localizada na membrana plasmática dos macrófagos. O complexo gerado se liga ao receptor *Toll-like 4* (TLR4) na superfície dos macrófagos, o que desencadeia sinais de transdução que permite a ativação de várias vias imunes clássicas, incluindo as vias de nucleares de ativação do fator-kB (NF-kB) e a proteína ativadora 1 (AP -1), que induz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- $\alpha$ . Esse processo, também é conhecido como endotoxemia metabólica (BOULANGÉ et al., 2016; COX; WEST; CRIPPS, 2015).

A própria endotoxemia metabólica tem sido associada como um “gatiho” para induzir o aumento da permeabilidade intestinal e da translocação por LPS. Cani et al. (2007) relataram que em camundongos injetados com LPS houve ganho de peso e maior resistência à insulina sem qualquer alteração na ingestão de energia (CANI et al., 2007).

### **2.2.1. Microbiota intestinal e obesidade**

Evidências mostram que a obesidade é uma doença inflamatória crônica de baixo grau, caracterizada pela ativação de vias de sinalização inflamatórias (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012) e secreção aumentada de adipocinas e de mediadores pró-inflamatórios, como PCR, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (NIKONOROV et al., 2015).

Dentre os mecanismos responsáveis pela ativação dessa resposta, os mais discutidos na literatura são: a expansão e hipóxia do tecido adiposo (TRAYHURN, 2014), a glicotoxicidade e a lipotoxicidade (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012), o estresse do retículo endoplasmático (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011) e o desequilíbrio da microbiota intestinal (COX; WEST; CRIPPS, 2015).

Indivíduos obesos apresentam maiores concentrações sistêmicas de LPS do que indivíduos saudáveis e essa relação entre a obesidade e a endotoxemia metabólica tem sido associada com alto consumo de dieta hiperlipídica (rica em gordura), que pode tanto levar a disbiose intestinal e desencadear o processo da endotoxemia, como favorecer ao aumento dos quilomícrons no intestino e por conseguinte a infiltração do LPS na circulação (CANI et al., 2007; GHOSHAL et al., 2009).

A microbiota intestinal pode ainda ser um fator contribuinte para obesidade por influenciar o balanço energético e os sinais de regulação da ingestão alimentar, periféricos e centrais. As bactérias produzem enzimas que fermentam os polissacarídeos não digeríveis (fibras – provenientes da dieta) em monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato, estes são importantes fontes de energia para os colonócitos (BOUTER et al., 2017). Porém, alguns estudos mostram que a extração de energia pode ser mais eficiente em indivíduos obesos. Um estudo pioneiro mostrou um aumento de gordura corporal e maior extração de energia quando o microbioma de camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*), foi transplantado para animais de controle *germ-free*. O aumento da extração de energia também tem sido relacionado com a proporção do tipo de bactérias, em camundongos uma alta proporção de Firmicutes em relação Bacteroidetes estava associada à maior captação de energia (TURNBAUGH et al., 2006).

Os AGCC ainda podem influenciar a motilidade intestinal e a produção de hormônios intestinais, com papel na regulação da saciedade. Eles possuem a capacidade de ligar-se aos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), Gpr41 e Gpr43 presentes no intestino e, uma vez ativados aumentam a produção de neuropeptídeo Y (NPY). Isso altera a motilidade intestinal, retardando o tempo de trânsito intestinal e facilitando a absorção de nutrientes no lúmen intestinal (ROSENBAUM; KNIGHT; LEIBEL et al., 2015).

Outro mecanismo envolvido na patogênese da obesidade é a supressão de FIAF (do inglês - Fasting Induced Adipose Factor) pela microbiota intestinal. O FIAF é produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo e é responsável por inibir a lipase de lipoproteína (LPL). Quando ocorre sua supressão, há aumento da atividade da LPL o que leva a maior absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos. Outro mecanismo observado é a

inibição da via da 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase (AMP-Q), esta enzima participa do metabolismo energético celular e age estimulando a oxidação dos ácidos graxos em tecidos periféricos e quando inibida ativa processos anabólicos e bloqueia processos catabólicos (YANG; HUR; LEE, 2017).

Em indivíduos obesos encontra-se uma baixa riqueza de genes bacterianos e aumento da presença de gêneros bacterianos potencialmente pró-inflamatórios como: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus* *Campylobacter*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* e *Anaerostipes*, os quais podem favorecer o aparecimento ou intensificar a inflamação crônica e a resistência à ação da insulina (TURNBAUGH et al., 2006, 2009; LE CHATELIER et al., 2013).

### 2.3. METABOLISMO DO FERRO

O ferro (Fe) é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre e por ser um metal de transição pode assumir vários estados de oxidação. As formas mais comuns são o ferro divalente ( $\text{Fe}^{2+}$  - ferroso) e o ferro trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$  - férrico). O potencial redox do Fe pode ser modulado a depender da substância com que ele interage, quando recebe elétrons (redução) se estabiliza em seu estado ferroso e quando perde elétrons (oxidação) se encontra no estado férrico (PANTOPOULOS et al., 2012).

A habilidade do Fe em aceitar e doar elétrons o torna um mineral vital para a homeostase celular e imprescindível para diversas reações biológicas de quase todas as células procarióticas e eucarióticas. Em humanos, o Fe atua como cofator para várias hemoproteínas e proteínas que contêm ferro não heme. As hemoproteínas estão envolvidas em numerosas funções biológicas como: ligação e transporte de oxigênio (hemoglobinas), metabolismo de oxigênio (catalases, peroxidases), respiração celular e transporte de elétrons (citocromos). As proteínas que contêm ferro não heme são importantes para processos celulares fundamentais como: síntese de DNA, proliferação e diferenciação celular (ribonucleotídeo redutase), regulação gênica, metabolismo de fármacos e síntese de esteroides (WANG; PANTOPOULOS 2011).

A característica redox do Fe também pode torná-lo um elemento prejudicial ao organismo. Quando a concentração de ferro no plasma está elevada, a transferrina (transportadora de ferro no plasma) fica saturada e o excesso de ferro liga-se a moléculas de baixo peso molecular, tal como citrato e acetato, ou a albumina. Esta forma de ferro é referida como ferro não ligado a transferrina (NTBI). NTBI tem afeição ao parênquima das células, principalmente hepatócitos, mas também miócitos cardíacos e células endócrinas, e pode promover danos aos órgãos.

Adicionalmente, o ferro livre na presença de oxigênio pode formar espécies reativas de oxigênio (ROS) através da Reação de Fenton, com capacidade de danificar DNA, proteínas e organelas, com prejuízos funcionais aos órgãos atingidos (AREZES, NEMETH, 2015).

Portanto, é necessário equilíbrio no metabolismo do ferro, de modo que não haja falta ou excesso do mesmo. Essa homeostase permite a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evita possíveis danos teciduais (GROTTO, 2010).

O Quadro 2 apresenta as principais proteínas envolvidas na homeostase do ferro e suas respectivas funções.

Quadro 2- Principais proteínas envolvidas no metabolismo e regulação do ferro e suas funções.

<b>Proteína</b>	<b>Acrônimo</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
Transportador de metais bivalente 1	DMT1	Enterócitos, eritroblastos, macrófagos, hepatócitos e células dos rins	Íons metálicos bivalentes como ferro, zinco, cobre e cobalto
Proteína Carreadora de Heme 1	HCP1	Enterócitos, hepatócitos e células renais	Transportador do grupo heme pelas membranas
Ferroportina	FPN	Enterócitos, macrófagos e hepatócitos	Transportador (exportador) de $Fe^{2+}$
Hemeoxigenase	HO1	Enterócitos e macrófagos	Libera o ferro do anel porfirínico
Hefaestina	Hp	Enterócitos	Ferroxidase
Ceruloplasmina		Outras células	
Citrocromo B duodenal	Dcytb	Enterócitos	Ferrirredutase
Seis antígenos epiteliais transmembranares da próstata 3	Steap 3	Eritroblastos	
Transferrina	Tf	Plasma	Proteína ligadora de $Fe^{3+}$ no plasma

Quadro 2- Principais proteínas envolvidas no metabolismo e regulação do ferro e suas funções.  
(continuação)

<b>Proteína</b>	<b>Acrônimo</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
Ferritina	Ft	Enterócitos, eritroblastos, macrófagos, hepatócitos, miócitos e cardiomiócitos	Proteína de estocagem de ferro intracelular
Hemossiderina		Macrófagos e hepatócitos	Proteína de estocagem de ferro intracelular, produto de clivagem da ferritina quando as concentrações de ferro são altas
Hepcidina	Hep	Hepatócitos, adipócitos e possivelmente enterócitos	Hormônio regulador de ferro, liga a ferroportina para internalizá-la e degradá-la
Eritropoetina	EPO	Rins, hepatócitos (pequena secreção)	Aumenta a expressão de ferroportina, TfR1, DMT1 e hefaestina. Diminui a expressão de Hep
Receptores de transferrina 1 e 2	TfR1 TfR2	Expressos em vários órgãos do organismo	Captação celular da Tf ligada ao ferro, sensores para a Tf diférrica, reguladores da expressão de hepcidina

Fonte: Adaptado e traduzido de MISETA et al., 2015.

### 2.3.1 Absorção e transporte

O ferro corporal total de um indivíduo adulto, sexo masculino, com 70 kg é de aproximadamente 3,5 g (50 mg/kg). A maior parte do ferro no organismo é destinada aos eritrócitos, alocado na hemoglobina, e até um quarto encontra-se armazenado no fígado e em macrófagos (Quadro 3). O ferro utilizado pelo organismo é obtido de duas fontes principais: da

dieta e da reciclagem de hemácias senescentes (GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012).

Quadro 3. Distribuição de Ferro em indivíduos adultos

<b>Localização</b>	<b>Proteína</b>	<b>Conteúdo de Ferro</b>
Eritrócitos	Hemoglobina	1.500 - 2.500 mg
Hepatócitos e macrófagos (armazenado)	Ferritina	200 - 1.200 mg
Plasma	Transferrina	3 - 4 mg
Outros tecidos	Mioglobina (músculo) e outros	200 mg

Fonte: Adaptado e traduzido de GANZ; NEMETH, 2015.

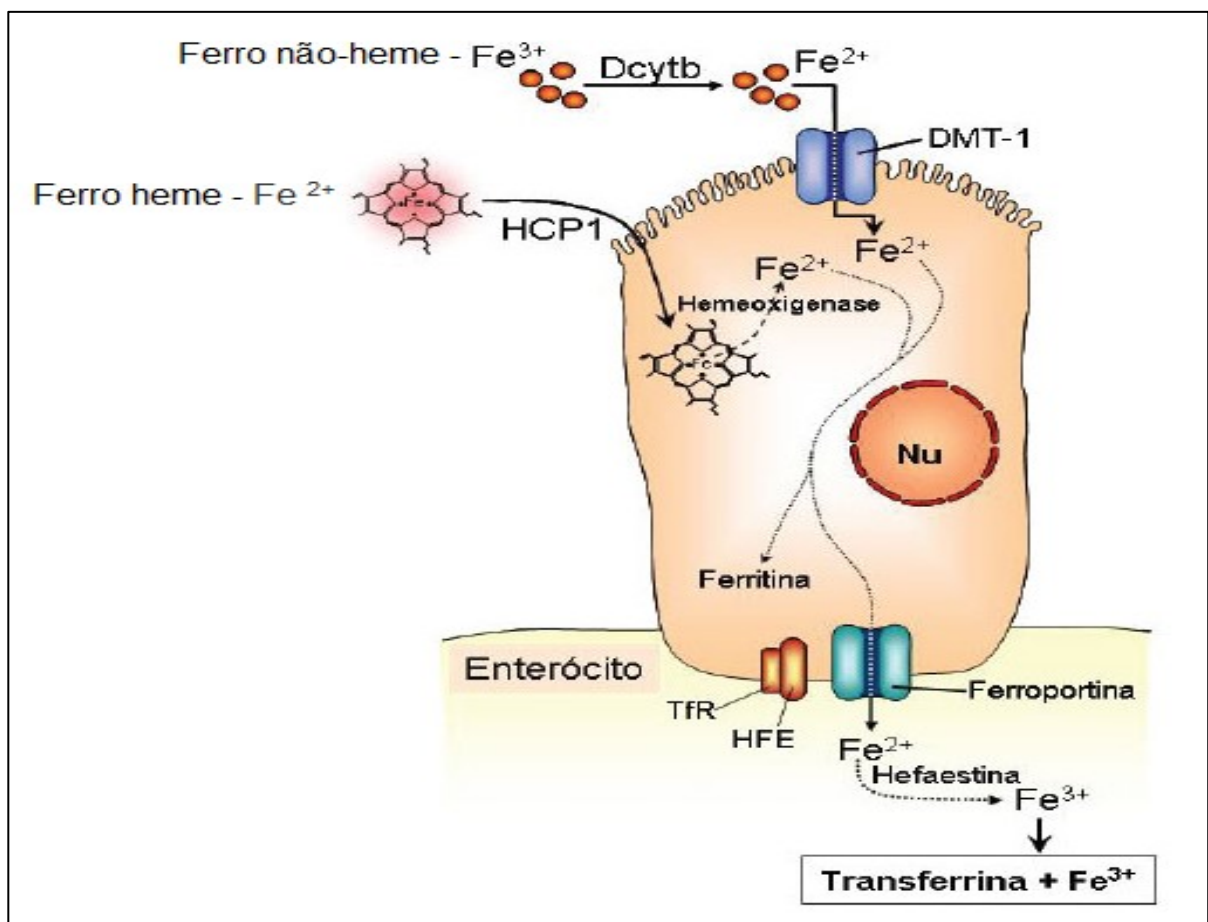
A dieta fornece cerca de 10 a 20 mg de ferro, destes apenas 1 a 2 mg são absorvidos, essa quantidade é suficiente para compensar as perdas diárias de ferro não reguladas, proveniente da descamação das células da mucosa e da pele e da menstruação. O Fe presente nos alimentos encontra-se em duas conformações diferentes: o Fe heme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de origem animal, que está ligado ao anel porfirínico constituinte da hemoglobina ou mioglobina do animal e o Fe não-heme ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de origem vegetal, a absorção de ambos ocorre principalmente no epitélio duodenal superior (DAHER; KARIM, 2017).

O Fe heme corresponde a aproximadamente 10% do ferro da alimentação, porém em virtude de sua melhor absorção, supõe-se que contribua com 40 % do total de ferro absorvido. O Fe não-heme apesar de ser encontrado em uma maior concentração na alimentação (cerca de 90%), é menos absorvido. Porém, a influência de alguns fatores pode favorecer sua absorção, como acidez e presença de agentes solubilizantes, como açúcares (HENRIQUES, 2013).

A absorção do Fe não-heme envolve inicialmente sua redução de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  pela ferriredutase Citocromo B duodenal (Dcytb). O  $\text{Fe}^{2+}$  é captado pela transportadora de metais bivalente 1 (DMT1), proteína localizada na membrana apical dos enterócitos composta por 12 segmentos transmembrana que transporta, além do ferro, outros cátions divalentes. Uma vez internalizado o  $\text{Fe}^{2+}$  pode seguir dois caminhos, ser retido na célula na molécula de ferritina ou ser exportado para plasma pela ferroportina (FPN). O mecanismo de internalização do Fe heme ainda não é totalmente esclarecido. Sugere-se que ele seja internalizado pela Proteína Carreadora de Heme 1 (HCP1), também localizada na membrana apical dos enterócitos, porém questiona-se se essa proteína não seria um transportador bifuncional, já que transporta folato de maneira mais eficiente. Depois da sua internalização, no citoplasma do enterócito, o Fe heme

sofre a ação da Hemeoxigenase (HO1) para liberar seu anel porfirínico que em seguida fará parte do mesmo *pool* de Fe não-heme e poderá ser armazenado na célula na molécula de ferritina ou exportado para o plasma pela FPN. Após ser exportado para o plasma o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado para  $\text{Fe}^{3+}$  pela hefaestina para se ligar a transferrina (Tf) e ser transportado para outras células (Figura 1). Uma vez dentro da célula do epitélio intestinal, o ferro que não foi exportado para o plasma ou armazenado, é perdido quando os enterócitos senescerem, sendo excretado na luz intestinal (WALLACE, 2016).

Figura 1 – Absorção do ferro proveniente da dieta no enterócito.



Fonte: Adaptado de GROTTTO, 2010. Abreviações: Dcytb: Citocromo B duodenal; DMT-1: transportadora de metais bivalente; HCP-1: Proteína Carreadora de Heme 1; HFE: proteína da hemocromatose; Tfr: receptor de transferrina; NU: Núcleo.

A maior parte do ferro no organismo está associada à molécula de hemoglobina e a degradação das hemácias senescentes representam fonte importante de ferro (25 a 30 mg/dia)

para o organismo. O ferro reciclado dessas células é suficiente para manter a necessidade diária para a produção de novos eritrócitos na medula óssea (COFFEY; GANZ, 2017).

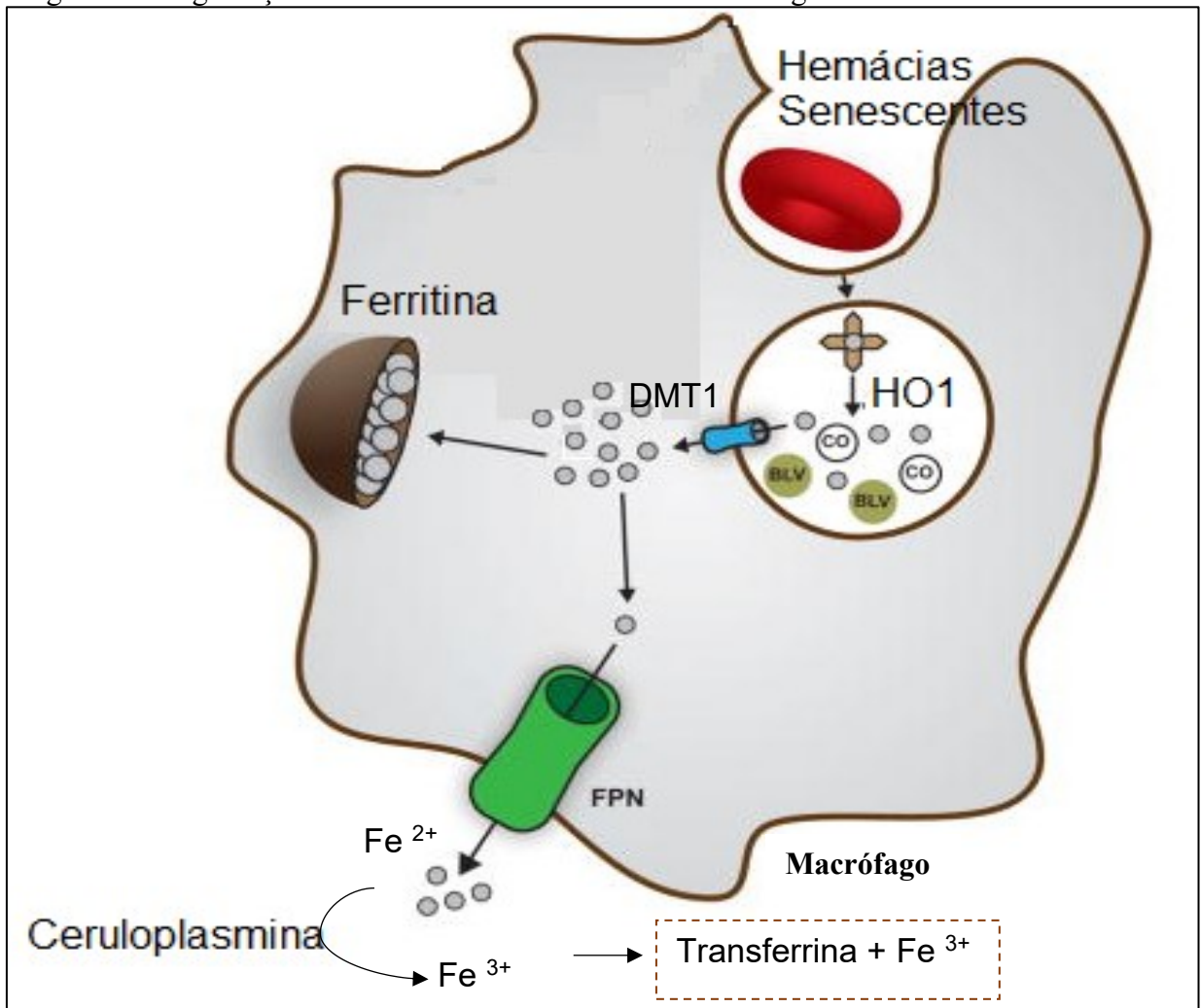
As hemácias têm um tempo médio de vida de 120 dias, a medida que se tornam senescentes passam a expressar modificações bioquímicas em sua superfície como: peroxidação de lipoproteínas de membrana, perda de resíduos de ácido siálico e formação de neoantígenos, essas alterações são reconhecidas pelos macrófagos do baço e da medula óssea e, em menor quantidade, pelas das células de Küpffer, que sinalizam a eliminação dessas células, processo conhecido como eriptose ou morte programada. Nesse processo as células sofrem um “encolhimento” e externalização de fosfadilserina, que é reconhecida pelo seu receptor (CD36) nos macrófagos. Posteriormente as hemácias são internalizadas, com consequente degradação dos seus componentes. Através de um complexo enzimático, ocorre o catabolismo intracelular do Fe heme, onde HO1 atua para liberar o anel porfirínico gerando monóxido de carbono (CO), biliverdina e  $\text{Fe}^{2+}$ , que será transportado para o citoplasma pela DMT1 e poderá ser retido no próprio macrófago nas moléculas de ferritina ou ser exportado para o plasma pela FPN. Neste caso após externalização para o plasma, o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado para  $\text{Fe}^{3+}$  pela ação da ceruloplasmina, enzima sintetizada no fígado, para ser transportado pela Tf (Figura 2). O ferro proveniente da dieta ou da degradação das hemácias senescentes é transportado no plasma pela Tf até os locais onde será utilizado, sendo predominantemente relacionados à medula óssea, para produção de eritrócitos (CASSAT; SKAAR, 2013; WALLACE, 2016).

A Tf é uma glicoproteína monomérica sintetizada e secretada pelo fígado de 80 kDa, que possui dois sítios homólogos (denominados N e C). Cada molécula de Tf pode ligar-se à dois átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  e ela desempenha o papel de quelante para o ferro e com isso além o manter em sua forma solúvel sob condições fisiológicas, facilita seu transporte e absorção e atenua sua reatividade impedindo a formação de radicais livres. A Tf, tem ainda, papel defensivo indireto contra infecções, privando os patógenos potenciais do ferro extracelular, que é essencial para o seu crescimento (GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012).

As células têm receptores de transferrina (TfR) que medeiam o metabolismo do ferro. O ferro é importado por endocitose do complexo Tf carregado com  $\text{Fe}^{3+}$  que interage com seus TfRs (TfR1 e TfR2). A TfR1 é expressa em baixos níveis, porém de maneira presente na maioria dos tecidos humanos e a TfR2, uma proteína homóloga a TfR1, tem sua expressão restrita aos hepatócitos, às células de criptas do duodeno e aos eritrócitos, o que sugere um papel mais especializado no metabolismo do ferro (ROCHETTE et al., 2015).



Figura 2 – Degradação das hemácias senescentes nos macrófagos.

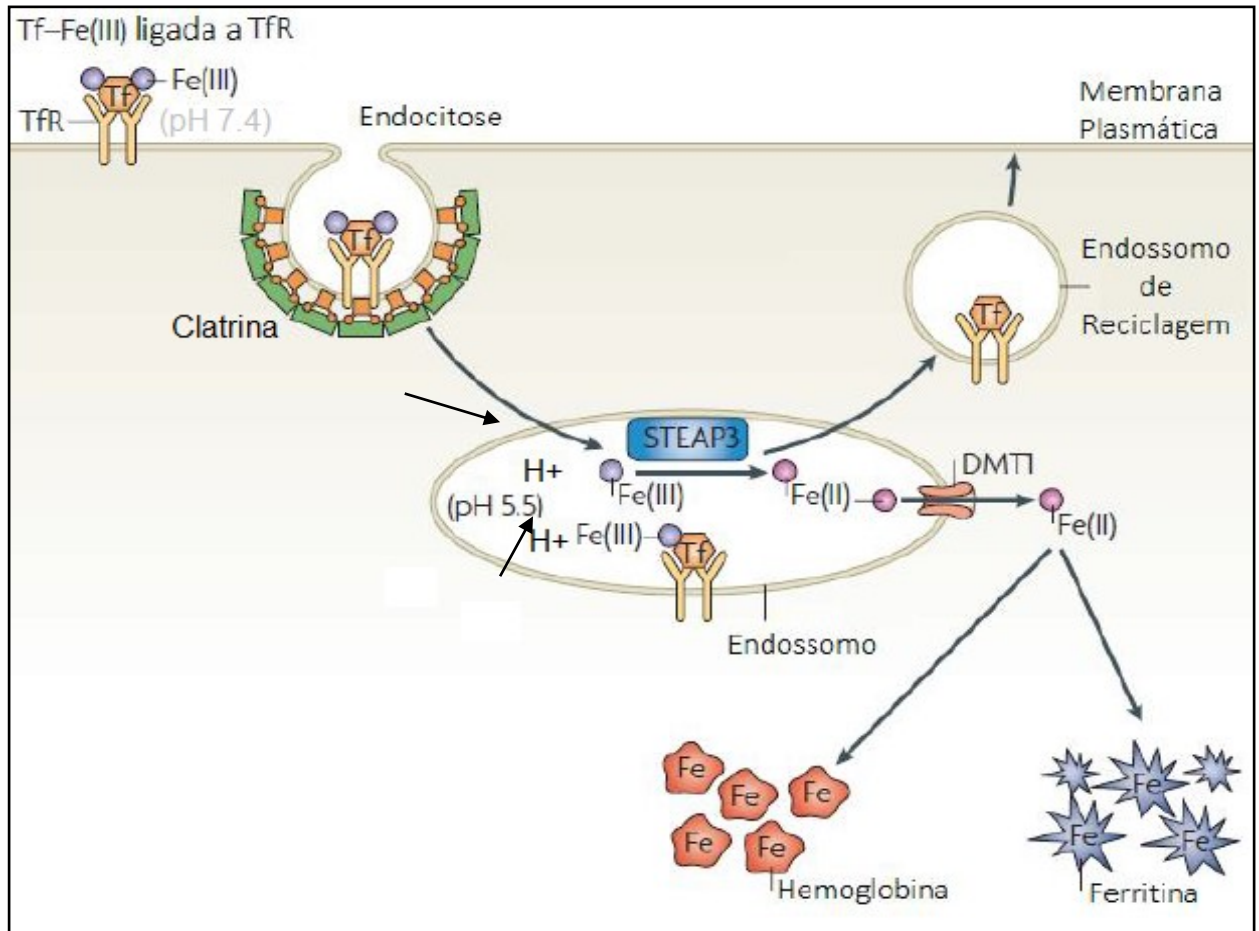


Fonte: Adaptado e Traduzido de: CASSAT; SKAAR, 2013. Abreviações: DMT1: transportadora de metais bivalente, HO1: Hemeoxigenase, FPN: Ferroportina, BLV: Biliverdina, CO: Monóxido de carbono.

Postula-se que a afinidade da Tf ao seu receptor é determinada pela HFE (*Human hemochromatosis protein*), proteína produzida pelo gene da hemocromatose. A interação Tf-TfR inicia o mecanismo de captação de ferro pela célula. O complexo Tf-TfR é internalizado por endocitose revestido por clatrina. Após internalização uma bomba de prótons promove a acidificação do endossomo para pH 5,5 desencadeando a dissociação do Fe<sup>3+</sup> da Tf, que permanece ligada a TfR. A ferriredutase Steap3 reduz o Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> que é transportado para o citosol pela DMT1, que pode ser direcionada diretamente para as mitocôndrias nas células eritroides, ser retida pela ferritina ou exportada pela FPN. Após a liberação do ferro, a afinidade da Tf com seu receptor diminui, resultando na dissociação desse complexo, então a apo-Tf

(Transferrina sem ferro) é secretada na corrente sanguínea para recapturar o  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 3) (WANG; PANTOPOULOS, 2011)

Figura 3 – Captação e transporte do ferro nas células.



Fonte: Adaptado e traduzido de DE DOMENICO et al., 2008. Abreviações: Dcytb: Citocromo B duodenal; DMT-1: transportadora de metais bivalente; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor de transferrina; Tf: Transferrina.

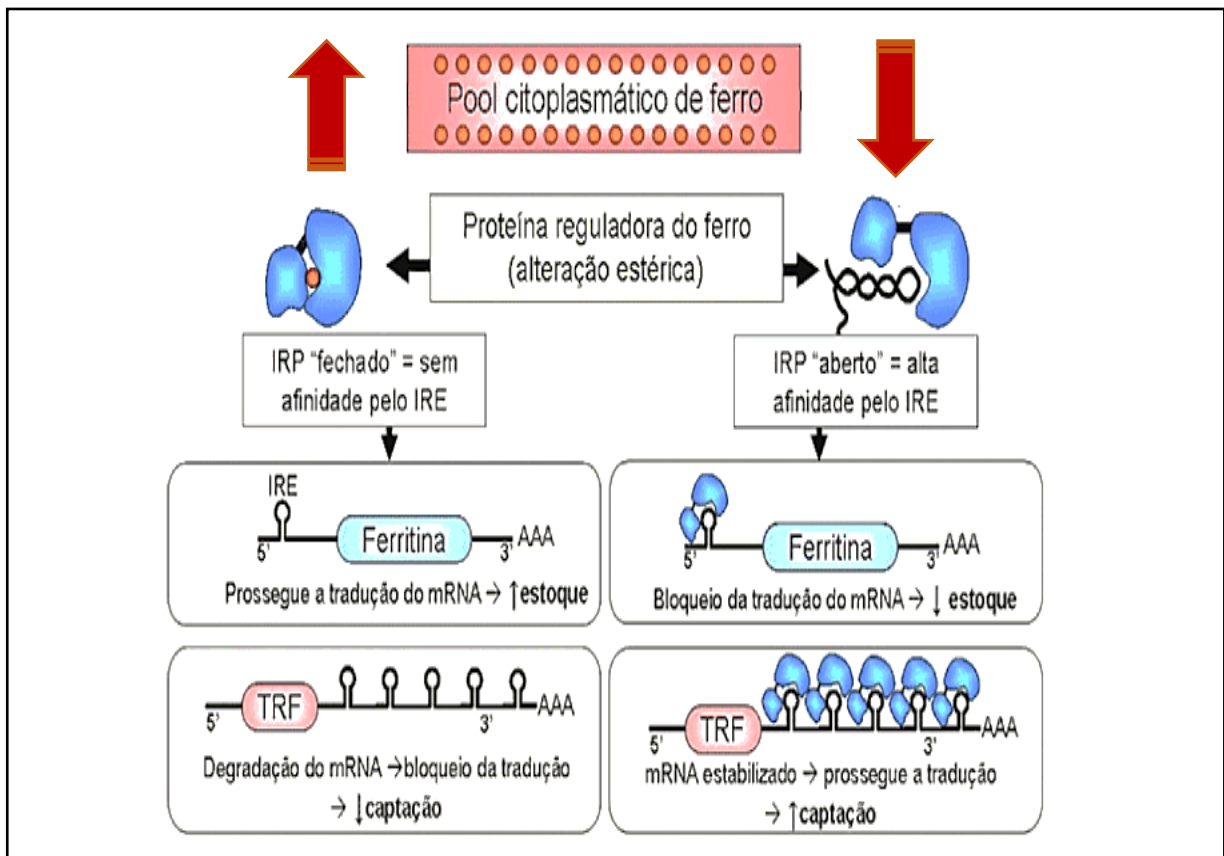
### 2.3.2 Homeostase do ferro

A homeostase do ferro no organismo é regulada por dois mecanismos principais sendo um intracelular e outro sistêmico.

Na regulação intracelular a quantidade de ferro que entra nas células é utilizada para regular o metabolismo pós-transcricional de genes moduladores de proteínas envolvidas no processo de captação e estoque do ferro. Os elementos reguladores de ferro (IRE= *iron regulatory elements*) no RNA mensageiro (RNAm) de receptores das proteínas ferritina e

transferrina, são ativados ou inibidos de acordo com o *pool* citoplasmático de ferro. As proteínas reguladoras do ferro (IRP1 e IRP2) controlam esse processo. A baixa quantidade de ferro disponível provoca ativação das IRP1 e 2, que consequentemente se ligam aos seus respectivos receptores IREs na sequência do RNAm (5' e 3'). Assim, ocorre a redução da codificação da ferritina (estoque do ferro), e ativação para codificação da transferrina (captação e transporte), o que leva ao aumento de sua síntese. O contrário ocorre quando a disponibilidade de ferro é elevada no organismo (Figura 4) (EVSTATIEV; GASCHÉ, 2012).

Figura 4 – Regulação intracelular da expressão de proteínas no metabolismo do ferro.



Fonte: Adaptado de GROTO, 2010. Abreviações: TRF: transferrina; IRE: elementos reguladores ferro; IRP: proteínas reguladoras de ferro.

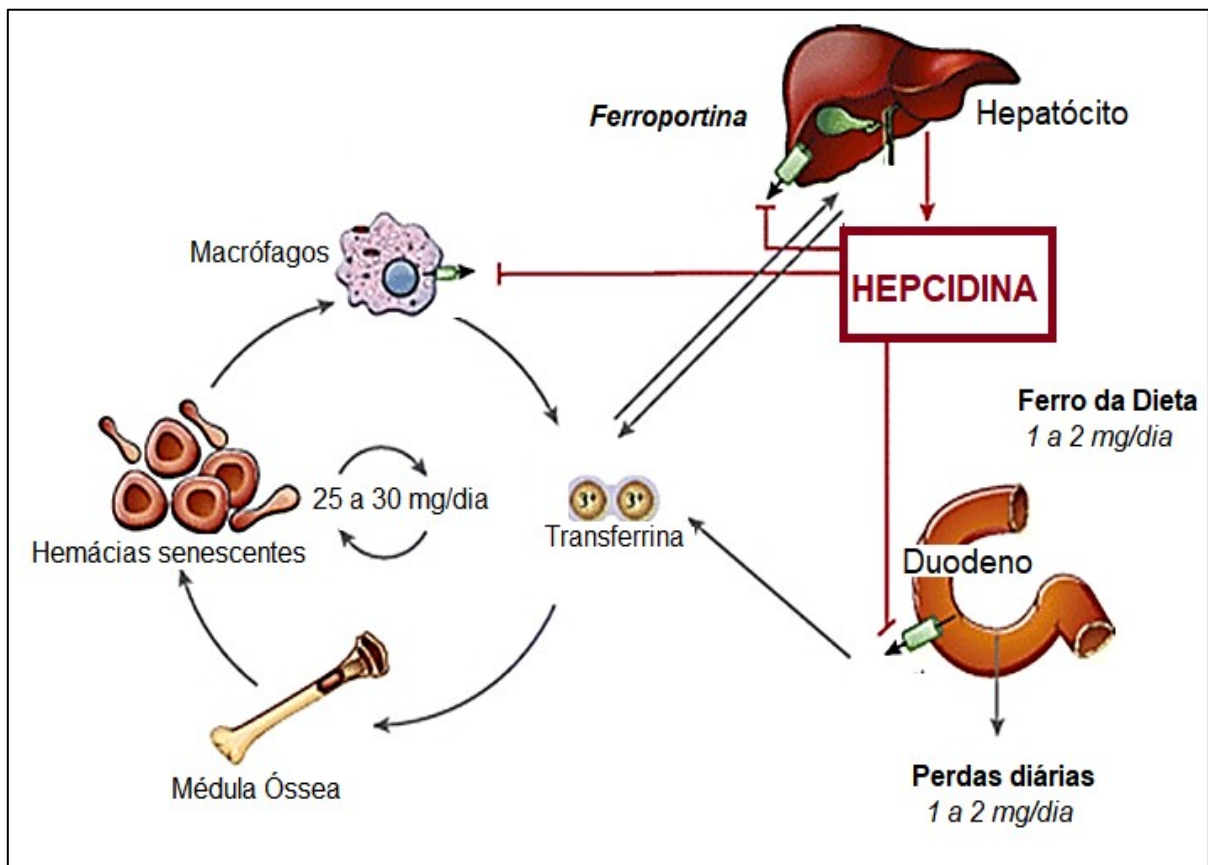
Quanto a regulação sistêmica, o organismo não possui um mecanismo específico para eliminar o ferro absorvido ou armazenado em excesso. Para tanto, se faz necessário uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e armazenamento do ferro e este papel é realizado pelo hormônio hepcidina (RUCHULA; NEMETH, 2014).

Esse hormônio age como um regulador negativo do metabolismo do ferro, e o mecanismo para tal resulta da ligação entre a hepcidina e seu receptor, a molécula da FPN. Após a interação (hepcidina-FPN), ocorre a ubiquitinação da FPN e que é degradada por endocitose, promovendo efetivamente o bloqueio do fluxo de ferro da célula para o plasma (NEMETH et al., 2004).

A FPN é o único exportador do ferro celular proveniente da absorção pela ingestão dietética nos enterócitos, da degradação das hemácias senescentes realizada pelos macrófagos e da mobilização de ferro armazenado no fígado. Portanto a perda de sua função, pela sua degradação, leva a diminuição da concentração plasmática de ferro (Figura 5) (RUCHULA; NEMETH, 2014).

Assim, casos de superexpressão da hepcidina estão relacionados à hipoferremia e o desenvolvimento de anemia. Por outro lado, a deficiência de hepcidina é a causa da sobrecarga de ferro na maioria das hemocromatoses hereditárias e contribui para a sobrecarga de ferro na  $\beta$ -talassemia e outras anemias de carga de ferro. Portanto, a regulação apropriada da hepcidina é essencial para a manutenção da homeostase do ferro (GANZ et al., 2008).

Figura 5- Ação da hepcidina na regulação sistêmica do metabolismo do ferro.



Fonte: Adaptado e traduzido de EVSTATIEV; GASCHÉ, 2012.

### 2.3.3. *Status* de ferro e obesidade

A deficiência de ferro é uma condição na qual a quantidade de ferro corporal é inadequada para manter a função normal dos tecidos corporais. A deficiência se inicia com esgotamento das suas reservas, definido pela baixa concentração de ferritina sérica, seguido pelo transporte de ferro diminuído, caracterizado pelo aumento na capacidade de ligação de ferro e diminuição da concentração de ferro sérico e, finalmente, a depleção de ferro para proteínas e enzimas que contêm ferro, incluindo a hemoglobina, resultando assim em concentrações de hemoglobina abaixo dos valores de referência estabelecidos, ou a anemia ferropriva (TUSSING-HUMPHREYS et al., 2012).

Os primeiros relatos de uma possível conexão entre o *status* de ferro e obesidade surgiram há mais de 40 anos. Em 1962, Wenzel et al. descreveram menores concentrações séricas de ferro em uma coorte de adolescentes obesos, que no ano seguinte também foi identificada por Seltzer e Mayer (WENZEL; STULTS; MAYER, 1962, SELTZER; MAYER, 1963). Posteriormente, vários estudos confirmaram uma relação entre o excesso de peso e baixos níveis de ferro em crianças e adolescentes, adultos e mulheres na pós-menopausa (MOAYERI et al., 2006; AUSK; IOANNOU, 2008; LECUBE et al., 2006).

Para explicar a associação entre o *status* de ferro e a obesidade, vários fatores foram previamente propostos, uma dieta pobre em nutrientes essenciais (vitaminas e minerais) e rica em carboidratos e gorduras tem sido considerada há muito tempo o maior fator causal para essa relação, contudo um estudo que aplicou recordatório alimentar de sete dias não mostrou diferenças na ingestão de ferro heme e não heme ou outros fatores dietéticos que influenciam na absorção de ferro entre indivíduos obesos e não obesos (MENZIE et al, 2008). Mais recentemente esse paradoxo tem sido melhor explicado pela inflamação de baixo grau presente nos indivíduos com obesidade e a relação com a hepcidina, hormônio regulador sistêmico do metabolismo do ferro estimulado pela inflamação (SARAFIDIS et al., 2012; BECKER et al., 2015).

Estudos realizados em crianças e adultos, bem como revisões sistemáticas, têm mostrado que o aumento nas concentrações de hepcidina estão associados com as concentrações aumentadas de citocinas como IL-6 e com as baixas concentrações séricas de ferro (AEBERLI; HURRELL; ZIMMERMANN, 2009; CHENG et al., 2013; CHENG et al., 2012; TUSSING-HUMPHREYS et al., 2012).

#### 2.3.4. *Status* de ferro e microbiota intestinal

A comunidade microbiana utiliza carboidratos complexos e proteínas que não são digeridas e absorvidas pelo intestino delgado para sua proliferação. Uma comunidade equilibrada também depende do fornecimento de micronutrientes para o seu metabolismo e replicação e um dos micronutrientes que a grande maioria das espécies necessita é o ferro (SKRYPNIK; SULIBURSKA, 2018). Apenas um número limitado de bactérias é reconhecido por não depender de ferro para o seu crescimento. O grupo mais conhecido e notável diz respeito a *Lactobacillaceae*, reconhecida por seu efeito benéfico no hospedeiro, porém a bactéria patogênica *Borrelia burgdorferi* também não requer este nutriente para sua proliferação (KORTMAN et al., 2014).

Para impedir o crescimento de invasores patogênicos alguns mecanismos inatos do corpo humano como especiação de ferro, presença potencial de lactoferrina, também conhecida como lactotransferrina, lipocalina-2 (apenas expressa em nível baixo em hospedeiro saudável) e proteínas de defesa limitam a disponibilidade de ferro. Diferentes espécies bacterianas têm seus próprios mecanismos e processos para absorver o ferro em sua forma ferrosa  $Fe^{2+}$  ou férrica  $Fe^{3+}$  (YILMAZ, 2018).

Para adquirir ferro nas condições limitantes criadas pelo hospedeiro, em particular durante uma resposta inflamatória, os patógenos (invasores) podem expressar receptores para transferrina e lactoferrina do hospedeiro, e aumentar a secreção de sideróforos. Esses compostos têm em geral maior afinidade para o ferro férrico e, portanto, competir com o ferro ligado às proteínas hospedeiras. Para ilustrar, a transferrina tem uma constante de afinidade para o ferro férrico de cerca de  $10^{22}$ , enquanto a constante de associação do sideróforo enterobactina para o ferro férrico é  $10^{51}$  (YILMAZ, 2018).

Os sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular geralmente produzidos por bactérias e fungos em resposta a ambientes com baixo teor de  $Fe^{3+}$ . Quando excretados no meio extracelular, quelam ferro com alta afinidade, formando complexos sideróforo-ferro. Estes complexos são captados por receptores específicos presentes na superfície bacteriana. Os complexos são internalizados e quebrados no citoplasma para a liberação do ferro. Algumas bactérias não somente produzem seus próprios sideróforos como também possuem receptores de superfície capazes de capturar sideróforos produzidos por outras bactérias. São as estratégias mais prevalentes de famílias de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas como *Enterobacteriaceae*, *Streptomyetaceae* e *Bacillacea* (PARMANAND et al., 2019).

Em contrapartida, a maior disponibilidade de ferro, advindos da dieta ou administração oral de suplementos, pode resultar em ferro disponível no cólon e é um sinal crítico para a expressão de genes virulentos por patógenos e hospedeiros. Pode promover a replicação e virulência dos patógenos entéricos do intestino, incluindo *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*. Em culturas *in vitro* da microbiota intestinal humana, um aumento no teor de ferro do meio de cultura em quantidades simulando suplementação oral de ferro causa uma diminuição na quantidade de bactérias comensais (KORTMAN et al., 2015). Além do impacto da disponibilidade de ferro para os patógenos, o sequestro de ferro mediado pela hepcidina também influencia a resposta imune do hospedeiro, alterando a produção e a função das citocinas pelos macrófagos. Em geral, a disponibilidade de ferro no intestino pode ter um grande impacto no ciclo de infecção de um patógeno (PAGANINI et al., 2019).

#### 2.4. PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

O número de estudos que investigaram o efeito de dietas na composição e metabolismo da microbiota intestinal de mamíferos aumentou muito nos últimos anos e revelou que a microbiota intestinal é claramente influenciada pela dieta hospedeira (POWER et al., 2014). Atualmente não está bem definido se o tipo de dieta pode contribuir significativamente para a saúde ou doença do hospedeiro via alteração da composição da microbiota intestinal. Neste sentido o uso de suplementação com prebióticos ou simbióticos para modulação da resposta inflamatória de baixo grau em indivíduos com obesidade, pode ser uma possibilidade atraente para manter e/ou regular a permeabilidade intestinal (GÉRARD, 2016).

Prebióticos são ingredientes seletivamente fermentáveis que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios ao hospedeiro (ROBERFROID et al., 2010). Para ser considerado um prebiótico o alimento deve atender alguns requisitos: não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal; ser um substrato seletivo para um pequeno número de bactérias benéficas para o cólon, que são estimuladas a crescer e/ou são metabolicamente ativadas; ser capaz de alterar a flora colônica em favor de uma composição mais saudável; induzir efeitos locais ou sistêmicos que são benéficos à saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Dentre a várias substâncias consideradas prebióticas, apenas os frutanos do tipo inulina (FOS, oligofrutose e inulina) e galacto-oligossacarídeos (GOS) cumprem os requisitos citados acima (BINDELS et al., 2015).

Os frutanos do tipo inulina são formados por ligações glicosídicas  $\beta$ -2-1 entre uma molécula de glicose e duas ou mais de frutose, conhecida como grau de polimerização. São denominados inulina quando o grau de polimerização vai de nove a sessenta monômeros de frutose, oligofrutose com até oito monômeros de frutose e FOS quando o grau de polimerização se encontra entre dois a quatro monômeros de frutose (ROBERFROID, 2007).

O FOS é encontrado naturalmente em alimentos de origem vegetal como aspargos, cebola, alcachofra, chicória e batata yacon (PEREZ-CORNAGO, 2015). As suas ligações glicosídicas  $\beta$ -2-1 não sofrem hidrólise pela ação das enzimas digestivas na parte superior do trato gastrointestinal. Assim, quando chegam ao colón são parcialmente ou totalmente fermentados pela microbiota intestinal, principalmente pelas bifidobactérias e assim apresentam como produtos finais da fermentação, ácidos orgânicos (lactato e piruvato), AGCC (acetato, propionato e butirato) e gases (ROBERFROID, 2010). A fermentação acidifica o colón e conseqüentemente diminui o seu pH, e isso favorece o desenvolvimento de bactérias potencialmente anti-inflamatórias, como as bifidobactérias e os lactobacilos e ainda evita o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas (SABATER-MOLINA et al., 2009).

Esses compostos, em modelos animais, têm promovido mudanças na atividade e composição da microbiota intestinal, estando associados a diminuição do apetite (CANI et al., 2005), e do peso e melhora do metabolismo da glicose (EVERARD A. et al., 2013).

A utilização de simbióticos é outra abordagem que vem sendo utilizada para modular a microbiota intestinal. Os simbióticos são produtos que contêm em sua composição prebióticos e probióticos, os quais são micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (GUARNER et al., 2012). Assim como os prebióticos, os probióticos devem apresentar algumas características para serem considerados como tais, como: tolerância a secreções gastrointestinais (ácido gástrico e bile); capacidade de aderir à mucosa gastrointestinal; e a inibição competitiva de organismos patogênicos. E ainda, para ser considerado um probiótico eficiente deve responder alguns critérios como: demonstrar efeito benéfico para o hospedeiro; ser não patogênico, não tóxico e livre de significativos efeitos adversos; ser capaz de sobreviver ao longo do trato gastrointestinal; conter adequado número de células viáveis para conferir benefícios à saúde; ser compatível com a matriz do produto, com as condições de processamento e armazenamento para manter as propriedades desejadas e rotulados com precisão (FONTANA et al., 2013).

Os benefícios que esses micro-organismos podem trazer ao hospedeiro incluem entre outros o antagonismo à adesão de germes patogênicos, o estímulo da barreira inata, a redução da inflamação induzida por patógenos, o aumento da função da barreira e a sobrevivência do epitélio



intestinal. Os lactobacilos e bifidobactérias são os gêneros dos probióticos mais estudados e seus benefícios são específicos para cada cepa, e decorrentes das dosagens, da administração e das mesclas utilizadas. Os probióticos são veiculados principalmente em laticínios, vegetais em conserva e suplementos nutricionais (HARDY et al., 2013).

Apesar da literatura não dispor de estudos que avaliassem o efeito da suplementação de prebiótico ou simbiótico nas parâmetros do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida (FERNANDES et al., 2016). Alguns estudos investigaram o efeito da deficiência e da suplementação de ferro na microbiota intestinal humana, principalmente focados no microbioma infantil. Um dos estudos mais antigos, em 1985, mostrou que as crianças que receberam uma preparação de leite de vaca fortificada com ferro tinham *Bifidobacterium* mais baixas, porém contagens mais elevadas de *Bacteroides* e *E. coli* do que as crianças que recebiam uma preparação não fortificada de leite de vaca (MEVISSSEN-VERHAGE et al., 1985). Outro estudo sobre o consumo prolongado de biscoitos com ferro suplementado por crianças da Costa do Marfim demonstrou uma alta proporção de família de *Enterobacteriaceae* fecal e uma baixa proporção de *Lactobacillus*, em comparação com um grupo controle que recebeu biscoitos não suplementados (ZIMMERMANN et al., 2010). Além disso, a deficiência de ferro em mulheres indianas jovens foi associada com baixos níveis de *Lactobacillus acidophilus* no intestino (BALAMURUGAN et al., 2010).

Já um estudo, realizado em roedores *germ-free*, demonstrou que a ausência de bactérias intestinais leva a déficits de Fe nos enterócitos (DESCHEMIN; NOORDINE; REMOT, 2019). Um estudo *in vitro* avaliou o impacto da deficiência e aumento da disponibilidade de Fe, através da fermentação colônica da microbiota fecal humana, e demonstrou que durante condições muito baixas de Fe, *Roseburia*, *Eubacterium ectale*, membros *Clostridium Cluster IV* e *Bacteroides* foram diminuídos, enquanto membros da família *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* foram aumentados, consistente com uma diminuição de AGCC, nomeadamente butirato e propionato (DOSTAL et al., 2013).

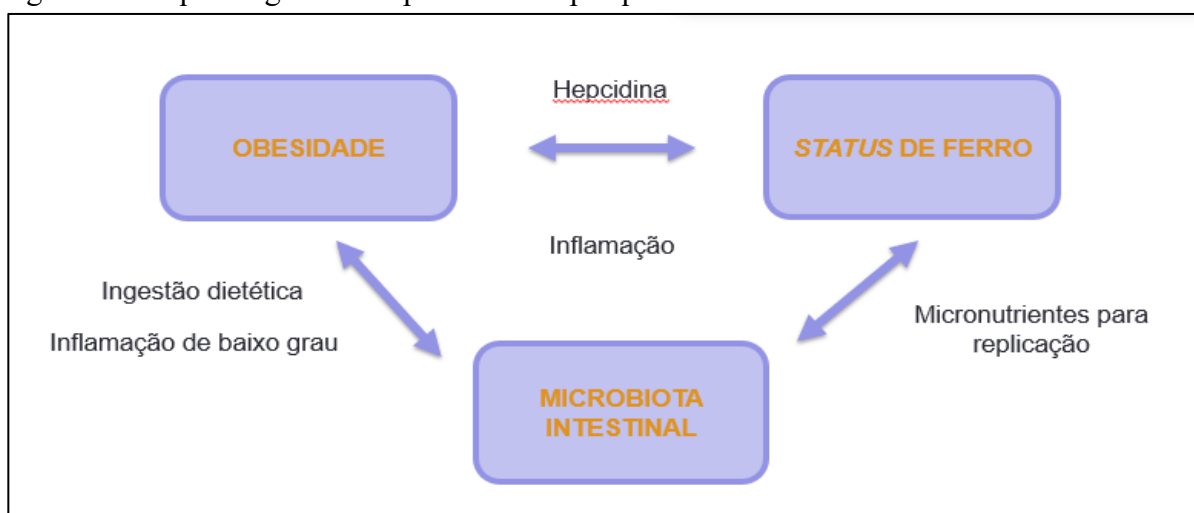
Em modelos experimentais a suplementação com prebiótico ou probiótico tem se mostrado benéfica para eliminar o dano potencial da fortificação de ferro na saúde intestinal ou aumentar a absorção desse mineral (LIN et al, 2018). Em culturas *in vitro*, a presença de *Lactobacillus fermentum* na microbiota intestinal, devido ao ácido p-hidroxifenilático, mostrou uma atividade de redução de Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup>, facilitando a absorção deste pelos enterócitos (GONZALEZ et al., 2017). Em um estudo realizado em animais com nove cepas bacterianas (*Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *B. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. salivarius*, *Lactococcus lactis* e *Lc.actis* ) em proporções iguais, na dose de 2,5 ×

10<sup>9</sup> UFC, encontrou valores de ferro sérico menores e maiores valores de capacidade total de ligação de ferro nos grupos que receberam suplementação (SKRYPNIK et al., 2019). Em humanos, um estudo realizado em mulheres saudáveis, os níveis de absorção de Fe não-heme foram aumentados na presença da cepa *Lactobacillus plantarum*, quando comparado ao grupo controle (HOPPE et al., 2015).

### 3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Há uma lacuna do conhecimento teórico sobre o efeito de prebiótico e simbiótico na modulação da microbiota intestinal, considerando o potencial anti-inflamatório destes produtos alimentares e seu possível efeito nos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro. O ferro é um importante mineral para a proliferação de bactérias potencialmente patogênicas que podem acentuar as alterações presentes na microbiota intestinal desses indivíduos. Mudanças dependentes de ferro na microbiota intestinal poderiam ter um impacto na saúde e na resposta imune da mucosa, que precisam ser investigadas com uma perspectiva maior (Figura 6).

Figura 6 – Esquema gráfico do problema de pesquisa.



Fonte: Autora.

## 4. OBJETIVOS

### 4.3. GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de prebiótico ou simbiótico nos marcadores do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida.

### 4.4. ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro: ferro sérico, ferritina, transferrina, saturação de transferrina, índices hematimétricos, vitamina B12 e ácido fólico antes e após a suplementação com prebiótico ou simbiótico nos grupos estudados;
- Avaliar as concentrações dos marcadores inflamatórios IL-6 e Proteína C-reativa (PCR) antes e após a suplementação com prebiótico ou simbiótico nos grupos estudados;
- Avaliar indicadores antropométricos do estado nutricional: peso, altura, índice de massa corporal antes e após a suplementação com prebiótico ou simbiótico nos grupos estudados;
- Estimar a ingestão dietética usual quanto a: energia, carboidratos, lipídios, proteína total, fibra total, fibras, C, B<sub>12</sub>, ácido fólico, ferro heme e não heme.

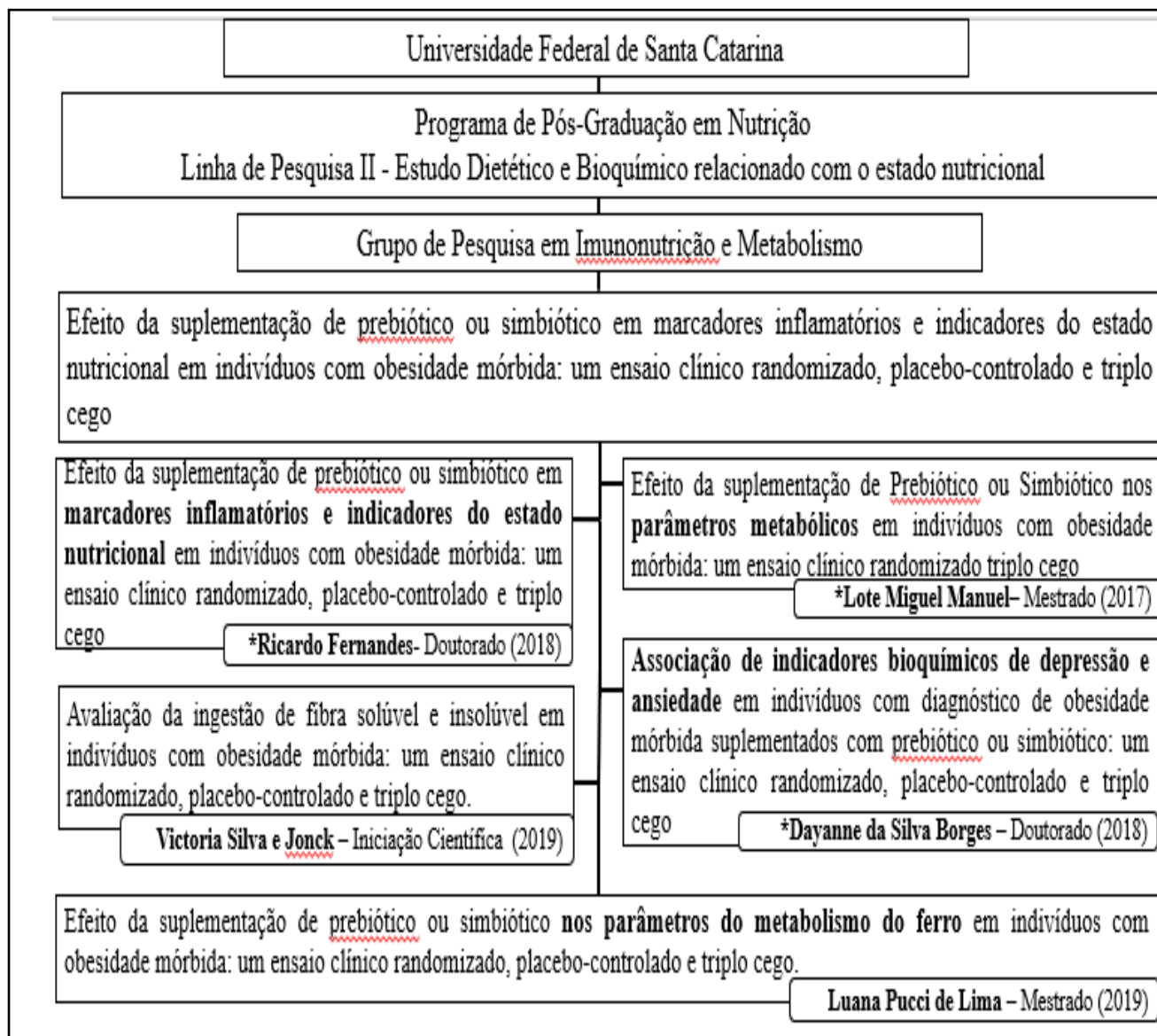
## 5. MÉTODOS

### 5.3. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, placebo-controlado, triplo cego, realizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), Florianópolis, SC.

O presente projeto de pesquisa está inserido em um projeto temático do Grupo de Pesquisa em Imunonutrição e Metabolismo (GpIM), vinculado à linha de pesquisa II (Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional) do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFSC, sob supervisão do Professor Dr Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade, intitulado: *Efeito da suplementação de prebiótico ou simbiótico em marcadores inflamatórios e indicadores do estado nutricional em indivíduos com obesidade mórbida: um ensaio clínico randomizado, placebo-controlado e triplo cego* (Figura 7).

Figura 07 – Fluxograma de inserção do projeto de pesquisa.



Fonte: Autora

#### 5.4. ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLA CEGO

##### 5.4.1 População e amostra do estudo

A população do estudo foi constituída por todos os indivíduos acompanhados no ambulatório de Obesidade e Cirurgia Bariátrica no Serviço de Endocrinologia do HU/UFSC e a amostra do estudo foi representada por indivíduos adultos com obesidade mórbida encaminhados para primeira consulta neste ambulatório no período de janeiro de 2016 a fevereiro de 2018.

Os critérios de inclusão do projeto temático foram: indivíduos adultos (18-60 anos) de ambos os sexos com índice de massa corporal (IMC)  $\geq 40\text{kg/m}^2$ . Foram excluídos os indivíduos com: doenças gastrointestinais prévias (câncer gastrointestinal e doenças inflamatórias intestinais); intolerâncias e/ou alergias alimentares (intolerância à lactose e doença celíaca); dependência alcoólica e/ou de drogas ilícitas; uso de fármacos anti-inflamatórios e/ou antibióticos e/ou imunossupressores até três meses antes; uso regular de laxativos, analgésicos narcóticos opióides e inibidores de apetite; uso atual ou prévio de suplementação (até um mês) de prebióticos, probióticos, simbióticos ou produtos enriquecidos com estes ingredientes; seguimento de uma dieta para perda ou ganho de peso nos últimos três meses; grávidas ou lactantes; seguimento atual de dietas não usuais (vegetariana, macrobiótica, paleolítico) e fumantes. Neste estudo não foram incluídos os indivíduos que seguem dietas não usuais, apresentam intolerâncias e/ou alergias alimentares ou fazem uso de fármacos, pois são fatores confundidores ou modificadores de efeito neste tipo de intervenção, já que podem alterar diretamente a microbiota, o sistema imunológico e o apetite.

Os pesquisadores e colaboradores realizaram a triagem dos indivíduos que estavam em sua primeira consulta no ambulatório de Obesidade e Cirurgia Bariátrica. Para os indivíduos aptos, foi apresentada a proposta de pesquisa e feito o convite para participação. Nesse momento, após a leitura em conjunto, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado para o início do protocolo do estudo (Apêndice B).

Caso os indivíduos não estivessem em jejum e atendessem aos critérios de inclusão foram convidados a retornar em outro momento.

#### *5.4.4.1. Cálculo do tamanho amostral*

O tamanho da amostra deste estudo, teve como base a amostra obtida pelo projeto temático, porém optou-se por realizar o cálculo do tamanho amostral para verificar o número de indivíduos que seriam necessários para atingir um poder de estudo 80% e um intervalo de confiança de 95%. Para tanto, optou-se por utilizar a IL-6 como parâmetro para este cálculo, dada sua importância na relação a inflamação em obesidade e conexão com os outros parâmetros avaliados. Ainda é importante salientar, que o estudo com a IL-6 utilizado para o cálculo, foi realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica no próprio HU/UFSC.

Para o cálculo do tamanho da amostra considerou-se: a) dados do estudo realizado em 2013 e 2014 que avaliou como desfecho primário, dentre outros parâmetros, a IL-6;

(FERNANDES et al., 2016); b) poder do estudo de 80%; c) intervalo de confiança de 95%; d) acréscimo de 10% referentes a possíveis perdas de seguimento; e e) cálculos executados no software online OpenEpi<sup>®</sup>. Os resultados obtidos indicaram um tamanho amostral mínimo de 56 indivíduos.

#### 5.4.2 Características das intervenções

Neste estudo os suplementos e o placebo utilizados foram doados pela empresa Invictus Farmanutrição<sup>®</sup>, sem nenhum conflito de interesse com os pesquisadores. Os suplementos estão registrados na Agência Nacional da Vigilância Sanitária na categoria de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde (BRASIL, 2012, 2013a).

Os suplementos prebiótico (FiberFOS<sup>®</sup> - Invictus FarmaNutrição, Grupo FQM, Rio de Janeiro, Brasil) e simbiótico (Simbioflora<sup>®</sup>- Invictus FarmaNutrição, Grupo FQM, Rio de Janeiro, Brasil), apresentam as seguintes informações nutricionais e de composição:

Quadro 4 - Informações da composição Placebo, FiberFOS<sup>®</sup> e Simbioflora<sup>®</sup>

<b>Intervenções</b>	<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>
Placebo – 2 sachês	Maltodextrina	11 gramas
FiberFOS <sup>®</sup> - 2 sachês	Fruto-oligossacarídeos	11 gramas
Simbioflora <sup>®</sup> - 2 sachês	<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC-37	2x10 <sup>9</sup> UFC
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	2x10 <sup>9</sup> UFC
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	2x10 <sup>9</sup> UFC
	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	2x10 <sup>9</sup> UFC
	Fruto-oligossacarídeos (FOS)	11 gramas

Registro no Ministério da Saúde: FiberFOS<sup>®</sup> - 6.6637.0006 e Simbioflora<sup>®</sup>-6.6637.0001.

Fonte: Invictus, 2015a.



Quadro 5 - Informações nutricionais Placebo, FiberFOS® e Simbioflora®

	Placebo		FiberFOS® - 2 sachês		Simbioflora® - 2 sachês	
	Quantidade por porção	VD*	Quantidade por porção	VD*	Quantidade por porção	VD*
Porção de 11 g						
Valor Energético	48 kcal	2,4%	19 kcal ou 40 kJ	1%	19 kcal ou 40 kJ	1%
Carboidratos	12 g	4%	0,6 g	0,2%	0,6 g	0,2%
Proteínas	0 g	0%	0 g	0%	0 g	0%
Gorduras Totais	0 g	0%	0 g	0%	0 g	0%
Gorduras Saturadas	0 g	0%	0 g	0%	0 g	0%
Gorduras Trans	0 g	0%	0 g	0%	0 g	0%
Fibra Alimentar (Fruto-oligossacarídeos)	0 g	0%	11 g	44%	11 g	44%
Sódio	0 mg	0%	0 mg	0%	0 mg	0%
*% Valores Diários com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. **VD não estabelecida.						

Registro no Ministério da Saúde: FiberFOS® - 6.6637.0006 e Simbioflora®-6.6637.0001.

Fonte: Invictus, 2015a.

A definição do tempo e a dose das intervenções para o projeto temático foram baseadas em revisões sistemáticas e estudos desenvolvidos pelo GpIM que verificaram que o início do efeito da suplementação se dava após 15 dias e que a média de 11g/dia já se observava efeito sobre os desfechos avaliados (FERNANDES et al., 2016; FERNANDES et al., 2017).

#### 5.4.3. Desfechos

Os desfechos primários foram as alterações dos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro (ferro sérico, transferrina, saturação de transferrina, ferritina, índices hematimétricos, ácido fólico e vitamina B12) e os secundários foram as alterações da ingestão dietética quanto a: ferro total, heme e não heme, vitamina B12, ácido fólico. Ainda foram

utilizados como subsídios os desfechos primários utilizados em trabalhos anteriores de marcadores inflamatórios (IL-6 e PCR), parâmetros clínicos, alterações dos indicadores antropométricos do estado nutricional e estimativa da ingestão dietética quanto à: energia, carboidratos, proteínas e lipídeos.

#### **5.4.4 Protocolo do estudo**

##### *5.4.4.1 Momentos do estudo*

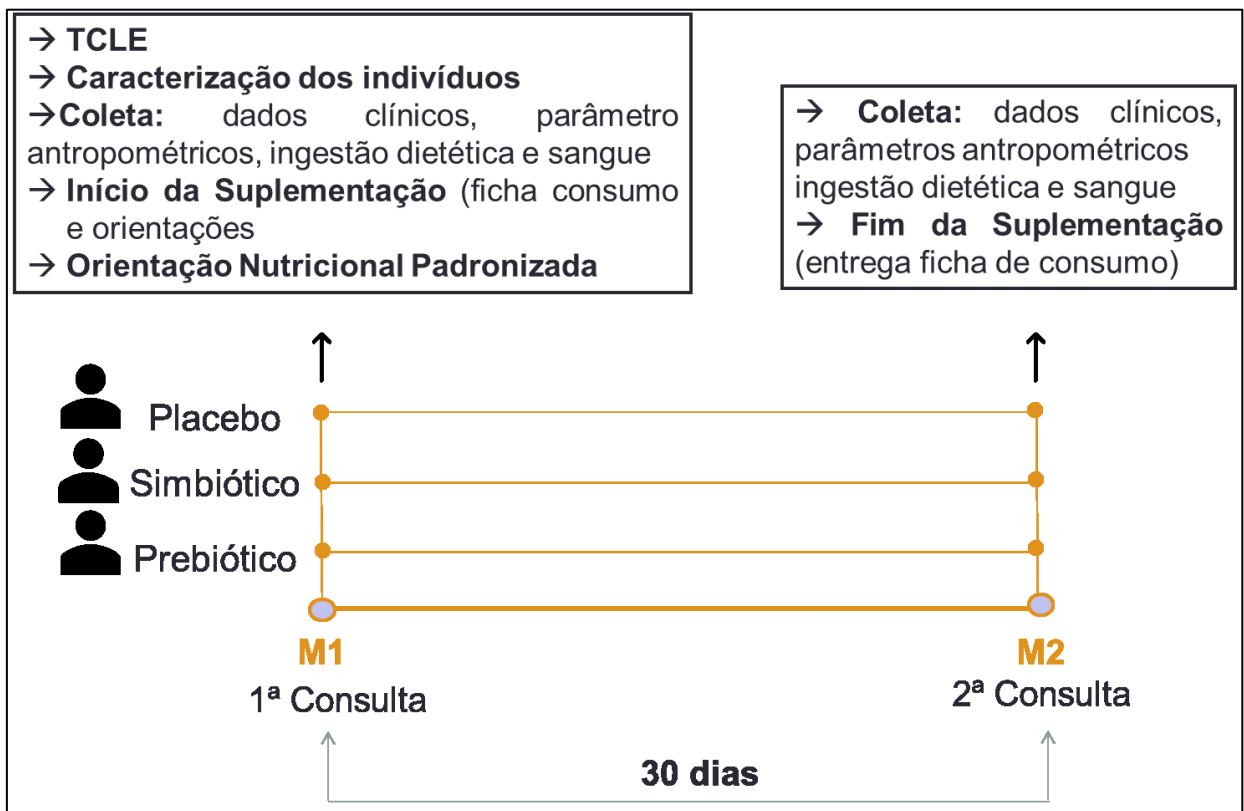
Os indivíduos que aceitaram participar do estudo foram distribuídos em três grupos: G1 – grupo controle que recebeu placebo, G2 – grupo que recebeu prebiótico e G3 – grupo que recebeu simbiótico. O estudo decorreu em dois momentos experimentais:

- Momento 1 (M<sub>1</sub>) - primeira consulta ambulatorial onde ocorreu a caracterização dos indivíduos (Apêndice C), início da suplementação com prebiótico, simbiótico ou placebo, entrega da ficha de frequência de consumo dos suplementos (Apêndice F), orientações do que evitar durante o período de suplementação (Apêndice A) e orientações nutricionais padronizadas para todos os participantes (Apêndice G);
- Momento 2 (M<sub>2</sub>) – momento após trinta dias da primeira consulta ambulatorial, término da suplementação com prebiótico, simbiótico ou placebo e entrega dos participantes da ficha de frequência de consumo.

Nos momentos propostos nesse estudo foram realizadas a coleta de sangue para avaliação de indicadores bioquímicos e antropométricos do estado nutricional (Apêndice D) e coleta de dados clínicos (Apêndice E), conforme figura 11.

Os pesquisadores e colaboradores mantiveram contato presencial com os indivíduos que estavam em análise (quando eles se dirigiram ao HU/UFSC) ou via ligação telefônica uma vez por semana, visando o registro da adesão ao tratamento e suporte assistencial adequado, se necessário.

Figura 08 - Delineamento do estudo com os momentos experimentais.



Fonte: Autora.

#### 5.4.4.2 Randomização e cegamento

Os participantes foram distribuídos aleatoriamente a um dos grupos de tratamento, por meio de uma lista de randomização gerada por um programa de computador, consistindo em blocos permutados de forma aleatória com três pacientes cada. Posteriormente os grupos de tratamento foram substituídos por códigos numéricos aleatórios com três dígitos também gerados por um programa de computador, para garantir a ocultação da alocação. Esta etapa foi realizada por um pesquisador não envolvido com a pesquisa. O pesquisador que recrutou e acompanhou os participantes teve acesso apenas a lista contendo os blocos e os códigos numéricos de randomização. Os participantes do estudo e os pesquisadores foram mascarados, em relação ao consumo e a distribuição da suplementação. Os suplementos e o placebo foram pré-embalados em sachês opacos e fechados pelo fornecedor com os códigos de randomização, sendo idênticos em aparência física, sabor e cor. Os códigos de identificação dos suplementos só serão revelados pela empresa fornecedora após a análise estatística dos dados do estudo, caracterizando o estudo como triplo cego.

### 5.4.4.3 *Instrumentos e técnicas de coleta de dado*

#### 5.4.4.3.1. *Caracterização dos indivíduos*

Os participantes do estudo foram caracterizados no momento basal por meio de dados pessoais e clínicos (Apêndices C e E). Estas informações foram coletadas diretamente com o paciente e/ou no prontuário do mesmo no HU/UFSC mediante autorização dos mesmos.

Foram coletadas informações de: sexo, idade, peso, altura, IMC, comorbidades e fármacos utilizados dos indivíduos elegíveis, dos que se recusaram participar do estudo ou que por algum motivo, abandonaram o estudo, visando a validade externa dos resultados.

#### 5.4.4.3.2. *Coleta e preparo do material biológico*

O sangue venoso periférico foi coletado de todos os indivíduos participantes do estudo após concordância e assinatura do TCLE (Apêndice B).

Após um jejum prévio de 8 a 10 horas, um total de 20 mL de sangue foi coletado em cada momento do estudo (totalizando 40 mL nos dois momentos) por profissional capacitado de acordo com técnica padronizada (WHO, 2010) na região cubital do antebraço. Foram utilizados tubos contendo heparina (sistema Vacutainer<sup>®</sup> BD Biosciences - Abingdon, UK) ou gel separador (sistema Vacutainer<sup>®</sup> BD Biosciences - Abingdon, UK).

Ressalta-se que com exceção da citocina IL-6, os outros parâmetros fazem parte do protocolo de assistência dos indivíduos do ambulatório de Obesidade e Cirurgia Bariátrica do Serviço de Endocrinologia do HU/UFSC, sendo analisados por este hospital, assim, estes dados foram coletados do prontuário do paciente. Os tubos com heparina onde foram coletadas as amostras de sangue para avaliação da citocina IL-6 e da hepcidina e foram fornecidos pelos pesquisadores, sem ônus ao HU/UFSC.

O tubo de sangue com heparina foi acondicionado em caixa térmica e transportado até o Laboratório de Investigação em Doenças Crônicas do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC para preparação e armazenamento do plasma. As amostras foram centrifugadas no próprio tubo de coleta a 2500 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 4°C para separação do plasma. Alíquotas de 500 µL foram transferidas para quatro criotubos com capacidade de 2 mL cada, devidamente identificados e armazenados a -80°C. Ao final do estudo, foi realizada a determinação de citocinas plasmáticas (IL-6) no Laboratório de Pesquisa em Imunologia do Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

O tubo de sangue com gel separador ficou retido no laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. O sangue foi deixado em repouso por 10 minutos até completa coagulação. Em seguida, foi centrifugado por um período de cinco minutos a 2500 rpm para a separação do soro. Os parâmetros foram determinados conforme quadro 6.

*Quadro 6 - Determinação dos parâmetros do metabolismo do ferro e marcadores inflamatórios.*

<b>Parâmetro</b>	<b>Medida</b>	<b>Referência*</b>	<b>Método - Equipamento</b>
*Ferro sérico	mg/dL	M: 50 – 170 H: 65 - 175	Ferene (IMMULITE 2000 Siemens®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA)
*CLFT	µg/dL	250 - 450	
*CLFL	µg/dL	110 - 370	Fórmula: CLFT – ferro
*Transferrina	mg/dL	160 - 356	Fórmula: CLFT x 100 /918) -63
*Saturação de Transferrina	%	20 a 50	Fórmula: Ferro x 100 / CLFT
*Ferritina	ng/mL	M: 22 – 322 H: 10 - 291	Quimioluminescência por Micropartículas (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA)
*Vitamina B12	pg/mL	211 - 911	
*Ácido fólico	ng/mL	Normal: >5,38 Deficiente: 0,35 a 3,37	
*Hemoglobina	g/dL	M: 11,5 – 16,5 H:13,2 – 18,0	Lauril sulfato de sódio livre de cianeto (SYSMEX XE-2100)
*Hematócrito	%	M: 36,0 – 48,0 H: 39,0 – 51,0	Deteção individual do volume de cada eritrócito pelo método impedância e foco hidrodinâmico (SYSMEX XE-2100)
*VCM	u2 fl	80 a 100	Fórmula: hematócrito x 10 / hemácias (em milhões)
*HCM	pg	27,3 a 32,6	Fórmula: hemoglobina (g/dL) x 10 /hemácias (em milhões)
*CHCM	g/dL	31,6 a 34,9	Fórmula: hemoglobina x100/ hematócrito.
*PCR	mg/L	Até 3,0	Turbidimetria (Dimension RXL)
Citocina IL-6	pg/mL	-	Kit Elisa (BD OptEIATM®, BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA)

Fonte: Autora. Abreviações: VCM: Volume Corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; PCR: proteína C reativa. IL-6: interleucina 6; H: homem; M: mulher Legenda: \*(dosagem e valores de referência do HU/UFSC).

#### 5.4.4.3.3. Determinação de indicadores antropométricos do estado nutricional

Para a avaliação do estado nutricional foram realizadas aferições antropométricas de peso e estatura pelos pesquisadores nos dois momentos do estudo, seguindo técnicas propostas pela *World Health Organization* (WHO, 1995).

O peso foi mensurado utilizando uma balança eletrônica (Welmy<sup>®</sup>, Santa Bárbara do Oeste, SP), com capacidade de 300 kg e precisão de 50 g. Os indivíduos foram pesados com o mínimo de indumentária, descalços, na posição ereta no centro da plataforma da balança e com os braços soltos ao longo do tronco (WHO, 1995) e a estatura foi medida por estadiômetro acoplado à plataforma com capacidade de 2,00 m e precisão de 0,5 cm. Aferida com o indivíduo descalço ou com meias finas. Os participantes ficaram sobre uma superfície plana, com o peso distribuído uniformemente em ambos os pés em posição ereta, braços pendentes ao lado do corpo, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a escala de medida. A posição da cabeça foi orientada de modo que a linha de visão permaneça perpendicular ao corpo e paralela ao solo. Os indivíduos foram orientados a inspirar profundamente e manter-se numa posição totalmente ereta. A referência para a mensuração foi o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo (WHO, 1995).

A classificação do estado nutricional foi realizada pelo IMC utilizando-se os pontos de corte definidos pela *World Health Organization* (2000), conforme descrito no quadro 7. O IMC é definido como uma relação do peso em quilogramas com o valor da estatura em metros ao quadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (WHO, 1995).

Quadro 7 - Classificação do estado nutricional segundo o Índice de Massa Corporal.

<b>Classificação</b>	<b>Índice de Massa Corporal (<math>\text{kg}/\text{m}^2</math>)</b>
Eutrofia	18,50-24,99
Pré-obesidade	25,00-29,99
Obesidade grau I	30,00-34,99
Obesidade grau II	35,00-39,99
Obesidade grau III	$\geq 40,00$

Fonte: WHO (2000).

#### 5.4.4.3.4. Estimativa da ingestão dietética atual

##### Técnica para coleta da ingestão dietética atual

Para estimativa do consumo dietético atual dos indivíduos foram aplicados dois recordatórios de 24 horas (um em cada momento do estudo). Seguindo a técnica dos múltiplos passos, onde os indivíduos foram encorajados a relatar, com o máximo de detalhes (tipo, forma de preparo, ingredientes, quantidades em medidas caseiras), todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, em cada refeição. Ao final da entrevista, o pesquisador procedeu com a revisão dos alimentos e das quantidades relatadas e registradas com o entrevistado (CONWAY; INGWERSEN; MOSHFEGH, 2004).

##### Técnica para análise da ingestão dietética atual

Para estimativa do quantitativo de energia e nutrientes da ingestão alimentar dos participantes do estudo, seguiu-se uma padronização adaptada da proposta do Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais (FISBERG; MARCHIONI, 2012).

Inicialmente todos os alimentos, bebidas e preparações relatados pelos indivíduos nos R24h foram listados e seus respectivos valores de energia e nutrientes (carboidratos, proteínas, gorduras: totais, saturadas, monoinsaturadas, poli-insaturadas, fibra alimentar, ferro, ácido fólico, vitamina D, C e B12) foram determinados com base nos valores apresentados na Tabela de composição de alimentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*, 2018) e da Tabela Brasileira de Composição Brasileira da USP (TBCA, 2017). Na ausência dos itens alimentares nas tabelas de dados citadas, para determinação dos valores de energia e nutrientes procedeu-se a elaboração de fichas técnicas de preparações (FTP) ou consulta em rótulos de embalagens.

Ainda, para maior fidedignidade do consumo relatado, foram elaboradas FTP para as preparações alimentares que estavam disponíveis nas bases de dados consultadas, mas que não consideraram em sua descrição o uso de sal ou óleo de adição. As quantidades adicionadas destes ingredientes nas FTP foram calculadas de acordo com o grupo alimentar e técnica de preparo e de acordo com as recomendações preconizadas pela literatura (DOMENE, 2014).

Posteriormente, as medidas caseiras foram padronizadas e transformadas em gramas/mililitros de alimentos/bebidas tendo como referência os valores disponíveis nas tabelas de equivalências de Pinheiro et al. (2002) e Fisberg et al. (2002). Todas as etapas descritas foram realizadas em planilhas do software Office Excel®, versão 2016.

Após a conclusão da entrada de dados dos relatos de consumo para cada momento do



estudo, realizou-se uma análise de consistência das informações digitadas e a presença de valores extremos de ingestão diária (<500 ou > 4000 kcal). O que permitiu verificar possíveis erros de digitação ou a ocorrência de sub ou super-relatos da ingestão diária relatada pelos indivíduos. A partir destes dados ainda serão determinadas as estimativas de ingestão de ferro heme e não heme, bem como as proteínas provenientes de fontes animais e vegetais.

Foram calculadas as médias de consumo de energia e nutrientes, em seguida, será realizado o ajuste para a variabilidade interindividual utilizando a estimativa das médias quadráticas. Para obter esses componentes é necessário utilizar a análise de variância (ANOVA). A partir destes dados pode-se calcular a variância total e, posteriormente, a média e o desvio padrão ajustados (IOM, 2001).

Posteriormente ao ajuste para variabilidade interpessoal foi realizado ajuste para calorias pelo método dos resíduos a fim de corrigir as estimativas de nutrientes pela ingestão de energia total, conforme metodologia descrita por Willett, Howe e Kushi (1997).

#### *5.4.4.3.5. Parâmetros clínicos*

Parâmetros clínicos como fármacos utilizados, alterações gastrointestinais, presença de constipação, consistência e formato das fezes, uso de suplementos vitamínicos e minerais e características sobre o período menstrual foram verificados (Apêndice E). Para a determinação da presença de constipação foram utilizados os critérios diagnósticos do ROMA III (DROSSMAN et al., 2006), um sistema internacional desenvolvido para classificar distúrbios gastrointestinais funcionais. Para a determinação da consistência e do formato das fezes foram utilizados os critérios da Escala Fecal de Bristol (LEWIS; HEATON, 1997), a qual classifica a forma e a consistência das fezes humanas em sete categorias. Pacientes que foram acometidos por infecções ao longo do estudo ou que ficarem por dois dias ou mais sem consumir o suplemento foram descontinuados do estudo.

## 5.5. PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os indivíduos convidados a participar do estudo receberam todas as explicações necessárias para o entendimento do protocolo experimental, assim como dos riscos e possíveis benefícios. Quando concordaram em participar, foi realizada a leitura do Termo de

consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice B) e sanadas dúvidas, que existiam. Em seguida, o TCLE foi assinado pelo participante.

Destaca-se que nenhum indivíduo foi obrigado a participar do estudo, assim como, pode se retirar do mesmo a qualquer momento. Além disso, todas as informações coletadas são sigilosas, mas foram disponíveis para o participante, caso haja interesse do mesmo. Os formulários preenchidos com as informações coletadas dos participantes ficarão de posse do coordenador deste estudo, Prof. Dr. Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade, armazenados em arquivo pessoal, localizado na sala 214, Bloco A, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

O protocolo deste estudo seguiu os preceitos estabelecidos na declaração de Helsinki (RICKHAM, 1964) e na Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 2012 (BRASIL, 2013b).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC sob parecer número 1.340.253 (Anexo B) e pela plataforma de registro de ensaios clínicos *ClinicalTrials.gov* (<http://www.clinicaltrials.gov/>) sob o identificador NCT02660333 (Anexo C). Ressalta-se que houve a inclusão da dosagem das concentrações séricas de hepcidina no registro.

## 5.5. RISCOS

Os riscos para os participantes que aceitaram participar desta pesquisa estão relacionados efeitos adversos da suplementação e o acesso venoso para coleta de material biológico. Porém, de acordo com revisões sistemáticas da literatura realizadas pelo nosso grupo de pesquisa sobre os efeitos de prebióticos ou simbióticos em parâmetros metabólicos e marcadores inflamatórios, não houve desistência dos participantes nos estudos que relataram a ocorrência de reações adversas, independentemente da dose (1,08 a 21 g/dia) ou tempo de suplementação (28 a 198 dias). Essas reações foram: flatulência, diarreia, constipação, inchaço e dor abdominal e foram relatadas apenas nos primeiros dias e de baixa intensidade (BESERRA et al., 2015; FERNANDES et al., 2017). O presente estudo utilizou a dose de 11 g/dia durante 30 dias e acredita-se que as possíveis reações adversas tenham sido de baixa intensidade. Em relação a coleta de sangue, esta foi realizada com material estéril e descartável, evitando a transmissão de contaminantes químicos e biológicos, além de ser feito por profissional capacitado do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC.

## 5.6. TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

### 5.6.1. Variáveis de exposição, desfecho, controle e de caracterização

No quadro a seguir estão descritas as variáveis de exposição, desfecho, além daquelas que foram utilizadas para controle e caracterização da amostra.

Quadro 8 - Variáveis de exposição, desfecho, controle e de caracterização da amostra, unidades de medida e respectiva classificação teórica que será utilizada para as análises estatísticas.

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Unidades de medida/ categorias</b>	<b>Classificação teórica</b>
<b>Exposição</b>	Ingestão de prebiótico	Sim/Não	Independente, nominal, dicotômica
	Ingestão de simbiótico	Sim/Não	
	Ingestão de placebo	Sim/Não	
<b>Desfechos</b>	Ferro sérico	pg/mL	Dependente, quantitativa contínua
	Transferrina	mg/dL	
	Ferritina	ng/dL	
	Saturação de transferrina	%	
	CLFL e CLFT	µg/dL	
	Hemoglobina	g/dL	
	Hematócrito	%	
	VCM	u2 fl	
	HCM	pg	
	CHCM	g/dL	
	Ácido fólico	ng/mL	
	Vitamina B <sub>12</sub>	pg/mL	
	Ingestão dietética (fibra, ferro heme e não-heme, vitamina C e B1 e ácido fólico)	g, mg, µg	

Fonte: autora

Quadro 8 - Variáveis de exposição, desfecho, controle e de caracterização da amostra, unidades de medida e respectiva classificação teórica que será utilizada para as análises estatísticas.

(continuação)

<b>Caracterização</b>	IL-6	pg/mL	Dependente, quantitativa contínua
	Proteína C reativa	mg/dL	
	Peso corporal	kg	
	Índice de Massa Corporal	kg/m <sup>2</sup>	
	Consistência e formato das fezes	1 a 7	Dependente, nominal categórica
	Constipação	Sim/Não	Dependente, qualitativa nominal, dicotômica
	Alterações gastrointestinais	Sim/Não	
	Prática de atividade física	Sim/Não	
	Uso de suplementos	Sim/Não	
	Ciclo menstrual regular*	Sim/Não	
	Menopausa*	Sim/Não	
	Ingestão dietética (macro e micronutrientes)	Kcal, g, mg, µg	Dependente, quantitativa contínua
	Idade	Anos	Dependente, categórica nominal
	Sexo	Masculino/Feminino	
	Cirurgia anterior no trato gastrointestinal	Sim/Não	
	Comorbidades prévias	Sim/Não	
	Uso prévio de medicações	Sim/Não	

Fonte: autora

### 5.6.2. Análises estatísticas

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2016<sup>®</sup>. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico STATA<sup>®</sup> versão 13.0 para Windows<sup>®</sup>.

As variáveis contínuas foram descritas em média e desvio padrão para distribuição simétrica, ou mediana e intervalo interquartil para assimétrica. Para as variáveis contínuas, as comparações entre os grupos (controle e suplementados) foram realizadas utilizando o teste de T de Student para amostras simétricas e Wilcoxon para amostras assimétricas

As variáveis categóricas foram descritas em categorias e frequência a partir do aparecimento nos grupos estabelecidos. Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados, sendo que se o resultado foi  $<0,05$ , rejeitou-se a normalidade dos dados. Para comparações entre os grupos (controle e suplementados) foram utilizados o Teste de Qui-Quadrado (ou teste de Fisher quando o valor esperado em uma casela for menor que 5).

Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

Como resposta aos objetivos desse projeto de pesquisa, foi elaborado um artigo intitulado “Efeito da suplementação de fruto-oligossacarídeos e simbiótico em marcadores do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida: um ensaio clínico randomizado, placebo-controlado e triplo cego” que será enviado e avaliado pela periódico na área de nutrição clínica com QUALIS A1 para área da nutrição e fator de impacto 5.496 (<https://www.journals.elsevier.com/clinical-nutrition-espen>) conforme prévia a seguir:

**TÍTULO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E SIMBIÓTICO EM MARCADORES DO METABOLISMO DO FERRO EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLO CEGO.**

**Autores:** Luana Pucci de Lima<sup>a</sup>, Julia Pessini <sup>a</sup>, Victoria Silva e Jonck<sup>b</sup>, Ricardo Fernandes<sup>a</sup>, Lote Miguel Manuel<sup>a</sup>, Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade<sup>c</sup>.

### **Afiliação:**

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

<sup>b</sup>Curso de Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

<sup>c</sup>Departamento de Nutrição e Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

### **Email de cada autor:**

Luana Pucci de Lima – luanapucci@hotmail.com

Julia Pessini – juliapessini@gmail.com

Victoria Silva e Jonck – jonckvictoria@gmail.com

Ricardo Fernandes – ricardontr@gmail.com

Lote Miguel Manuel – lotemiguel14@gmail.com

Erasmus Benicio Santos de Moraes Trindade – erasmotrindade@gmail.com

**Autor correspondente:**

Erasmus Benicio Santos de Moraes Trindade.

Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, Florianópolis – Santa Catarina – Brasil – CEP: 88040-900.

Departamento de Nutrição.

Fone: +55 48 3721-4158.

Fax: +55 48 3721-9542.

Email: erasmotrindade@gmail.com

**Abreviações utilizadas neste estudo:**

FOS – Fruto-oligossacarídeo; IL – Interleucina; IMC – Índice de Massa Corporal; LPS – Lipopolissacarídeo; PCR – Proteína C-reativa; UFC – Unidades Formadoras de Colônia; UIBC: do inglês *unsaturated iron binding capacity* (Capacidade de ligação do ferro livre)

HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; EAR: do inglês *Estimated Average Requirement* (Necessidade média estimada)

CLFL: Capacidade de ligação do ferro livre; CLFT: Capacidade de ligação do ferro total.

HU/UFSC: Hospital Universitário/Universidade Federal de Santa Catarina; USDA: do inglês

*United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos);  
DRI: do inglês *Dietary Reference Intakes* (Ingestão Dietética de Referência)

## RESUMO

Introdução/Objetivos: O ferro é um recurso primordial para o crescimento e sobrevivência de todas as células procarióticas e eucarióticas. Indivíduos obesos apresentam alterações na microbiota e no metabolismo do ferro e a relação entre essas condições tem sido investigada. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de fruto-oligossacarídeo (FOS) ou simbiótico em marcadores do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida.

Métodos: Ensaio clínico randomizado, placebo-controlado e triplo cego conduzido em 22 indivíduos adultos com três braços paralelos, sendo: prebiótico (FOS), simbiótico (FOS, três cepas de lactobacilos e uma cepa de bifidobactéria) e placebo (maltodextrina) na dosagem de 11g/dia por 30 dias. Marcadores bioquímicos e de ingestão alimentar do metabolismo do ferro foram avaliados antes e após a suplementação. Resultados: As análises não mostraram diferenças significativas entre os grupos após a suplementação. Nas avaliações intragrupo, houve redução significativa no marcador de reserva de ferro CLFL no grupo simbiótico ( $p=0,018$ ) e nos marcadores funcionais de ferro HCM no grupo prebiótico ( $p=0,019$ ) e CHCM no grupo placebo ( $p=0,014$ ). Apenas a saturação de transferrina estava abaixo do valor de referência no momento basal nos grupos prebiótico e simbiótico. Em relação a ingestão dietética, os grupos placebo e simbiótico apresentaram valores de ingestão abaixo do recomendado pela EAR no momento basal para vitamina C. Conclusões: A relação entre a microbiota e o status de ferro, ainda não foi investigado em indivíduos com obesidade mórbida. Alguns parâmetros do metabolismo do ferro são considerados proteínas de fase aguda e, portanto, influenciados pela inflamação, presente nestes indivíduos. Portanto para averiguar tal relação são necessários mais estudos em humanos, com maior representatividade



amostral, que avaliem a microbiota intestinal e concentração de hepcidina, como regulador negativo do metabolismo do ferro estimulado pela inflamação.

Palavras-chave: Obesidade. Microbiota intestinal. Prebióticos. Simbióticos. Proteínas Reguladoras do ferro

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública que os países enfrentam<sup>1</sup>. Sua etiologia é complexa e multifatorial, e envolve a interação entre ambiente inadequado, fatores emocionais, mecanismos neurais, hormonais, além de fatores genéticos e epigenéticos<sup>2</sup>.

A obesidade tem sido associada a microbiota intestinal, que consiste em um sistema complexo e dinâmico de micro-organismos que quando em equilíbrio participa de processos benéficos ao hospedeiro<sup>3</sup>. Porém, em casos de disbiose, observa-se alterações em sua composição, com menor diversidade de espécies e predomínio de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos como: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus*, *Campylobacter*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* e *Anaerostipes*.<sup>4,5</sup> Essas entre outras bactérias fazem uso do fornecimento contínuo de micronutrientes para sua replicação e metabolismo como, por exemplo, o ferro. Um mineral vital para a homeostase celular e imprescindível para diversas reações biológicas de quase todas as células procarióticas e eucarióticas<sup>6</sup>. As bactérias desenvolveram mecanismos para obtenção de ferro do hospedeiro e observa-se que tanto a condição de alto ou de baixo teor de ferro pode ser capazes de estimular diferentes aspectos da virulência bacteriana<sup>7</sup>.

O metabolismo do ferro também tem sido associado a obesidade. Essa conexão surgiu há mais de 40 anos e embora vários fatores tenham sido previamente propostos para explicá-la, ainda não se pode estabelecer uma causa única para esta condição<sup>8,9</sup>. Atualmente o mecanismo

que melhor responde esse paradoxo envolve a descoberta da hepcidina, um hormônio peptídico, que participa da regulação sistêmica do metabolismo do ferro. Ela é inibida pela atividade eritropoiética e estimulada pelo aumento das concentrações plasmáticas de ferro e também pela inflamação, característica dos indivíduos obesos<sup>10,11</sup>.

Neste sentido o uso de suplementação com prebióticos ou simbióticos para modulação da resposta inflamatória de baixo grau, pode ser uma possível estratégia para manter e/ou regular a permeabilidade intestinal bem como atuar na disponibilidade ou não de ferro para células bacterianas<sup>12,7</sup>.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de FOS ou simbiótico contendo FOS em marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Participantes do estudo*

Ensaio clínico randomizado, placebo controlado e triple cego, realizado na cidade de Florianópolis, Santa Catarina – Brasil, no período entre janeiro de 2016 a fevereiro 2018. A amostra não probabilística deste estudo foi atingida por saturação temporal e com indivíduos adultos com obesidade mórbida assistidos em sua primeira consulta em um ambulatório do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Os critérios de inclusão foram: indivíduos adultos (18-60 anos) de ambos os sexos com IMC  $\geq 40\text{kg/m}^2$ . Os critérios de exclusão foram: indivíduos com doenças gastrointestinais prévias (ex: câncer e doenças inflamatórias intestinais); intolerâncias e/ou alergias alimentares (ex: intolerância à lactose e doença celíaca); dependência alcoólica e/ou de drogas ilícitas; uso

de fármacos anti-inflamatórios e/ou antibióticos e/ou imunossupressores até três meses antes; uso regular de laxativos, analgésicos e inibidores de apetite; uso atual ou prévio (até um mês) de prebióticos, probióticos, simbióticos ou produtos enriquecidos com estes ingredientes; apresentar intolerância a prebióticos e/ou probióticos e/ou simbióticos; seguimento de uma dieta para perda de peso nos últimos três meses; grávidas ou lactantes; seguimento atual de dietas não usuais (ex: vegetariana, macrobiótica, paleolítico) e fumantes.

Foram descontinuados os participantes que ficaram por dois dias consecutivos ou mais sem consumir a dosagem esperada do suplemento. O ponto de corte de dois dias foi baseado em uma pesquisa com seres humanos que mostrou uma mudança estrutural significativa da comunidade microbiana após dois dias de uma intervenção dietética<sup>13</sup>.

Todos os participantes receberam esclarecimento padronizado sobre o tratamento nutricional para perda de peso, visando respeitar critérios éticos quanto à participação no estudo sem impossibilitar acesso ao tratamento nutricional (Material suplementar S1). Ainda, foi orientado aos indivíduos que durante o período de suplementação evitassem praticar atividade física intensa, consumir bebida alcoólica e alimentos enriquecidos com prebióticos, probióticos ou simbióticos (Material suplementar S2).

O estudo foi registrado na plataforma *ClinicalTrials.gov* sob identificação NCT02660333 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 1.340.253, seguindo orientações éticas internacionais (Declaração de Helsinki). Todos os participantes elegíveis foram convidados a participar e aqueles interessados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### *Desenho do estudo*

Os indivíduos elegíveis e que aceitaram participar do estudo foram alocados randomicamente em três grupos de tratamento: placebo, prebiótico ou simbiótico e avaliados em dois momentos.

Em ambos foram realizadas a coleta de dados clínicos, antropométricos e amostras sanguíneas. No momento basal ainda ocorreu a caracterização dos indivíduos, início da suplementação, entrega da ficha de frequência de consumo dos suplementos, orientações do que evitar durante o período de suplementação (Material Suplementar 3 e 4) e orientações nutricionais padronizadas para todos os participantes e no momento final, após trinta dias, ocorreu o término da suplementação com a entrega da ficha de frequência de consumo dos suplementos. Os pesquisadores e colaboradores mantiveram contato presencial com os indivíduos que estavam em análise (quando eles se dirigiram ao HU/UFSC) ou via ligação telefônica uma vez por semana, visando o registro da adesão ao tratamento e suporte assistencial adequado, se necessário. Aqueles que receberam placebo foram orientados a consumir 11 gramas diárias de maltodextrina; aqueles que receberam prebiótico foram orientados a consumir 11 gramas diárias de FOS (FiberFOS<sup>®</sup>, Invictus Farmanutrição, Brasil) e aqueles que receberam simbiótico foram orientados a consumir 11 gramas diárias de FOS +  $2 \times 10^9$  UFC/dia de *Lactobacillus paracasei* LPC-37,  $2 \times 10^9$  UFC/dia de *Lactobacillus rhamnosus* HN001,  $2 \times 10^9$  UFC/dia de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e  $2 \times 10^9$  UFC/dia de *Bifidobacterium lactis* HN019 (Simbioflora<sup>®</sup>, Invictus Farmanutrição, Brasil) durante 30 dias. Cada indivíduo foi orientado a ingerir diariamente o conteúdo de dois sachês, em horários distintos, misturando o conteúdo de cada sachê em 100 mL de água em temperatura ambiente.

Os desfechos primários foram as alterações dos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro (ferro sérico, transferrina, saturação de transferrina, ferritina, índices hematimétricos, ácido fólico e vitamina B12) e os secundários foram as alterações da ingestão dietética quanto a: ferro total, heme e não heme, vitamina B12, ácido fólico e vitamina C. Ainda foram utilizados como subsídios os desfechos primários utilizados em trabalhos anteriores de marcadores inflamatórios (IL-6 e PCR), parâmetros clínicos, alterações dos indicadores

antropométricos do estado nutricional e estimativa da ingestão dietética quanto à: energia, carboidratos, proteínas e lipídeos.

#### *Randomização, ocultamento da alocação e mascaramento*

Os participantes foram distribuídos aleatoriamente a um dos grupos de tratamento por meio de uma lista de randomização gerada pelo software estatístico Stata<sup>®</sup> v.13.1 para Windows (StataCorp, Texas, EUA), consistindo em blocos permutados de forma aleatória com três pacientes cada. Após os grupos de tratamento foram substituídos por códigos numéricos aleatórios com três dígitos, gerados por meio de uma tabela de números aleatórios, para que houvesse o ocultamento da alocação. Esta etapa foi realizada por um pesquisador não envolvido com a pesquisa. Os pesquisadores que recrutaram e acompanharam os participantes apenas tiveram acesso à lista contendo os blocos e os códigos numéricos de randomização, não havendo como prever para qual grupo o indivíduo seria alocado.

Os participantes do estudo e os pesquisadores foram mascarados em relação ao consumo e a distribuição da suplementação, respectivamente. Os técnicos de laboratório que realizaram a coleta de sangue também foram mascarados quanto à distribuição da suplementação. Os suplementos e o placebo foram pré-embalados em sachês opacos e fechados pelo fornecedor com os códigos de randomização, sendo idênticos em aparência física, sabor e cor. Os códigos de identificação dos suplementos só foram revelados pela empresa fornecedora após a análise estatística dos dados do estudo, caracterizando o estudo como triplo cego.

#### *Coleta e preparo do material biológico*

Aproximadamente 15 mL de sangue venoso foram coletados em cada momento do estudo por técnico de laboratório capacitado de acordo com técnica padronizada<sup>14</sup> na região cubital do antebraço, utilizando tubos contendo heparina sódica ou gel separador, em jejum prévio de 8 a 10 horas. As amostras de sangue nos tubos com heparina foram centrifugadas a

400g por sete minutos à temperatura ambiente e alíquotas de plasma (500 µL) foram transferidas para criotubos e armazenadas a -80°C. As amostras de sangue nos tubos com gel separador foram deixadas em repouso por 10 minutos até completa coagulação. Em seguida, os tubos foram centrifugados por um período de cinco minutos a 400g para a separação do soro. As concentrações de IL-6 foram determinadas por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSVerse flow cytometer® - BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) utilizando o kit comercial Cytometric Bead Array - Human Inflammatory Cytokine Kit® (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e seguindo as instruções do fabricante e expressas em pg/mL. As concentrações de proteína C-reativa (PCR) foram determinadas por procedimento automatizado utilizando reagentes específicos (Dimension RxL Max® integrated chemistry system - Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Alemanha), baseado em uma técnica de imunoensaio turbidimétrico de partículas melhoradas. Os valores foram expressos em mg/L, sendo o valor desejável até 3,0 mg/L. O método Ferene (IMMULITE 2000 Siemens®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA) foi utilizado para concentrações de ferro, desejáveis valores entre 50-170 mg/dL para mulheres, 65 – 175 mg/dL para homens e para Capacidade de ligação de ferro total (CLFT) e com valores entre 250-450 µg/dL. O método de Quimioluminescência por Micropartículas (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA) foi utilizado para concentrações de ferritina, com valores desejáveis entre 22 – 322 ng/mL para mulheres e 10 – 291 para homens ng/mL; para vitamina B12 com valores desejáveis entre 211 – 911 pg/mL; e Ácido Fólico com valores considerados normais >5,38 ng/mL e deficientes entre 0,35 a 3,37 ng/mL. O método Lauril sulfato de sódio livre de cianeto (SYSMEX XE-2100), foi utilizado para concentrações de hemoglobina, sendo valores desejáveis entre 11,5 – 16,5 g/dL para mulheres e 13,2 – 18,0 g/dL para homens. Para percentual de hematócrito foi utilizado a detecção individual do volume de cada eritrócito pelo método impedância e foco hidrodinâmico (SYSMEX XE-2100), com valores desejáveis de percentuais entre 36,0 – 48,0

% para mulheres e 39,0 – 51,0 % para homens. Foram utilizadas fórmulas para determinação de transferrina ( $CLFT \times 100 / 918 - 63$ ), valores desejáveis entre 160 – 356 mg/dL; saturação de transferrina ( $\text{ferro} \times 100 / CLFT$ ), desejáveis percentuais entre 20 – 50 %; capacidade ligação do ferro livre ( $CLFT - \text{ferro sérico}$ ), com valores entre 110 – 370  $\mu\text{g/dL}$ ; volume corpuslar médio ( $\text{hematócrito} \times 10 / \text{hemácias em milhões}$ ), valores entre 80 a 100 u2 fl; hemoglobina corpuscular média ( $\text{hemoglobina g/dL} \times 10 / \text{hemácias em milhões}$ ), valores entre 27,3 a 32,6 pg; e para concentração de hemoglobina corpuscular média ( $\text{hemoglobina} \times 100 / \text{hematócrito}$ ) valores entre 31,6 a 34,9 g/dL.

#### *Determinação dos indicadores antropométricos do estado nutricional*

Para a avaliação do estado nutricional foram realizadas aferições antropométricas de peso e estatura, seguindo técnicas propostas pela *World Health Organization*<sup>14</sup>. O peso atual foi aferido em balança mecânica de plataforma calibrada com capacidade máxima de 150 kg e escala de 100 g, da marca Toledo® (Empresa Toledo do Brasil, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A estatura foi medida por estadiômetro acoplado à plataforma com capacidade de 2 m e precisão de 0,5 cm. A classificação do estado nutricional foi realizada pelo IMC utilizando-se os pontos de corte definidos pela *World Health Organization*<sup>15</sup>.

#### *Estimativa da ingestão dietética atual*

Para coleta da estimativa da ingestão dietética foram aplicados dois recordatórios de 24 horas (um em cada momento do estudo). Seguindo a técnica dos múltiplos passos, onde os indivíduos foram encorajados a relatar, com o máximo de detalhes (tipo, forma de preparo, ingredientes, quantidades em medidas caseiras), todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, em cada refeição. Ao final da entrevista, o pesquisador procedeu com a revisão dos alimentos e das quantidades relatadas e registradas com o entrevistado<sup>16</sup>.

Para análises da estimativa da ingestão dietética, inicialmente, todos os alimentos, bebidas e preparações relatados pelos indivíduos foram listados e seus respectivos valores de energia e nutrientes (carboidratos total, proteínas, gorduras totais, saturadas, monoinsaturadas, poli-insaturadas, gorduras trans, colesterol, vitaminas D, C e B12, ácido fólico, ferro total, fibra alimentar) foram determinados com base nos valores apresentados na Tabela de composição de alimentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*)<sup>17</sup> e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo, Brasil<sup>18</sup>. Na ausência dos itens alimentares nas tabelas de base de dados citadas, procedeu-se a elaboração de fichas técnicas de preparações ou consulta em rótulos de embalagens para determinação dos valores de energia e nutrientes.

Ainda, para maior fidedignidade do consumo relatado, foram elaboradas fichas técnicas de preparações para as preparações alimentares que estavam disponíveis nas bases de dados consultadas, mas que não consideraram em sua descrição o uso de sal ou óleo de adição. As quantidades destes ingredientes adicionadas às fichas técnicas foram calculadas de acordo com grupo alimentar e técnica de preparo e com base nas recomendações preconizadas na literatura<sup>19</sup>. Para estimativa da ingestão de ferro heme e não heme foram considerados os valores de ferro de acordo com grupo de alimentos de origem vegetal ou animal, ainda para alimentos processados, sem possibilidade de elaboração de fichas técnicas, considerou-se o grupo de maior proporção no alimento de acordo com lista de ingredientes presentes na tabela de USDA ou no rótulo da embalagem, tendo como base a descrição do produto apresentada nas tabelas consultadas.

Posteriormente, as medidas caseiras foram padronizadas e transformadas em gramas/mililitros de alimentos/bebidas tendo como referência os valores disponíveis nas tabelas de equivalências de Pinheiro et al.<sup>20</sup> e Fisberg et al.<sup>21</sup>. Para estimativa do quantitativo de energia e nutrientes da ingestão alimentar dos participantes do estudo, seguiu-se uma padronização



adaptada da proposta do Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais<sup>22</sup>. Todas as etapas descritas foram realizadas em planilhas do software Office Excel<sup>®</sup>, versão 2016.

Após a conclusão da entrada de dados dos relatos de consumo para cada momento do estudo, realizou-se uma análise para avaliar a consistência das informações digitadas e a presença de valores extremos de ingestão diária (<500 ou > 4000 kcal). Essa etapa permitiu verificar possíveis erros de digitação ou a ocorrência de sub ou super-relatos da ingestão diária relatada pelos indivíduos<sup>23</sup>.

#### *Parâmetros clínicos*

Parâmetros clínicos como comorbidades associadas, fármacos utilizados e uso de suplementos vitamínicos e de minerais, alterações gastrointestinais, presença de constipação, consistência e formato das fezes e dados sobre o ciclo menstrual foram verificados. Para a determinação da presença de constipação foram utilizados os critérios diagnósticos do ROMA IV<sup>24</sup>. Para a determinação da consistência e do formato das fezes foram utilizados os critérios da Escala Fecal de Bristol<sup>25</sup>.

#### *Análise estatística*

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010<sup>®</sup>. A análise estatística foi realizada no programa estatístico STATA<sup>®</sup> versão 13.1 para Windows<sup>®</sup>.

As variáveis contínuas foram sintetizadas em duas únicas medidas por grupo: média e desvio padrão se a distribuição foi simétrica, ou mediana e intervalo interquartil se foi assimétrica. Em contrapartida, as variáveis categóricas foram descritas em frequência a partir do aparecimento nos grupos estabelecidos. Para avaliação da distribuição, os dados foram

avaliados a partir da descrição das variáveis, considerando média, desvio padrão, mediana e medidas de assimetria (skewness) e curtose (kurtosis). Para confirmação da avaliação de simetria, também foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo consideradas assimétricas as variáveis que apresentaram valor  $p < 0,05$ .

Para as variáveis contínuas, as comparações entre os grupos (controle e suplementados) foram realizadas utilizando o teste de ANOVA de uma via (dados paramétricos) ou o Teste de Kruskal Wallis (dados não paramétricos). Para comparações intragrupo foi aplicado o teste T pareado ou o teste de Wilcoxon para dados pareados, quando as variáveis fossem simétricas e não simétricas, respectivamente.

Para variáveis categóricas, as comparações entre os grupos (controle e suplementados) foram realizadas utilizando o Teste exato de Fisher.

Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

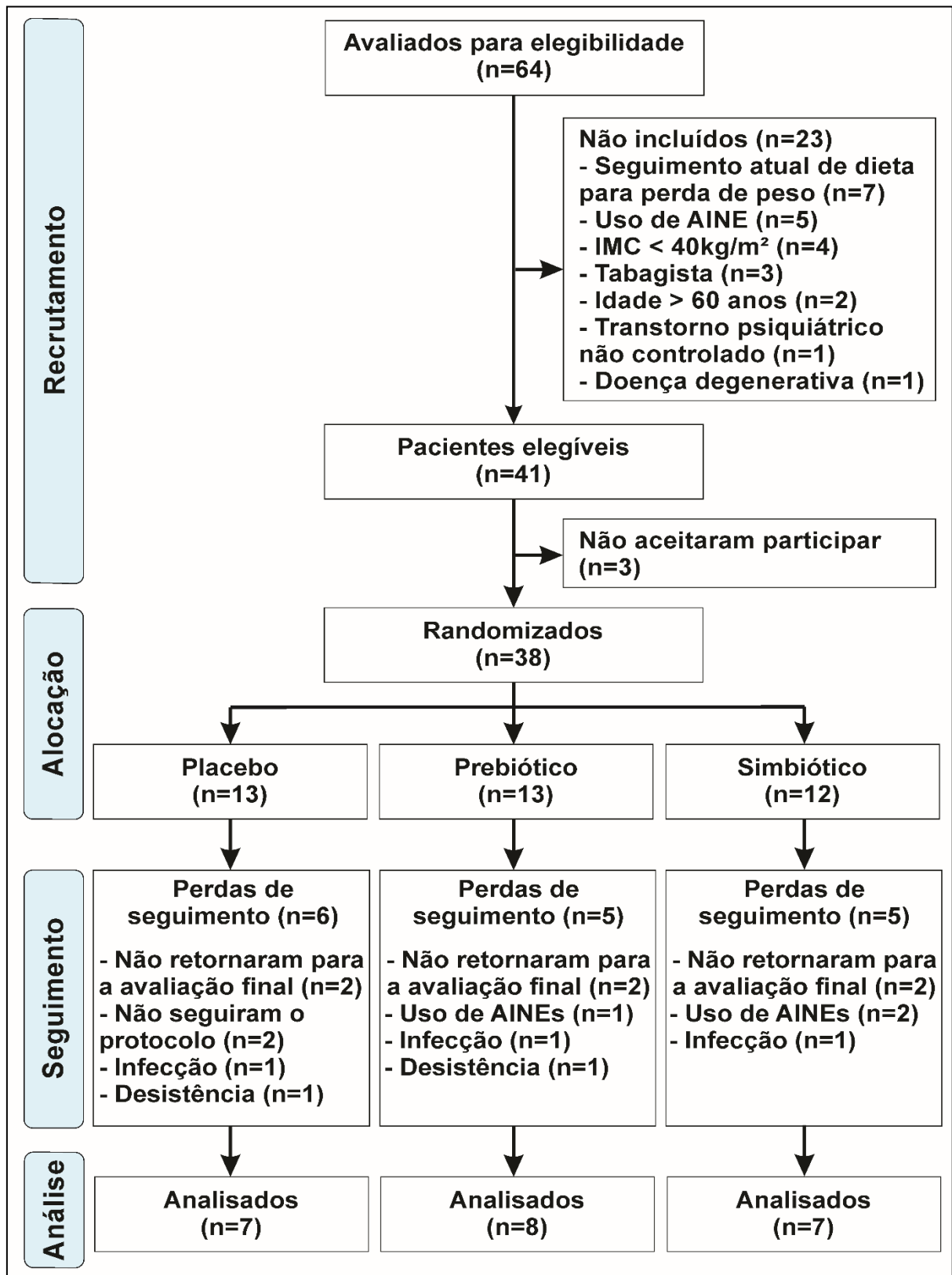
## **RESULTADOS**

### *Recrutamento, randomização e características basais dos participantes*

Todos os indivíduos encaminhados para primeira consulta ambulatorial foram avaliados quanto aos critérios de elegibilidade. Do total de 64 indivíduos avaliados, 41 eram elegíveis e 38 indivíduos aceitaram participar da pesquisa. No final, 22 indivíduos participaram das análises. Os motivos de descontinuação e perdas durante o seguimento estão apresentados na figura 1. Infecções do trato respiratório e uso de anti-inflamatórios para dor em membros inferiores ou região lombar foram as causas de descontinuação de seis indivíduos. Os participantes que não retornaram no momento final da pesquisa foram contatados por telefone para saber o motivo do não retorno. Todos afirmaram que o motivo foi a incompatibilidade de agenda por compromissos. Nenhum destes participantes relatou efeitos adversos ou que tinham deixado de ingerir o suplemento por motivo de desistência.

As características basais dos indivíduos estão descritas na tabela 1. Os dados demográficos, antropométricos e clínicos não foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento. A maioria dos participantes tinha entre 35 e 50 anos de idade (mínimo-máximo: 20-57 anos), era do sexo feminino representando 72,7% da amostra (n=16), porém no grupo prebiótico não houveram participantes do sexo masculino. Apesar do peso não apresentar valores estatisticamente significativo entre os grupos, o grupo placebo apresentou uma diferença positiva de 15,4 kg em relação ao grupo prebiótico. Em relação as doenças crônicas associadas à obesidade, dos participantes desse estudo, 59,1% (n=13), apresentaram alguma doença e utilizava ao menos um tipo de medicamento para tratamento. E 31,8% (n=7) apresentavam diagnóstico de depressão e ansiedade e faziam uso de antidepressivo, com maior predominância no grupo placebo. A maioria dos indivíduos relatou fezes endurecidas no momento basal, embora apenas dois cumprissem os critérios para constipação funcional. E a maioria relatou consistência do tipo 3 a 7 de acordo com escala de Bristol. Quanto às mulheres que apresentavam menopausa, nenhuma estava em terapia de reposição hormonal. Nenhuma mulher relatou ausência de ovulação por contracepção hormonal contínua, apesar de quatro relatarem ciclo menstrual irregular, sendo duas do grupo prebiótico, uma do grupo simbiótico e uma do grupo placebo.

Figura 1 – Fluxograma dos participantes do estudo.



Fonte: Do autor. Legenda: AINE – Anti-inflamatórios não esteroidais. IMC – Índice de Massa Corporal.

Tabela 1 – Características basais dos participantes do estudo. Continua.

<b>Características</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
Idade (anos)	43,9 (10,0)	40,5 (10,3)	41,3(4,9)	0,753 <sup>1</sup>
Sexo ( <i>n masculino/ n feminino</i> )	2/5	0/8	4/3	0,057 <sup>2</sup>
Peso (kg)	135,3 (28,4)	119,9 (17,9)	129,0(25,4)	0,473 <sup>1</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	50,9 (9,4)	46,7 (5,3)	45,9 (5,2)	0,363 <sup>1</sup>
Constipação funciona* <i>n (%)</i>	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0,582 <sup>2</sup>
<i>Escala de Bristol n (%)</i>				0,928 <sup>2</sup>
Tipos 1-2	1 (14)	3 (38)	2 (29)	
Tipos 3-4	3 (43)	3 (38)	3 (43)	
Tipos 5-7	3 (43)	2 (25)	2 (25)	
Menopausa (n/%)	2 (28,6)	2 (25,0)	0 (0)	0,582 <sup>b</sup>

Legenda: IMC – Índice de Massa Corporal. As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão. <sup>1</sup> Teste de ANOVA. <sup>2</sup> Teste exato de Fisher. \*De acordo com os critérios de ROMA IV (Lacy et al.23). \*\*Psoríase, hipotireoidismo, refluxo gastroesofágico, apneia do sono, síndrome do pânico, insuficiência cardíaca congestiva e varizes nos membros inferiores. \*\*\*Antiácidos, hormônio tireoidiano e venotônicos

Tabela 1 – Características basais dos participantes do estudo. Continua

Características	Placebo (n=7)	Prebiótico (n=8)	Simbiótico (n=7)	Valor-p
Comorbidades associadas (n%)				
Hipertensão arterial	4 (57,1)	1(12,5)	2 (28,6)	0,119 <sup>1</sup>
Diabetes mellitus tipo 2	1 (14,3)	0 (0)	1 (14,3)	0,303 <sup>1</sup>
Dislipidemia	1 (14,3)	3 (37,5)	4 (51,7)	0,500 <sup>1</sup>
Ansiedade/depressão	1 (14,3)	0 (0)	2 (28,6)	0,282 <sup>1</sup>
Outros**	0 (0)	2 (25,0)	0 (0)	0,266 <sup>1</sup>
Medicamentos de uso contínuo (n%)				
Anti-hipertensivos	4 (57,1)	1 (12,5)	3 (42,9)	0,119 <sup>2</sup>
Antidepressivos	4 (57,1)	1 (12,5)	2 (28,6)	0,282 <sup>2</sup>
Hipoglicemiantes orais	1 (14,3)	0 (0)	2 (28,6)	0,303 <sup>2</sup>
Estatinas	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	1,000 <sup>2</sup>

Legenda: IMC – Índice de Massa Corporal. As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão. <sup>1</sup> Teste de ANOVA. <sup>2</sup> Teste exato de Fisher. \*De acordo com os critérios de ROMA IV (Lacy et al.23). \*\*Psoríase, hipotireoidismo, refluxo gastroesofágico, apneia do sono, síndrome do pânico, insuficiência cardíaca congestiva e varizes nos membros inferiores. \*\*\*Antiácidos, hormônio tireoidiano e venotônicos

Tabela 1 – Características basais dos participantes do estudo.

<b>Características</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
Outros***	1 (14,3)	2 (25,0)	1 (14,3)	1,000 <sup>2</sup>

Legenda: IMC – Índice de Massa Corporal. As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão. <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste exato de Fisher. \*De acordo com os critérios de ROMA IV (Lacy et al.23). \*\*Psoríase, hipotireoidismo, refluxo gastroesofágico, apneia do sono, síndrome do pânico, insuficiência cardíaca congestiva e varizes nos membros inferiores.

\*\*\*Antiácidos, hormônio tireoidiano e venotônicos

### *Adesão à suplementação e presença de efeitos adversos*

No que concerne à adesão à suplementação, todos os indivíduos receberam 60 sachês de suplemento, sendo que a orientação era consumir dois sachês por dia. No grupo placebo, três dos sete participantes consumiram entre 55 e 57 sachês, o restante consumiu todos os sachês. No grupo prebiótico, um dos oito participantes consumiu 58 sachês, o restante consumiu todos os sachês. No grupo simbiótico, todos consumiram os 60 sachês. Não houve diferença significativa na adesão à suplementação entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Nenhum participante ficou por dois dias ou mais sem consumir o suplemento.

Quanto a efeitos adversos, três indivíduos do grupo prebiótico relataram flatulência, um indivíduo também do grupo prebiótico relatou cólica e um indivíduo do grupo simbiótico relatou fezes endurecidas. No grupo placebo, não houve relato de efeitos adversos. Ninguém na pesquisa desistiu por efeitos adversos da suplementação.

### *Ingestão dietética*

As estimativas de ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação estão apresentadas na tabela 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em relação ao aporte energético, apesar de ausência de significância estatística na avaliação intragrupo, todos os grupos apresentaram mediana de consumo reduzido após 30 dias de acompanhamento. Em relação aos macronutrientes, o grupo simbiótico apresentou uma maior mediana para o consumo de carboidratos no momento basal e também uma maior redução após 30 dias de pesquisa (-134,8 g/dia). As proteínas apresentaram maior consumo no momento basal pelo grupo placebo e menor no grupo prebiótico e todos os grupos tiveram redução do consumo após suplementação, sem significância estatística. A mediana de ingestão de gordura total foi reduzida após 30 dias de pesquisa em todos os grupos. Tanto as gorduras monoinsaturadas, poli-insaturadas e trans obtiveram consumo final menor quando comparado



com o momento basal. Já a ingestão de fibras, apresentou relevância estatística intragrupo do momento basal para o final nos indivíduos que receberam prebiótico ( $p=0,011$ ) e no grupo que recebeu simbiótico ( $p= 0,028$ ) sendo significativamente maior comparado com grupo placebo ( $p=0,030$ ). A ingestão de vitamina C no momento final foi maior para todos os grupos, com relevância estatística significativa intragrupo apenas para o placebo ( $p=0,043$ ). Já a ingestão de vitaminas B12 se mostrou reduzida em todos os grupos após 30 dias de pesquisa. A mediana de consumo de ácido fólico foi maior no momento inicial no grupo simbiótico e este grupo também foi o que apresentou maior redução de consumo no momento final ( $-266,0 \mu\text{g}$ ). Em relação ao consumo de ferro total, os grupos placebo e simbiótico apresentaram redução mediana de consumo de ferro total após 30 dias de pesquisa, sem relevância estatística significativa. E, ao analisarmos a diferença da ingestão do ferro total entre heme e não heme antes e após 30 dias, o grupo prebiótico apresentou redução da mediana de consumo discreta para ferro heme e aumento de consumo para ferro não-heme, o grupo placebo reduziu seu consumo de ferro não-heme e o grupo simbiótico reduziu consumo mediano de ambos (heme e não-heme) Todos os dados sem relevância estatística significativa (tabela 2).

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Energia (kcal/dia)</i>				
Basal	1.845,3 (1.163,3; 2.083,7)	1.939,9 (990,6; 1.993,1)	1.701,2 (1.238,7; 2.041,5)	0,830
30 dias	1.103,8 (1.016,1; 2.846,2)	1.640,5 (983,5; 1.940,7)	1.573,7 (1.172,2; 2.042,7)	0,758
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,311	0,327	0,237	
Diferença	-573,21 (-741,5; 306,9)	-33,8 (-234,3; 53,3)	-282,5 (-529,0; -34,7)	0,292
<i>Carboidratos disponíveis (g/dia)</i>				
Basal	157,4 (27,9; 250,9)	193,9 (109,3; 276,0)	213,8 (126,7; 247,6)	0,760
30 dias	118,6 (65,7; 160,4)	170,8 (132,7; 297,5)	92,6 (73,7; 174,9)	0,214
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,237	0,799	0,176	
Diferença	-70,8 (-134,5; 37,7)	19,8 (-69,3; 72,2)	-134,8 (-160,1; 19,2)	0,216

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Proteínas (g/dia)</i>				
Basal	110,8 (42,7; 168,0)	50,8 (33,8; 72,9)	85,7 (64,8; 88,0)	0,098
30 dias	98,3 (36,7; 118,5)	48,2 (30,3; 75,0)	78,2 (42,2; 92,9)	0,341
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,499	0,483	0,311	
Diferença	-25,0 (-49,5; 47,3)	-10,9 (-20,3; 10,5)	-9,8 (-38,6; 7,2)	0,893
<i>Gordura total (g/dia)</i>				
Basal	56,0 (39,9; 102,5)	43,5 (41,3; 77,4)	50,8 (42,9; 60,7)	0,732
30 dias	29,0 (14,0; 118,2)	33,6 (19,0; 53,2)	66,3 (27,3; 76,1)	0,422
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,398	0,093	0,866	
Diferença	-6,0 (-32,4; 5,6)	-19,9 (-36,9; 8,3)	-7,8 (-23,6; 21,3)	0,448

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Gordura saturada (g/dia)</i>				
Basal	18,0 (12,0; 34,2)	15,0 (9,5; 25,1)	12,9 (8,7; 31,4)	0,799
30 dias	11,7 (4,7; 41,1)	11,0 (5,6; 18,1)	16,2 (8,7; 25,3)	0,620
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,128	0,161	0,499	
Diferença	-11,6 (-13,2; 3,2)	-4,6 (-15,1; 2,0)	-2,7 (-15,2; 11,0)	0,925
<i>Gordura monoinsaturada (g/dia)</i>				
Basal	15,0 (13,4; 29,0)	16,6 (8,9; 20,9)	18,7 (17,8; 22,5)	0,364
30 dias	8,6 (4,2; 34,3)	10,8 (6,8; 20,8)	15,5 (9,8; 48,1)	0,381
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,866	0,575	1,000	
Diferença	2,1 (-10,7; 5,3)	-1,7 (-9,6; 6,7)	-3,9 (-12,6; 29,5)	0,983

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Gordura poli-insaturada (g/dia)</i>				
Basal	7,6 (5,0; 8,8)	5,6 (3,5; 7,4)	9,7 (5,1; 12,6)	0,201
30 dias	6,8 (2,1; 10,8)	4,2 (3,4; 5,1)	5,4 (4,5; 27,4)	0,382
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,866	0,327	0,735	
Diferença	-0,8 (-1,7; 2,0)	-1,4 (-3,4; 0,3)	0,1 (-3,7; 12,9)	0,477
<i>Gordura trans (g/dia)</i>				
Basal	0,8 (0,6; 1,5)	0,7 (0,4; 0,9)	0,7 (0,5; 0,8)	0,212
30 dias	0,4 (0,2; 1,7)	0,2 (0,1; 0,7)	0,6 (0,4; 0,7)	0,529
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,612	0,050	0,866	
Diferença	-0,6 (-1,2; 1,1)	-0,5 (-0,8; -0,2)	0,0 (-0,2; 0,3)	0,133

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Colesterol (mg/dia)</i>				
Basal	212,1 (101,5; 358,6)	136,4 (78,3; 199,7)	168,8 (146,6; 245,7)	0,378
30 dias	311,4 (178,3; 663,9)	175,7 (92,2; 175,7)	246,1 (52,0; 333,8)	0,181
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,237	1,000	0,735	
Diferença	76,8 (-40,0; 266,9)	-58,3 (-94,0; 115,4)	-8,4 (-98,3; 164,9)	0,513
<i>Fibra dietética (g/dia)</i>				
Basal	19,2 (11,6; 30,3)	12,9 (10,1; 17,2)	17,0 (14,5; 18,5)	0,368
30 dias	16,8 (11,0; 43,1)	27,2 (24,4; 35,9)*	25,1 (23,9; 44,0)*	0,113
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,311	<b>0,011</b>	<b>0,028</b>	
Diferença	-5,0 (-6,3; 4,5)	16,3 (6,1; 22,1)*	10,6 (6,4; 21,9)*	<b>0,030</b>

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

Desfechos	Placebo (n=7)	Prebiótico (n=8)	Simbiótico (n=7)	Valor-p <sup>a</sup>
<i>Vitamina C (mg)</i>				
Basal	41,6 (29,2; 92,8)	70,6 (20,2; 205,4)	27,4 (8,9; 48,7)	0,243
30 dias	169,2 (14,1; 320,8)	142,0 (88,7; 182,8)	40,7 (25,4; 151,1)	0,315
Valor-p <sup>2</sup>	<b>0,043</b>	0,401	0,128	
Diferença	127,6 (11,2; 219,2)	11,4 (-50,0; 117,7)	16,4 (-8,0; 62,0)	0,232
<i>Vitamina B12 (µg)</i>				
Basal	3,0 (1,2; 6,1)	1,9 (0,5; 2,9)	1,8 (0,9; 2,6)	0,222
30 dias	1,2 (0,5; 5,2)	0,9 (0,5; 1,9)	1,5 (0,6; 6,5)	0,495
Valor-p <sup>2</sup>	0,735	0,208	0,499	
Diferença	-0,7 (-5,4; 3,5)	-0,8 (-1,4; 0,0)	-0,3 (-0,9; 4,0)	0,423

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Ácido fólico (µg)</i>				
Basal	161,1 (56,5; 360,1)	161,6 (111,5; 321,7)	468,5(440,3; 593,3)	0,061
30 dias	206,6 (108,7; 451,4)	201,4 (156,9; 311,7)	222,3 (148,0; 450,7)	0,928
Valor-p <sup>2</sup>	1,000	0,889	0,237	
Diferença	-13,1 (-200,3; 2017,2)	33,5 (-161,0; 111,7)	-266,0 (-452,2; -86,3)	0,253
<i>Ferro total (mg)</i>				
Basal	10,7 (8,0; 16,3)	8,1 (5,0; 13,7)	9,8 (8,2; 15,3)	0,463
30 dias	9,5 (4,9; 12,7)	8,7 (7,2; 11,1)	9,6 (5,9; 10,8)	0,998
Valor-p <sup>2</sup>	0,499	0,779	0,398	
Diferença	-2,9 (-7,6; 1,5)	1,3 (-2,7; 3,4)	-4,4 (-7,4; 0,7)	0,283

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.



Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Ferro heme (mg)</i>				
Basal	2,6 (0,9; 4,2)	2,7 (0,2; 3,4)	2,6 (2,0; 2,9)	0,820
30 dias	3,6 (0,6; 6,4)	1,7 (1,1; 2,9)	1,6 (1,0; 5,8)	0,804
Valor-p <sup>2</sup>	0,398	0,674	1,000	
Diferença	0,6 (-2,0; 5,0)	-0,5 (-2,4; 1,7)	-1,3 (-1,4; 3,2)	0,686
<i>Ferro não-heme (mg)</i>				
Basal	9,2 (5,4; 12,1)	5,7 (3,5; 9,1)	9,3 (5,4; 12,7)	0,206
30 dias	6,6 (1,7; 8,8)	6,9 (5,7; 8,3)	6,2 (5,0; 9,5)	0,845
Valor-p <sup>2</sup>	0,237	0,575	0,237	
Diferença	-4,0 (-8,0; 3,4)	2,1 (-2,4; 3,7)	-6,0 (-7,6; 2,3)	0,409

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 2 – Ingestão dietética dos participantes antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfechos</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p<sup>a</sup></b>
<i>Água (mL)</i>				
Basal	438,1 (267,8; 823,0)	509,4 (360,0; 607,2)	725,5 (571,8; 953,4)	0,144
30 dias	794,0 (450,3; 1262,6)	571,1 (413,5; 720,2)	684,8 (527,1; 895,5)	0,311
Valor-p (teste pareado) <sup>b</sup>	0,063	0,483	0,735	
Diferença	209,7 (-28,9; 393,9)	79,4 (-100,6; 246,5)	-61,6 (-258,2; 323,7)	0,243

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. <sup>a</sup>Teste de Kruskal Wallis. <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon para dados pareados.

\*Considerando 11g de fibra proveniente da suplementação ofertada. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

*Marcadores inflamatórios e indicadores do estado nutricional*

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para os marcadores inflamatórios avaliados na comparação entre os grupos, tanto antes quanto após a suplementação. As concentrações de PCR foram reduzidas entre os três os grupos avaliados após suplementação (-2.0 vs -1.5 vs -1.2 mg/L). Em relação aos indicadores antropométricos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na avaliação entre os grupos para nenhum desfecho avaliado (Tabela 3). Contudo, na avaliação intragrupo, houve redução estatisticamente significativa no peso corporal e IMC nos grupos placebo ( $p=0,028$  e  $p=0,022$ , respectivamente) e prebiótico ( $p=0,009$  e  $p=0,006$ , respectivamente).

Tabela 3 – Marcadores inflamatórios e indicadores antropométricos do estado nutricional antes e após a suplementação.

<b>Desfecho</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Interleucina-6 (pg/mL) **</i>				
Basal	8,7 (6,3; 11,2)	10,8 (8,6; 12,4)	6,6 (4,5; 10,6)	0,103 <sup>2</sup>
30 dias	9,8 (5,7; 12,2)	11,3 (6,7; 12,0)	7,7 (4,6; 9,1)	0,496 <sup>2</sup>
Valor-p <sup>4</sup>	0,499	0,483	0,612	
Diferença	1,1 (-1,1; 2,6)	-0,7 (-1,8; 1,3)	0,1 (-1,5; 2,5)	0,510 <sup>2</sup>
<i>Proteína C-reativa (mg/L) **</i>				
Basal	8,9 (3,5; 10,5)	11,3 (8,0; 19,8)	9,0 (2,6; 10,8)	0,963 <sup>2</sup>
30 dias	5,8 (5,5; 22,8)	8,6 (4,2; 13,5)	6,7 (4,1; 10,5)	0,928 <sup>2</sup>
Valor-p <sup>4</sup>	0,672	0,208	0,735	
Diferença	-1,2 (-3,2; 2,9)	-2,0 (-5,6; 1,4)	-1,5 (-3,1; 1,6)	0,645 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. \*\*variáveis expressas em média e desvio padrão. <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 3 – Marcadores inflamatórios e indicadores antropométricos do estado nutricional antes e após a suplementação. Continuação

<b>Desfecho</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Peso corporal (kg)</i>				
Basal	135,3 (28,4)	119,9 (17,9)	129,0 (25,4)	0,473 <sup>1</sup>
30 dias	132,6 (27,5)	117,6 (18,5)	126,3 (23,2)	0,465 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	<b>0,028</b>	<b>0,009</b>	0,057	
Diferença **	-2,6 (-5,7; -0,4)	-2,0 (-3,2; -1,4)	-2,9 (-6,5; 0,1)	0,803 <sup>2</sup>
<i>Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)</i>				
Basal	50,9 (9,4)	46,7 (5,3)	45,9 (5,2)	0,358 <sup>1</sup>
30 dias	49,9 (9,2)	45,8 (5,8)	45,1 (5,0)	0,375 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	<b>0,018</b>	<b>0,007</b>	0,068	
Diferença **	-1,1 (-1,7; -0,1)	-0,8 (-1,3; -0,6)	-1,0 (-2,1; 0,0)	0,803 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. \*\*variáveis expressas em média e desvio padrão. <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

*Marcadores do metabolismo do ferro*

Nenhum marcador bioquímico apresentou valores estatisticamente significativos na avaliação entre os grupos. Na avaliação intragrupo, as concentrações médias da capacidade de ligação de ferro livre apresentaram redução significativa após 30 dias de suplementação para o grupo simbiótico ( $p=0,018$ ), esse marcador se mostrou reduzido em todos os grupos no momento final. A hemoglobina corpuscular média apresentou redução de suas concentrações médias no momento final para o grupo prebiótico ( $p= 0,019$ ). E a concentração da hemoglobina corpuscular média também apresentou redução significativa no momento final para o grupo placebo ( $p=0,014$ ) e também estava reduzida nos grupos prebiótico e simbiótico, mesmo sem significância. A saturação de transferrina apresentou aumento de seus valores mediano após os 30 dias de suplementação em todos os grupos. Em contraste, os valores de transferrina estavam reduzidos após suplementação em todos os grupos. O ferro sérico não apresentou valores estatisticamente significativos na avaliação intragrupo, porém houve aumento dos valores médios para o grupo simbiótico. As concentrações medianas de ferritina se mostraram reduzidas nos grupos simbióticos e placebo após suplementação. Os outros parâmetros (hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, vitamina B12 e ácido fólico) se mostraram homogêneos antes e após suplementação, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação.

<b>Desfecho</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Ferro sérico (mg/dL)</i>				
Basal	64,1 (14,9)	68,8 (17,7)	63,6 (17,5)	0,806 <sup>1</sup>
30 dias	74,1 (30,5)	67,4 (20,8)	79,7 (20,7)	0,623 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,396	0,765	0,094	
Diferença **	-1 (-8; 13)	-3 (-6,5; 5,5)	22 (-8; 36)	0,426 <sup>2</sup>
<i>Ferritina (ng/mL) **</i>				
Basal	235,8 (117,9 - 353,3)	83,3 (42,6 – 119,3)	161,8 (50,1 – 599,6)	0,086 <sup>2</sup>
30 dias	205,2 (168,8 – 285,8)	73,0 (46,9 – 136,1)	142,2 (35,7 – 559,8)	0,085 <sup>2</sup>
Valor-p <sup>4</sup>	0,917	0,091	0,237	
Diferença	-7,2 (-40,2; 50,9)	16,4 (2,9 – 25,6)	-14,4 (-19,6; 0,1)	0,181 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. \*\*variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação. Continuação

Desfecho	Placebo (n=7)	Prebiótico (n=8)	Simbiótico (n=7)	Valor-p
<i>Transferrina (mg/dL)</i>				
Basal	301,1 (49,8)	318,8 (58,1)	297,3 (43,5)	0,689 <sup>1</sup>
30 dias	285,6 (55,1)	298,6 (43,5)	284,1 (73,1)	0,866 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,057	0,239	0,374	
Diferença **	-22,0 (-23,0; 6)	-16,5 (-29,0; 6,5)	-27,0 (-49;17)	0,994 <sup>2</sup>
<i>Saturação de transferrina (%) **</i>				
Basal	21,0 (15,0-22,0)	18,0 (17,0-22,5)	19,0 (16,0-20,0)	0,987 <sup>2</sup>
30 dias	23,0 (17,0-29,0)	20,5 (16,0-25,0)	25,0 (18,0-35,0)	0,462 <sup>2</sup>
Valor-p <sup>4</sup>	0,352	0,888	<b>0,051</b>	
Diferença	2,0 (-3,0; 6,0)	0,5 (-2,0; 2,5)	5,0 (0,0; 9,0)	0,206 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. \*\*variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.



Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação. Continuação

Desfecho	Placebo (n=7)	Prebiótico (n=8)	Simbiótico (n=7)	Valor-p
<i>Capacidade de ligação do ferro total (µg/dL)</i>				
Basal	331,7 (49,0)	350,5 (53,5)	330,7 (39,7)	0,669 <sup>1</sup>
30 dias	320,0 (50,6)	331,9 (40,0)	318,7 (66,8)	0,868 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,180	0,238	0,374	
Diferença **	-20,0 (-21,0; 10,0)	-15,0 (-27,0; 6,0)	-25,0 (-42,0; 15,0)	0,959 <sup>2</sup>
<i>Capacidade de ligação com ferro livre (µg/dL)</i>				
Basal	267,6 (52,5)	278,0 (44,4)	267,1 (51,1)	0,888 <sup>1</sup>
30 dias	258,1 (41,2)	264,5 (37,5)	239,0 (63,4)	0,584 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,615	0,249	<b>0,018</b>	
Diferença **	-33,0 (-34,0; 31,0)	-7,0 (-20,5; 2,5)	-21,0 (-45,0; -8,0)	0,489 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. \*\*variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação. Continuação

<b>Desfecho</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Hemoglobina (g/dL)**</i>				
Basal	13,3 (13,0; 14,6)	12,7 (12,4; 13,6)	13,9 (10,6; 14,7)	0,430 <sup>2</sup>
30 dias	13,2 (12,5; 13,8)	12,8 (12,2; 13,5)	13,8 (10,6; 15,1)	0,389 <sup>2</sup>
Valor-p <sup>4</sup>	0,150	0,361	0,932	
Diferença	-0,3 (-0,8; 0,2)	-0,1 (-0,5; 0,3)	0,0 (-0,3; 0,4)	0,493 <sup>2</sup>
<i>Hematócrito (%)</i>				
Basal	41,6 (3,3)	38,9 (1,9)	41,5 (5,1)	0,295 <sup>1</sup>
30 dias	41,6 (1,7)	38,9 (1,9)	41,5 (5,2)	0,224 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,985	1,000	0,958	
Diferença **	0,1 (-1,9; 1,1)	0,2 (-1,0; 0,8)	0,2 (-1,7; 1,4)	0,914 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. \*\*variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil<sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação. Continuação

Desfecho	Placebo (n=7)	Prebiótico (n=8)	Simbiótico (n=7)	Valor-p
<i>Volume corpuscular médio (u2 fl)</i>				
Basal	85,7 (9,0)	86,2 (3,6)	85,2 (3,3)	0,956 <sup>1</sup>
30 dias	86,0 (8,5)	86,1 (3,8)	86,2 (3,4)	0,996 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,379	0,850	0,185	
Diferença **	0,3 (-0,4; 1,0)	0,2 (-1,2; 0,95)	0,4 (-0,1; 1,1)	0,593 <sup>2</sup>
<i>Hemoglobina corpuscular média (pg)</i>				
Basal	28,1 (3,4)	28,5 (1,8)	28,1 (1,5)	0,930 <sup>1</sup>
30 dias	27,8 (3,3)	28,2 (1,6)	28,3 (1,3)	0,911 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,094	<b>0,019</b>	0,917	
Diferença **	-0,3 (-0,7; 0,0)	-0,4 (-0,6; -0,1)	0,3 (-0,8; 0,5)	0,549 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. \*\*variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação. Continuação.

Desfecho	Placebo (n=7)	Prebiótico (n=8)	Simbiótico (n=7)	Valor-p
<i>Concentração da hemoglobina corpuscular média (g/dL)</i>				
Basal	32,8 (0,7)	33,1 (1,3)	33,0 (0,8)	0,850 <sup>1</sup>
30 dias	32,3 (1,0)	32,8 (1,2)	32,8 (0,6)	0,567 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	<b>0,014</b>	0,165	0,472	
Diferença **	-0,4 (-0,9; -0,2)	-0,2 (-0,8; 0,2)	-0,4 (-0,9; 0,3)	0,709 <sup>2</sup>
<i>Vitamina B12 (pg/mL)</i>				
Basal	436,9 (159,9)	389,6 (134,6)	496,0 (151,2)	0,399 <sup>1</sup>
30 dias	438,9 (178,2)	385,1 (144,3)	486,3 (123,4)	0,442 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,957	0,928	0,772	
Diferença **	8,0 (-76,0; 105,0)	4,0 (-93,5; 57,5)	28,0 (-30,0; 48,0)	0,919 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. \*\*variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro antes e após a suplementação. Continuação.

<b>Desfecho</b>	<b>Placebo (n=7)</b>	<b>Prebiótico (n=8)</b>	<b>Simbiótico (n=7)</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Ácido fólico (ng/mL)</i>				
Basal	14,4 (6,4)	12,2 (2,7)	17,0 (5,7)	0,222 <sup>1</sup>
30 dias	12,7 (5,8)	13,4 (6,0)	13,8 (3,0)	0,918 <sup>1</sup>
Valor-p <sup>3</sup>	0,548	0,625	0,122	
Diferença <sup>**</sup>	-1,8 (-8,6; 5,2)	1,0 (-3,0; 5,0)	-3,1 (-7,7; 2,0)	0,409 <sup>2</sup>

Legenda: As variáveis foram expressas em média e desvio padrão. <sup>\*\*</sup>variáveis expressas em mediana e intervalo interquartil <sup>1</sup> Teste de ANOVA.

<sup>2</sup> Teste de Kruskal Wallis <sup>3</sup>Teste T pareado; <sup>4</sup> Teste de Wilcoxon para dados pareados. Diferença: Valor final (30 dias) – valor basal.

## DISCUSSÃO

Os benefícios da suplementação de prebióticos e simbióticos já foram demonstrados em várias condições fisiopatológicas, porém seu impacto nos marcadores do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida ainda é desconhecido. A própria relação entre a microbiota intestinal e o metabolismo do ferro tem sido pouco investigada. Tanto que alguns marcadores importantes para avaliação do metabolismo do ferro ainda não aparecem nos estudos. Além disso, a maior parte das pesquisas são realizados *in vitro*, em ensaios experimentais em animais e alguns em crianças<sup>26</sup>.

Porém, a relação da obesidade com o metabolismo do ferro, vem sendo investigada há 40 anos e um número crescente de estudos sugere uma ligação potencial entre ambos. Uma das possíveis causas investigadas envolve a ingestão dietética deficiente de ferro<sup>27</sup>. Em nosso estudo a ingestão de ferro total estava de acordo com a Necessidade Média Estimada (*Estimated Average Requirement* - EAR), preconizado pela Ingestão Dietética de Referência (*Dietary Reference Intakes* - DRI), que indica uma ingestão de 8,1 mg/dia de ferro para uma população saudável<sup>28</sup>. Em relação a distinção entre os tipos de ferro heme e não-heme, nossos resultados revelaram maiores valores medianos de ferro não-heme, provenientes de alimentos de origem vegetal, em relação ao ferro heme, de origem animal (Tabela 2). Esses dados vão ao encontro dos achados do estudo de Menzie 2008, que encontrou em indivíduos obesos valores médios de ingestão 3,6 mg/dia e 14 mg/dia para ferro heme e não heme, respectivamente<sup>29</sup>.

É importante mencionar que as taxas de absorção destes nutrientes são diferenciadas em humanos, sendo aproximadamente 10 a 20 % para ferro não-heme e 90 % para o ferro heme<sup>7</sup>. Porém, a literatura aborda que alguns fatores dietéticos, como presença de ácido ascórbico, que podem facilitar a absorção do ferro não-heme proveniente da dieta. Em nossa população a mediana de ingestão da vitamina C no momento basal estava abaixo do valor preconizado pela

EAR (60 mg/dia), nos grupos placebo e simbiótico<sup>28</sup>. Após 30 dias de suplementação todos os grupos apresentaram aumento da mediana de ingestão deste nutriente, sendo estatisticamente significativa para o grupo placebo ( $p= 0,04$ ). Porém, apesar do aumento significativo desta vitamina, os valores médios de ferro sérico se mostraram reduzidos no momento final para esse grupo. Consistente com a falta de impacto clínico na ingestão de vitamina C sobre o ferro sérico, investigado em um estudo anterior, que demonstrou que a adição de 2.000 mg / dia de vitamina C à dieta por 2 anos não alteraram significativamente as reservas de ferro<sup>30</sup>.

Ainda, em relação entre as concentrações de ferro sérico e a ingestão dietética, encontramos que no grupo simbiótico a ingestão de ferro total, heme e não heme estavam reduzidas no momento final, porém as concentrações séricas de ferro apresentaram maiores valores médios após 30 dias de suplementação. Em culturas *in vitro*, foi demonstrado que a microbiota intestinal é capaz de aumentar a disponibilidade de ferro na dieta, diminuindo a quantidade de compostos ligantes de ferro no intestino pela conversão do ácido elágico em urolitina A, que não se liga ao  $Fe^{3+}$  e permanece biologicamente ativo na sua presença<sup>31</sup>. Ainda, em culturas *in vitro*, a presença de *Lactobacillus fermentum* na microbiota intestinal, devido ao ácido p-hidroxifenilático, mostrou uma atividade de redução de  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{2+}$ , facilitando a sua absorção pelos enterócitos<sup>32</sup>. Já um estudo, realizado em roedores *germ-free*, demonstrou que a ausência de bactérias intestinais leva a déficits de Fe nos enterócitos<sup>33</sup>. Em humanos, um estudo realizado em mulheres saudáveis, os níveis de absorção de Fe não-heme foram aumentados na presença da cepa *Lactobacillus plantarum*, quando comparado ao grupo controle<sup>34</sup>.

Já o grupo prebiótico apresentou redução das concentrações médias de ferro sérico e maiores valores medianos de ingestão dietética de ferro total e não-heme, após 30 dias de suplementação. Contudo, um estudo realizado em animais anêmicos, encontrou que o uso de

suplementação com inulina e oligofrutose é capaz de promover o aumento da expressão de proteínas que participam do metabolismo do ferro como proteína transportadora de metal bivalente 1 no ceco e a da citocromo b-redutase duodenal no cólon<sup>35</sup>.

Nos três grupos avaliados as concentrações médias de ferro sérico estavam de acordo com dos valores desejáveis antes e após a suplementação, vale salientar que estes valores estavam próximos ao limite inferior para mulheres, maior predominância neste estudo, nos dois momentos. Contudo, a avaliação do ferro sérico isoladamente apresenta limitações para identificação de deficiência de ferro, devendo ser analisado em combinação com os outros parâmetros como a saturação da transferrina e ferritina sérica<sup>36</sup>.

A saturação de transferrina é determinada pela relação entre ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro (CLFT), sendo reportado em porcentagem. Normalmente, a transferrina está saturada com 30% de ferro. Seus valores aumentam na sobrecarga de ferro e diminuem na deficiência do mesmo. Ainda, um aumento do ferro sérico devido à ingestão de ferro pode levar a maior saturação de transferrina<sup>36</sup>. Em nossos resultados houve um aumento no índice de saturação após a suplementação em todos os grupos. E, mesmo que sem significância ( $p=0,051$ ) o grupo simbiótico apresentou um maior aumento desse marcador no momento final (5,0 %). Porém, nesse mesmo grupo não houve aumento da ingestão de ferro. A especificidade do teste é limitada, porque tanto o ferro como a CLFT têm seus valores reduzidos na inflamação<sup>40</sup>.

Já a transferrina, principal proteína transportadora de ferro no plasma, aumenta na deficiência de ferro para maximizar a utilização de ferro disponível. A capacidade total de ligação de ferro é um teste alternativo para medir a transferrina. A CLFT reflete a disponibilidade de sítios de ligação de ferro com a transferrina. Valores aumentam em deficiência de ferro e diminuem em sobrecarga de ferro ou inflamação<sup>36,40</sup>. Nossos resultados revelaram valores reduzido em todos os grupos após a suplementação.



Para este parâmetro ainda é possível avaliar capacidade de ligação de ferro livre (CLFL), pelo método Ferene, e calcular o CLFT, somando o ferro sério a CLFL. Nosso estudo encontrou valores reduzidos deste marcador em todos os grupos no momento final, sendo estatisticamente significativo para o grupo simbiótico. Um estudo realizado em animais, que avaliou a suplementação com múltiplas cepas de probióticos, encontrou uma correlação positiva entre o nível de CLFL e o conteúdo de ferro no pâncreas, indicando que a diminuição na concentração sérica de ferro está relacionada ao aumento do nível deste marcador. Dados não encontrados em nosso estudo<sup>37</sup>.

Os valores séricos de ferritina estavam diminuídos no momento final nos grupos placebo e simbiótico. Estudo realizado em animais, que avaliou marcadores de armazenamento e transporte do ferro na presença ou ausência de microbiota intestinal, identificou que com a colonização em animais *germ-free*, houve uma maior indução da expressão de ferritina no cólon<sup>33</sup>. Contudo, este marcador também é uma proteína de fase aguda e pode estar aumentada em condições de inflamação<sup>36</sup>. Assim, a ferritina pode ser um marcador impreciso de reservas de ferro no corpo em pessoas com inflamação sistêmica<sup>38</sup>. Um estudo transversal que avaliou parâmetros do metabolismo do ferro em mulheres obesas e não obesas em idade reprodutiva mostrou uma correlação positiva entre ferritina sérica e PCR, marcador de inflamação sistêmica, indicando que o marcador ferritina não é um bom indicador das reservas de ferro em populações de obesos<sup>39</sup>.

Nesse contexto, em nosso estudo os parâmetros inflamatórios avaliados, IL-6 e PCR, não mostraram modificações significativas na avaliação entre os grupos. Contudo, todos os grupos apresentaram redução dos valores medianos de PCR e apenas o grupo prebiótico apresentou redução de IL-6, no momento final, indo ao encontro da maior redução de PCR entre os grupos (2,0).

Ao analisarmos os marcadores bioquímicos de compartimento funcional do ferro nesta população podemos verificar que no grupo prebiótico e placebo houve uma redução estatisticamente significativa para os marcadores de HCM e CHCM, respectivamente, após suplementação. Estes parâmetros avaliam a quantidade média e a concentração de hemoglobina presentes nas hemácias e fazem parte dos marcadores que sinalizam para uma possível alteração no estado do ferro, que não se mostrou deficiente de acordo com os outros parâmetros avaliados<sup>40</sup>. Porém, o baixo número de indivíduos avaliados e variabilidade dos dados não foram suficientes para detectar uma mudança significativa nos parâmetros avaliados.

É importante mencionar que, em indivíduos com inflamações crônicas, os marcadores do metabolismo do ferro podem ser influenciados pela inflamação e são considerados proteínas de fase aguda. A deficiência de ferro pode ser funcional, existindo reservas de ferro suficientes que, não são utilizadas de forma adequada. As citocinas inflamatórias expressas podem levar ao aumento da síntese de hepcidina, a qual regula negativamente o metabolismo do ferro, sendo necessário sua avaliação nesses indivíduos para melhor compreensão do mecanismo de homeostase de ferro na obesidade<sup>36</sup>.

Algumas limitações podem ser identificadas em nosso estudo, incluindo: a) os participantes não estavam em um ambiente controlado durante o período da pesquisa, tornando-os susceptíveis a mudanças no hábito de vida; b) o tamanho da amostra; c) duração relativamente curta da intervenção; d) ausência de avaliação dos níveis séricos de hepcidina; e) não avaliamos a composição da microbiota fecal basal e final; f) estudo não foi desenhado para avaliar o metabolismo do ferro, apesar disso foi possível controlar possíveis fatores de confusão relacionados a microbiota intestinal de acordo com rigorosos critérios de seleção da amostra. Apesar dessas limitações, é o primeiro estudo triplo-cego a investigar o efeito do fruto-oligossacarídeo e simbiótico de múltiplas cepas no metabolismo do ferro em pacientes com

obesidade mórbida. Destacando-se a originalidade e o desenho metodológico, especialmente no que se refere a redução de possíveis fonte de viés, como viés de seleção e informação.

## CONCLUSÃO

A suplementação de prebiótico e simbiótico por 30 dias nos indivíduos com obesidade mórbida não resultaram em mudanças estatisticamente significativas nos marcadores do metabolismo do ferro entre os grupos avaliados. Apesar de resultados significativos na redução dos parâmetros de reserva de ferro no grupo simbiótico, não é possível fazer inferência do uso dessa suplementação, já que este parâmetro se encontrava adequado no momento basal. Alguns parâmetros do metabolismo do ferro são considerados proteínas de fase aguda e, portanto, influenciados pela inflamação, presente nestes indivíduos. Assim, para averiguar a relação entre a obesidade, microbiota e *status* de ferro são necessários mais estudos em humanos, com maior representatividade amostral, que avaliem a microbiota intestinal e o marcador inflamatório do metabolismo do ferro, a hepcidina.

## REFERÊNCIAS

- 1- World Health Organization. Fact sheet on obesity and overweight, 2018. (Accessed Jul 8, 2018, at <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>).
- 2- Associação brasileira para o estudo da obesidade e síndrome metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, p. 85, 2016.
- 3- Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med* [Internet]. 2016;8(1):1–12.
- 4- Chatelier E Le, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013; 500(7464):541-546.

- 5- Okeke F, States U, Roland BC, States U, Mullin GE, States U. The Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis and Treatment of Obesity. 2014;3(3):44–57.
- 6- Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012 July 24; 29(51):5705–5724.
- 7- Yilmaz B. Gut Microbiota and Iron : The Crucial Actors in Health and Disease. 2018;1–20.
- 8- Wenzel BJ, Stults HB, Mayer J. Hypoferraemia in obese adolescents. *Lancet (London, England)*. 1962 Aug;2(7251):327–8.
- 9- Seltzer CC, Mayer J. Serum iron and iron-binding capacity in adolescents. II. Comparison of obese and nonobese subjects. *Am J Clin Nutr*. 1963 Dec;13:354–61.
- 10- Ruchala P, Nemeth E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends Pharmacol Sci [Internet]*. 2014;35(3):155–61.
- 11- Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev [Internet]*. 2013;93(4):1721–41.
- 12- John GK, Mullin GE. The Gut Microbiome and Obesity. *Curr Oncol Rep*. 2016 Jul;18(7).
- 13- David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505(7484):559-63. DOI: 10.1038/nature12820.
- 14- World Health Organization. WHO Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy. Geneva: World Health Organization, 2010.
- 15- World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
- 16- Conway JM, Ingwersen LA, Moshfegh AJ. Accuracy of dietary recall using the USDA five-step multiple-pass method in men: An observational validation study. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(4):595–603.

- 17- United States Department of Agriculture. Nutrient Database for standard Reference, 2018. (Accessed May 8, 2018, at <http://ndb.nal.usda.gov/>).
- 18- Brazilian Food Composition Table. São Paulo University (USP). Food Research Center (FoRC). Version 6.0. São Paulo, 2017. (Accessed May 8, 2018, at <http://www.fcf.usp.br/tbca/>).
- 19- Domene SMA. Técnica Dietética: teoria e aplicações, 1st edn. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014. (Title of the book in English: Dietetic Technique: theory and applications).
- 20- Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, et al. Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras, 4th edn. São Paulo: Atheneu, 2002. (Title of the book in English: Table for Evaluation of Food Consumption in Domestic Measures).
- 21- Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus, 2002. (Title of the book in English: Manual of recipes and domestic measures for the calculation of food surveys).
- 22- Fisberg RM, Marchioni DML. Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais: a experiência do inquérito de saúde em São Paulo (ISA). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2012.
- 23- Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65(4 Suppl):1220S-1228S; discussion 1229S-1231S. DOI: 10.1093/ajcn/65.4.1220S
- 24- Lacy BE, Mearin F, Chang L. et al. Bowel disorders. *Gastroenterology* 2016;150(6):1393-1407. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.02.031
- 25- Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(9):920-4. DOI: 10.3109/00365529709011203

- 26- Skrypnik D, Karolkiewicz J, Skrypnik K, Madry E, Szulinska M, Pupek-Musialik D, et al. Effect of endurance and endurance-strength training on calcium, iron, magnesium, zinc and copper balance in women with abdominal obesity. *Obes Facts* [Internet]. 2018;11:94-95.
- 27- Cheng HL, Bryant C, Cook R, O'Connor H, Rooney K, Steinbeck K. The relationship between obesity and hypoferraemia in adults: a systematic review. *Obes Rev*. 2012 Feb;13(2):150–61.
- 28- Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, vitamin C, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington (DC): National Academy Press; 2002
- 29- Menzie CM, Yanoff LB, Denkinger BI, McHugh T, Sebring NG, Calis KA, et al. Obesity-related hypoferremia is not explained by differences in reported intake of heme and nonheme iron or intake of dietary factors that can affect iron absorption. *J Am Diet Assoc*. 2008 Jan;108(1):145–8.
- 30- Cook JD, Reddy MB. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *J Clin Nutr*. 2001;73:93–8.
- 31- Saha P, Yeoh S, Singh R, Chandrasekar B. Gut Microbiota Conversion of Dietary Ellagic Acid into Bioactive Phytochemical Urolithin A Inhibits Heme Peroxidases. 2016;1–21.
- 32- Gonzalez A, Galvez N, Martin J, Reyes F, Perez-Victoria I, Dominguez-Vera JM. Identification of the key excreted molecule by *Lactobacillus fermentum* related to host iron absorption. *Food Chem*. 2017 Aug;228:374–80.
- 33- Deschemin J, Noordine M, Remot A. The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. 2019.

- 34- Hoppe M, Onning G, Berggren A, Hulthen L. Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v increases iron absorption from an iron-supplemented fruit drink: a double-isotope cross-over single-blind study in women of reproductive age. *Br J Nutr*. 2015 Oct;114(8):1195–202.
- 35- Marciano R, Santamarina AB, de Santana AA, Silva M de LC, Amancio OMS, do Nascimento CM da PO, et al. Effects of prebiotic supplementation on the expression of proteins regulating iron absorption in anaemic growing rats. *Br J Nutr*. 2015 Mar;113(6):901–8.
- 36- Kelly AU, Mccorley ST. Interpreting iron studies. 2017;2513:1–6.
- 37- Skrypnik K, Bogdanski P, Schmidt M, Suliburska J. The Effect of Multispecies Probiotic Supplementation on Iron Status in Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2019 Feb;
- 38- Davis RAH, Plaisance EP, Allison DB. Complementary Hypotheses on Contributors to the Obesity Epidemic. *Obesity*. 2018;26(1):17–21.
- 39- Aeberli IH, Thankachan P, Bose B, Kurpad A V. Increased risk of iron deficiency and reduced iron absorption but no difference in zinc , vitamin A or B - vitamin status in obese women in India. *Eur J Nutr*. 2016;55(8):2411–21.
- 40- Grotto HZW. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro Laboratory diagnosis of iron deficiency anemia. 2010.

#### **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Este estudo foi financiado com recursos próprios do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Os suplementos foram gentilmente doados pela empresa Invictus FarmaNutrição®. Não houve envolvimento de nenhuma instituição na condução da pesquisa e na preparação do artigo.

#### **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos ao autor principal e a outros co-autores deste trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e à Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio à pesquisa e financiamento dos reagentes utilizados. Ao Prof.º Dr. Everson Araújo Nunes do Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC) e à Prof.ª Dr.ª Tânia Silvia Fröde do Laboratório de Imunologia Clínica - UFSC, por disponibilizarem o uso destes laboratórios para o processamento das amostras biológicas. À Invictus FarmaNutrição® pela doação dos suplementos. Aos profissionais do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago - UFSC, pelo apoio na coleta das amostras de sangue e no recrutamento dos indivíduos, em especial, ao Prof. Dr. Emerson Leonildo Marques e ao Serviço de Endocrinologia e Metabologia. À Prof.ª Dr.ª Francilene Graciele Kunradi Vieira, pelo auxílio na análise da ingestão dietética. E, por último, aos participantes do estudo, pela disponibilidade em participar desta pesquisa.

### **DECLARAÇÃO DE AUTORIA**

Luana Pucci de Lima realizou a concepção e desenho do estudo, participou da coleta, análise e interpretação dos dados, da escrita do manuscrito e aprovou a versão final a ser submetida.

Júlia Pessini participou da análise dos dados, revisou o conteúdo do manuscrito e aprovou a versão final a ser submetida.



Victoria Silva e Jonck participou da análise dos dados, revisou o conteúdo do manuscrito e aprovou a versão final a ser submetida.

Ricardo Fernandes participou da coleta e análise dos dados, revisou o conteúdo do manuscrito e aprovou a versão final a ser submetida.

Lote Miguel Manuel participou da coleta de dados, revisou o conteúdo do manuscrito e aprovou a versão final a ser submetida.

Erasmus Benicio Santos de Moraes Trindade realizou a concepção e desenho do estudo, análise e interpretação dos dados, revisou o conteúdo do manuscrito e aprovou a versão final a ser submetida.

## **MATERIAL SUPLEMENTAR**

**TÍTULO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E SIMBIÓTICO EM MARCADORES DO METABOLISMO DO FERRO EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, PLACEBO-CONTROLADO E TRIPLO CEGO.**

**Autores:** Luana Pucci de Lima<sup>a</sup>, Julia Pessini<sup>a</sup>, Victoria Silva e Jonck<sup>b</sup>, Ricardo Fernandes<sup>a</sup>, Lote Miguel Manuel<sup>a</sup>, Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade<sup>c</sup>.

### **Afiliação:**

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

<sup>b</sup>Curso de Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.  
CEP: 88040-900.

<sup>c</sup>Departamento de Nutrição e Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

**Material suplementar S1 - Orientação nutricional oferecida aos participantes durante a pesquisa.**

## **ORIENTAÇÕES NUTRICIONAIS**

### **Retirar/Evitar na alimentação:**

- Embutidos (salsicha, linguiça, bacon, mortadela, salame, etc.)
- Enlatados e conservas
- Temperos industrializados (*marcas nacionais foram mencionadas, mas foram omitidas aqui no artigo*)
- Chocolate
- Bebida alcoólica e refrigerante
- Açúcar refinado
- Evitar adoçar os alimentos. Em caso de extrema necessidade: adoçante à base de Stévia.

### **Incluir na alimentação:**

- 2 litros de água e consumir chás e sucos (sugestão: água saborizada – acrescentar hortelã, alecrim, cravo, canela, gengibre).
- Frutas como: abacaxi, melancia, melão, goiaba, acerola, morango (3-4 porções/dia)

- Folhosos verde-escuros: couve, hortelã, alface e rúcula (2x/dia).
- Alimentos integrais ao invés de refinados (arroz integral, aveia, pão integral, granola sem açúcar, etc.).
- Leguminosas: feijão (todos os tipos), lentilha, soja, quinoa, amaranto.
- Carnes magras (de preferência brancas): peixe, frutos do mar, frango sem pele, ovos (de preferência caipira e não fritos).
- Controlar o consumo de sal, evitar excessos. Não levar o saleiro à mesa. Temperar a salada somente com azeite de oliva e limão. Pode acrescentar linhaça, gergelim, etc.

### **DICAS**

- Não pule nenhuma refeição. Faça 3 grandes refeições (café da manhã, almoço e janta) e 2-3 pequenos lanches entre as grandes refeições.
- Prepare todo e qualquer tipo de carne retirando toda a gordura aparente e/ou peles.
- Alimentos como: azeite de oliva, sementes de linhaça, de girassol, peixes, aveia, farinha de mandioca, soja e leite de soja auxiliam no combate ao colesterol elevado.
- A castanha de caju granulada pode também ser usada para temperar as saladas, assim como o azeite de oliva, suco de limão, gergelim ou linhaça (use 1 colher de sopa).
- Manter horário regular para as refeições (não ultrapassar 3 horas sem comer).
- Mastigar bem os alimentos (tempo mínimo para cada refeição de 20 min para as grandes refeições e 10 minutos para as pequenas refeições, apreciar e sentir o sabor dos alimentos); a comida deve ser engolida quando em consistência pastosa.
- Evitar líquidos durante as refeições. Espere no mínimo 40 minutos para beber água ou sucos.

**Material suplementar S2 - Orientações aos participantes durante o período da suplementação.**

**Durante o período da pesquisa (30 dias), evitar:**

- Praticar atividade física intensa, ou seja, correr velozmente, caminhada veloz em colina/montanha (por exemplo, em trilhas), pedalada rápida, ginástica aeróbica, natação rápida, carregar cargas pesadas (> 20 kg).
- Consumir bebida alcoólica.
- Consumir alimentos enriquecidos com prebióticos, probióticos ou simbióticos, tais como:
  - Kefir
  - Kimchii
  - Missoshiro
  - Chucrute
  - Coalhada
  - Molho shoyu (ou molho de soja)
  - Alguns tipos de iogurtes (*Marcas de iogurtes nacionais enriquecidos com probióticos foram mencionadas, mas serão omitidas aqui no artigo*)
  - Leite fermentado (*Marcas de leite fermentado nacional foram mencionadas, mas serão omitidas aqui no artigo*).

**IMPORTANTE:** Sempre olhar o rótulo para se certificar de que o produto não contenha prebiótico e probiótico. Palavras como “fibras” na embalagem são sinônimos para prebióticos e palavras como “cultura viva” e “cultura ativa” na embalagem também são sinônimos para probióticos.

**Observação: Ao uso de qualquer medicamento ou suplemento nutricional, anotar o nome, dose e tempo utilizado.**

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo buscou compreender o efeito da suplementação de prebiótico e simbiótico nos marcadores do metabolismo do ferro em indivíduos com obesidade mórbida. E averiguar a relação entre obesidade, microbiota intestinal e metabolismo do ferro.

Apesar de nossos resultados não mostrarem mudanças significativas nos marcadores do metabolismo do ferro entre os grupos avaliados, podemos observar que, existe uma relação entre a obesidade, microbiota e *status* do ferro, ainda que pouco estudada. E que a influência da inflamação nos marcadores do metabolismo do ferro pode mascarar uma possível deficiência de ferro nesses indivíduos.

Portanto, para averiguar a relação entre a obesidade, microbiota e *status* de ferro e uma possível influência benéfica do uso de prebiótico e simbiótico, se faz necessário: mais estudos em indivíduos com obesidade, com maior representatividade amostral, que avaliem a microbiota intestinal e o marcador de inflamação do metabolismo do ferro, hepcidina.

## REFERÊNCIAS

ABESO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010**. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, p. 85, 2016.

AEBERLI, I.; HURRELL, R. F.; ZIMMERMANN, M. B. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 10, p. 1111–1117, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (Brasil). Manual de enfrentamento manual de diretrizes para o enfrentamento da obesidade na saúde suplementar brasileira. Brasil, 2017.

AREZES, J.; NEMETH, E. Hepcidin and iron disorders: New biology and clinical approaches. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, n. S1, p. 92–98, 2015.

AUSK, K. J.; IOANNOU, G. N. Is Obesity Associated with Anemia of Chronic Disease? A Population-Based Study. **Obesity** (Silver Spring, Md.), v. 16, n. 10, p. 2356–2361, out. 2008.  
BALAMURUGAN, R.; MARY, R. R.; CHITTARANJAN, S.; JANCY, H.; SHOBANA DEVI, R.; RAMAKRISHNA, B. S. Low Levels of Faecal Lactobacilli in Women with Iron-Deficiency Anaemia in South India. *The British journal of nutrition*, v. 104, n. 7, p. 931–934, out. 2010.

BECKER, C.; OROZCO, M.; SOLOMONS, N. W.; SCHÜMANN, K. Iron metabolism in obesity: How interaction between homeostatic mechanisms can interfere with their original purpose. Part I: Underlying homeostatic mechanisms of energy storage and iron metabolisms and their interaction. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 195–201, 2015.

BESERRA, B. et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycaemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 845-858, 2015.

BINDELS, L. B. et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015.

BOULANGÉ, C. L.; NEVES, A. L.; CHILLOUX, J.; NICHOLSON, J. K.; DUMAS, M. E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2016.

BOUTER, K. E.; VAN RAALTE, D. H.; GROEN, A. K.; NIEUWDORP, M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1671–1678, 2017.

BLUM, H. E. The human microbiome. **Advances in Medical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 414–420,

2017.

CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; MATON, N.; DELZENNE, N. M. Oligofructose Promotes Satiety in Rats Fed a High-Fat Diet: Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. **Obesity Research**, v. 13, n. 6, p. 1000–1007, 2005.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v.56, n. 7, p.1761–1772, 2007.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Iron in infection and immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 5, p. 509–519, 2013.

CHENG, H. L. et al. Iron, Hepcidin and Inflammatory Status of Young Healthy Overweight and Obese Women in Australia. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68675, 2013.

CHENG, H. L.; BRYANT, C.; COOK, R.; O'CONNOR, H.; ROONEY, K.; STEINBECK, K. The Relationship between Obesity and Hypoferraemia in Adults: A Systematic Review. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 13, n. 2, p. 150–161, fev. 2012.

COFFEY, R.; GANZ, T. Iron Homeostasis--an Anthropocentric Perspective. **The Journal of biological chemistry**, p. jbc.R117.781823, 2017.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (Brasil). Resolução nº 2.131/2015. Brasília, DF, 2015.

CONWAY, J. M.; INGWERSEN, L. A.; MOSHFEGH, A. J. Accuracy of dietary recall using the USDA five-step multiple-pass method in men: An observational validation study. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 4, p. 595–603, 2004.

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

DAHER, R.; KARIM, Z. Iron metabolism: State of the art. **Transfusion Clinique et Biologique**, 2017.

DAVIS, R. A. H.; PLAISANCE, E. P.; ALLISON, D. B. Complementary Hypotheses on Contributors to the Obesity Epidemic. **Obesity**, v. 26, n. 1, p. 17–21, 2018.

DE DOMENICO, I.; MCVEY WARD, D.; KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: Consequences for iron-linked disorders. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 72–81, 2008.

DESCHEMIN, J.; NOORDINE, M.; REMOT, A. The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. 2019.

DHURANDHAR, E. J.; KEITH, S. W. The aetiology of obesity beyond eating more and



exercising less. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 533–544, 2014.

DOMENE, S. M. A. **Técnica Dietética: teoria e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014.

DOSTAL, A.; FEHLBAUM, S.; CHASSARD, C.; ZIMMERMANN, M. B.; LACROIX, C. Low Iron Availability in Continuous in Vitro Colonic Fermentations Induces Strong Dysbiosis of the Child Gut Microbial Consortium and a Decrease in Main Metabolites. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 1, p. 161–175, jan. 2013.

DROSSMAN, D. A. et al. **Rome III: the functional gastrointestinal disorders**. 3 ed. McLean, 8 p. 2006.

EVERARD, A. et al. Cross-Talk between Akkermansia Muciniphila and Intestinal Epithelium Controls Diet-Induced Obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, maio 2013.

EVSTATIEV, R.; GASCHE, C. Iron sensing and signalling. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 933–952, 2012. \_\_\_\_\_ . **Expert committee on physical status: the use and interpretation of anthropometry. Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Report of a WHO expert committee. WHO technical report series, 854. Geneva: WHO, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet: obesity and overweight 2018**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: julho 2019.

FERNANDES, R. et al. Effects of prebiotic and synbiotic supplementation on inflammatory markers and anthropometric indices after Roux-en-Y gastric bypass: a randomized, triple blind, placebo-controlled pilot study. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, n. 3, p. 208-217, 2016.

FERNANDES, R.; DO ROSARIO, V. A.; MOCELLIN, M. C.; KUNTZ, M. G. F.; TRINDADE, E. B. S. M. Effects of inulin-type fructans, galacto-oligosaccharides and related synbiotics on inflammatory markers in adult patients with overweight or obesity: A systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 1197–1206, 2017.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L. **Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais: a experiência do inquérito de saúde em São Paulo (ISA)**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2012.

FISBERG, R. M., VILLAR, B. S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares**. São Paulo: Signus, 2002.

FONTANA, L. et al. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 35-50, 2013. Suplemento 2.

GANZ, T.; OLBINA, G.; GIRELLI, D.; NEMETH, E.; WESTERMAN, M. Immunoassay for human serum hepcidin. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 4292–4297, 2008.

GANZ, T. Systemic Iron Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1721–1741, 2013.  
GANZ, T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 8, p. 500–10, 2015.

GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **Engl J Med**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

GÉRARD, P. REVIEW - Gut microbiota and obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 147–162, 2016.

GHOSHAL, S. et al. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 90–97, 2009.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GONZALEZ, A.; GALVEZ, N.; MARTIN, J.; REYES, F.; PEREZ-VICTORIA, I.; DOMINGUEZ-VERA, J. M. Identification of the Key Excreted Molecule by *Lactobacillus Fermentum* Related to Host Iron Absorption. **Food chemistry**, v. 228, p. 374–380, ago. 2017.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 415-445, 2011.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 08–17, 2010.

GUARNER, F. et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines: probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v. 46, n. 81, p. 468, 2012.

GUARNER, F. et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, n. 468-81, 2012.

GKOUVATSOS, K.; PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 188–202, 2012.

HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J.; FOEY, A. D. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 1869–1912, maio 2013.

HENRIQUES, G. S. Ferro. In: COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, Cristiane. **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença.**

1ª ed, São Paulo: Manole, cap 10, p. 229-250, 2013.

HOPPE, M.; ONNING, G.; BERGGREN, A.; HULTHEN, L. Probiotic Strain *Lactobacillus Plantarum* 299v Increases Iron Absorption from an Iron-Supplemented Fruit Drink: A Double-Isotope Cross-over Single-Blind Study in Women of Reproductive Age. **The British journal of nutrition**, v. 114, n. 8, p. 1195–1202, out. 2015.

INVICTUS. **FIBERFOS®**. Disponível em: <<http://www.bacteriasdobeminvictus.com.br/fiberfos>>. Acesso em: 18 fev. 2018a.

INVICTUS. **Simbioflora®**. Disponível em: <<http://www.bacteriasdobeminvictus.com.br/simbioflora>>. Acesso em: 18 fev. 2018b.

IOM. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference intake: application in Dietary Assessment**. Washington (DC): National Academic Press; 285p, 2001.

JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 218-238, 2012.

KHANNA, S. Microbiota Replacement Therapies: Innovation in Gastrointestinal Care. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 103, n. 1, p. 102–111, 2018. KINROSS, J. M. et al. The human gut microbiome: Implications for future health care. **Current Gastroenterology Reports**, v. 10, n. 4, p. 396-403, 2008.

KORTMAN, G. A. M.; RAFFATELLU, M.; SWINKELS, D. W.; TJALSMA, H. Nutritional iron turned inside out: intestinal stress from a gut microbial perspective. v. 38, p. 1202–1234, 2014

KORTMAN, G. A. M.; DUTILH, B. E.; MAATHUIS, A. J. H.; ENGELKE, U. F.; BOEKHORST, J.; KEEGAN, K. P.; NIELSEN, F. G. G.; BETLEY, J.; WEIR, J. C.; KINGSBURY, Z.; KLUIJTMANS, L. A. J.; SWINKELS, D. W.; VENEMA, K.; TJALSMA, H. Microbial Metabolism Shifts Towards an Adverse Profile with Supplementary Iron in the TIM-2 In Vitro Model of the Human Colon. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1481, 2015.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541-546, 2013.

LECUBE, A.; CARRERA, A.; LOSADA, E.; HERNANDEZ, C.; SIMO, R.; MESA, J. Iron Deficiency in Obese Postmenopausal Women. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14, n. 10, p. 1724–1730, out. 2006.

LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. 9, p. 920–924, 1997.

LIN, F.; WU, H.; ZENG, M.; YU, G.; DONG, S.; YANG, H. Probiotic/prebiotic Correction for Adverse Effects of Iron Fortification on Intestinal Resistance to Salmonella Infection in Weaning Mice. *Food & function*, v. 9, n. 2, p. 1070–1078, fev. 2018.

MARTINEZ, K. B.; PIERRE, J. F.; CHANG, E. B. The Gut Microbiota: The Gateway to Improved Metabolism. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 45, n. 4, p. 601–614, 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigitel Brasil 2016: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico*. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2017.

MENZIE, C. M. et al. Obesity-Related Hypoferremia Is Not Explained by Differences in Reported Intake of Heme and Nonheme Iron or Intake of Dietary Factors That Can Affect Iron Absorption. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 108, n. 1, p. 145–148, jan. 2008.

MEVISSEN-VERHAGE, E. A. E. et al. Effect of Iron on Neonatal Gut Flora During the First Week of Life. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, v. 4, n. 1, p. 14–15, 1985.

MISETA, A.; NAGY, J.; NAGY, T.; POÓR, V. S.; FEKETE, Z.; SIPOS, K. Hepcidin and its potential clinical utility. *Cell Biology International*, v. 39, n. 11, p. 1191–1202, 2015.

MOAYERI, H.; BIDAD, K.; ZADHOUSH, S.; GHOLAMI, N.; ANARI, S. Increasing Prevalence of Iron Deficiency in Overweight and Obese Children and Adolescents (Tehran Adolescent Obesity Study). *European journal of pediatrics*, v. 165, n. 11, p. 813–814, nov. 2006.

NEMETH, E. et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, v. 306, n 5704, p. 2090-2093, 2004.

NIKONOROV, A. A.; SKALNAYA, M. G.; TINKOV, A. A.; SKALNY, A. V. Mutual Interaction between Iron Homeostasis and Obesity Pathogenesis. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, v. 30, p. 207–214, abr. 2015.

OKEKE, F.; STATES, U.; ROLAND, B. C.; STATES, U.; MULLIN, G. E.; STATES, U. The Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis and Treatment of Obesity. v. 3, n. 3, p. 44–57, 2014.

\_\_\_\_\_. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report of a World Health Organization Consultation. WHO Technical Report Series, n. 284. Geneva: WHO, 2000.

PAGANINI, D.; UYOGA, M. A.; KORTMAN, G. A. M.; CERCAMONDI, C. I.; WINKLER, H. C.; BOEKHORST, J.; MORETTI, D.; LACROIX, C.; KARANJA, S.; ZIMMERMANN, M. B. Iron-Containing Micronutrient Powders Modify the Effect of Oral Antibiotics on the Infant Gut Microbiome and Increase Post-Antibiotic Diarrhoea Risk: A Controlled Study in Kenya. *Gut*, v. 68, n. 4, p. 645–653, abr. 2019.

PANTOPOULOS, K. et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**. July 24; v. 51, n. 29, p. 5705–5724, 2012.

PEREZ-CORNAGO, A. et al. Prebiotic consumption and the incidence of overweight in a Mediterranean cohort: the Seguimiento Universidad de Navarra Project. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 6, p. 1554-1562, 2015.

PINHEIRO, A. B. V. et al. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 2 Ed. Rio de Janeiro: Grupo de nutrição materno-infantil, 2002.

POWER, S. E.; O'TOOLE, P. W.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F. Intestinal Microbiota, Diet and Health. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 3, p. 387–402, 2014.

RUCHALA, P.; NEMETH, E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 3, p. 155–161, 2014.

\_\_\_\_\_. Resolução-RE n.º 4.858, de 14 de novembro de 2012. Conceder a Alteração, Retificação, Revalidação, Declaração de Caducidade, Cancelamento e o Desarquivamento dos processos dos Produtos para a Saúde Concede alteração de unidade fabril e inclusão de marca. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 nov. 2012. Seção 1, p.13. Suplemento.

\_\_\_\_\_. Resolução-RE n.º 35, de 4 de janeiro de 2013. Concede alteração de unidade fabril e inclusão de marca. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2013a.

\_\_\_\_\_. Resolução n.º 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2013b.

RICKHAM, P. P. Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5402, p. 177, 1964.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3 p. 830S-837S, 2007. Suplemento 2.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, S1e63, 2010. Suplemento 2.

ROCHETTE, L. et al. The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 146, p. 35–52, 2015.

ROSENBAUM, M.; KNIGHT, R.; LEIBEL, R. L. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 9, p. 493–501, 2015.

SABATER-MOLINA, M. et al. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 315-328, 2009.

SARAFIDIS, P. et al. The relationship between obesity and hepcidin levels in haemodialysis

- patients. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 27, n. 2, p. 483–484, 2012.
- SELTZER, C. C.; MAYER, J. Serum iron and iron-binding capacity in adolescents. Ii. Comparison of obese and nonobese subjects. **The American journal of clinical nutrition**, v. 13, p. 354–361, dez. 1963.
- SOUZA, M. de F. M. de S.; FRANÇA, E. B.; CAVALCANTE, A. Carga de doença e análise da situação de saúde: resultados da rede de trabalho do Global Burden of Disease (GBD) Brasil. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 20, p. 1-3, maio, 2017. Suplemento 1.
- SKRYPNIK, K.; SULIBURSKA, J. Association between the Gut Microbiota and Mineral Metabolism. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2449–2460, maio 2018.
- SKRYPNIK, K.; BOGDANSKI, P.; SCHMIDT, M.; SULIBURSKA, J. The Effect of Multispecies Probiotic Supplementation on Iron Status in Rats. **Biological trace element research**, fev. 2019.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 6.0. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tbca/>>. Acesso em 10 de maio de 2018.
- TRAYHURN, P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. **Annual Review of Nutrition**, v. 34, p. 207-236, 2014.
- TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, 2006.
- TUSSING-HUMPHREYS, L.; PUSATCIOGLU, C.; NEMETH, E.; BRAUNSCHWEIG, C. Rethinking Iron Regulation and Assessment in Iron Deficiency, Anemia of Chronic Disease, and Obesity: Introducing Hepcidin. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 3, p. 391–400, mar. 2012.
- USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Nutrient Database for standard Reference**. 2018. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/>>. Acesso em 10 de maio de 2018.
- WALLACE, D. F. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. **Clin Biochem Rev**. 37, n. 2, p. 51–62, 2016.
- WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365–381, 2011.
- WENZEL, B. J.; STULTS, H. B.; MAYER, J. Hypoferraemia in Obese Adolescents. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7251, p. 327–328, ago. 1962.
- \_\_\_\_\_. **WHO Guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva: WHO, 2010.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 4, suppl. 1220-1228, 1997.

YANG, B. G.; HUR, K. Y.; LEE, M. S. Alterations in gut microbiota and immunity by dietary fat. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 6, p. 1083–1091, 2017.

YILMAZ, B. Gut Microbiota and Iron : The Crucial Actors in Health and Disease. p. 1–20, 2018.

ZIMMERMANN, M. B.; CHASSARD, C.; ROHNER, F.; N'GORAN, E. K.; NINDJIN, C.; DOSTAL, A.; UTZINGER, J.; GHATTAS, H.; LACROIX, C.; HURRELL, R. F. The Effects of Iron Fortification on the Gut Microbiota in African Children: A Randomized Controlled Trial in Cote d'Ivoire. **The American journal of clinical nutrition**, v. 92, n. 6, p. 1406–1415, dez. 2010.

## **Apêndice A – Orientações aos pacientes durante o período da suplementação**

### **Durante o período da pesquisa (60 dias), evitar:**

- Praticar atividade física intensa, ou seja, correr velozmente, caminhada veloz em colina/montanha (por exemplo, em trilhas), pedalada rápida, ginástica aeróbica, natação rápida, carregar cargas pesadas (> 20 kg).
- Consumir bebida alcoólica.
- Consumir alimentos enriquecidos com prebióticos, probióticos ou simbióticos, tais como:
  - Kefir
  - Kimchii
  - Missoshiro
  - Chucrute
  - Coalhada
  - Molho shoyu (ou molho de soja)
  - Alguns tipos de iogurtes (Activia<sup>®</sup>, Actimel<sup>®</sup>, Pense Bio Fibras<sup>®</sup>, Sofyl<sup>®</sup>, Piá Essence<sup>®</sup>, Biociclos<sup>®</sup>, entre outros)
  - Leite fermentado (Yakult<sup>®</sup>, Chamyto<sup>®</sup>, Danito<sup>®</sup>, Batavito<sup>®</sup>, entre outros).

**IMPORTANTE:** Sempre olhar o rótulo para se certificar de que o produto não contenha prebiótico e probiótico. Palavras como “fibras” na embalagem são sinônimos para prebióticos e palavras como “cultura viva” e “cultura ativa” na embalagem também são sinônimos para probióticos.

**Observação:** Ao uso de qualquer medicamento ou suplemento nutricional, anotar o nome, dose e tempo utilizado.



## **Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O(A) Senhor(a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, numa pesquisa científica resultante de parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina e o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU). Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família, para que a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Caso aceite fazer parte do estudo assine ao final deste documento (nas duas vias). Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

**1. Instituição sede da pesquisa:** Departamento de Nutrição (NTR) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) no Campus Trindade (Florianópolis-SC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Telefone fixo: (48) 3721-9784 (ramal 23).

**2. Título do projeto:** Efeito da suplementação de prebiótico e simbiótico sobre a resposta inflamatória e indicadores do estado nutricional em indivíduos com obesidade mórbida: um ensaio clínico, randomizado, placebo-controlado e triplo cego.

**3. Pesquisador responsável:** Prof. Dr. Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade.

**4. Garantia de informação e desistência:** O(A) Senhor(a) será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer ponto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação, a qualquer momento. Mesmo que o(a) Senhor(a) não queira participar do estudo, não haverá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao seu tratamento e aos cuidados que tenha direito a receber.

**5. Descrição do estudo:** A pesquisa acontecerá no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, localizado no Campus Universitário, município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. Serão convidados a participar do estudo pessoas com diagnóstico de obesidade mórbida. Neste estudo, pretende-se avaliar se a suplementação de prebiótico ou simbiótico apresenta benefícios à saúde humana. Prebióticos são produtos alimentares não digeridos pelo corpo e que estimulam o crescimento de bactérias benéficas no intestino. *Probióticos* são micróbios vivos (ou bactérias vivas) que, quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem benefícios à saúde humana. Essas bactérias são consideradas seguras para o consumo, desde que consumidas na dose correta. Já os simbióticos são produtos que contêm

tanto prebióticos quanto probióticos. Entre os benefícios que estes suplementos podem trazer, destaca-se a melhora da saúde do intestino e a melhora da defesa do organismo, além de auxiliar na perda de peso. Apesar disso, é importante destacar que todos estes benefícios foram observados em indivíduos sem obesidade ou com outras doenças. Em seres humanos com obesidade, ainda existe dúvida se estes suplementos podem trazer todos estes benefícios. Assim, o resultado da pesquisa pode trazer informações importantes para indivíduos que tem esta condição de saúde (obesidade).

Caso aceite participar, serão coletados: dados do prontuário; peso, altura e circunferência da cintura; amostras de sangue para avaliação em laboratório.

As avaliações serão realizadas em quatro momentos: na primeira consulta, 15, 30 e 60 dias após a primeira consulta. O Senhor(a) receberá um tipo específico de suplemento (placebo OU prebiótico OU simbiótico) na quantidade de 12 gramas por dia. A ingestão dos suplementos terá duração de 30 dias, e será iniciada logo após a primeira consulta no respectivo ambulatório. Após este período a suplementação será encerrada, mas o Senhor(a) será acompanhado por mais 30 dias, totalizando 60 dias de pesquisa. Em todos os momentos da pesquisa (0, 15, 30 e 60 dias) haverá coleta de dados clínicos, de sangue, de peso, altura e circunferência da cintura.

É importante esclarecer que haverá uso de placebo (substância inativa). Neste estudo, o placebo que será utilizado é a maltodextrina, um produto alimentar proveniente do amido de milho. A suplementação com placebo é necessária para verificar se a suplementação de prebiótico ou simbiótico traz benefícios à saúde de indivíduos obesos comparado aos indivíduos que são suplementados com uma substância inativa.

É importante deixar claro que o(a) Senhor(a) não poderá escolher qual suplemento quer receber. Durante o período da pesquisa, nem o(a) Senhor(a), nem os pesquisadores terão conhecimento de qual suplemento o(a) Senhor(a) recebeu, apenas ao término do estudo será revelado qual suplemento foi fornecido. Em todos os quatro momentos do estudo será necessário que o(a) Senhor(a) forneça 20 mL de sangue (totalizando 80 mL na soma dos quatro momentos) que serão coletados pela equipe do laboratório de análises clínicas do HU. Essas amostras de sangue serão usadas para dosagem de substâncias e células que servirão de indicadores para os possíveis efeitos do prebiótico e simbiótico. Além disso, haverá contatos telefônicos uma vez por semana, a fim de acompanhar o andamento do estudo.

Caso o(a) Senhor(a) não aceite a suplementação, solicito a utilização dos dados do seu prontuário. Reafirmo o compromisso ético da não violação destas informações.

**6. Riscos e desconfortos:** Os efeitos prejudiciais decorrentes da suplementação de prebiótico e simbiótico não são frequentes, entretanto, pode ocorrer aumento de gases, náuseas e dor na barriga. Estudos em indivíduos sem obesidade ou que realizaram cirurgia de redução do estômago não apresentaram efeitos prejudiciais à saúde humana após a suplementação dessas substâncias. Caso o(a) Senhor(a) aceite participar do estudo e ocorra algum desconforto após o início da suplementação, favor interromper o consumo e entrar em contato com os pesquisadores. Importante: Se você for alérgico a prebiótico e/ou simbiótico e/ou maltodextrina, NÃO aceite participar do estudo. No que diz respeito à coleta de sangue, pode existir desconforto decorrente da entrada da agulha e retirada do sangue. Com relação à coleta de peso, altura e circunferência da cintura, o estudo não prevê riscos. Ainda assim, se houver qualquer dano à sua saúde decorrente da sua participação na pesquisa, o(a) Senhor(a) receberá todo o tratamento gratuitamente, inclusive despesas com transporte ou medicamentos, sem custos para o(a) Senhor(a), assim como terá direito à indenização por danos, por parte do pesquisador e da instituição envolvida nas diferentes fases da pesquisa.

**7. Benefícios:** Ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto (financeiro, por exemplo). Entretanto, esperamos que este estudo contribua com informações importantes à ciência. Os resultados podem trazer benefícios a todos os seres humanos com obesidade mórbida.

**8. Custos:** O(a) Senhor(a) não terá nenhum gasto com a pesquisa, uma vez que os procedimentos serão feitos na própria instituição onde é realizado o tratamento da obesidade e os suplementos serão doados pelo pesquisador.

**9. Esclarecimentos e dúvidas:** Se o(a) Senhor(a) tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato com o pesquisador responsável, Prof. Dr. Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade, com o doutorando Ricardo Fernandes pelos seguinte meios: telefone fixo: (48) 3721-9784 (ramal 23); telefone celular: (48) 9615-6587 / 9997-9941; e-mail: [erasmotrindade@gmail.com](mailto:erasmotrindade@gmail.com); [ricardontr@gmail.com](mailto:ricardontr@gmail.com). O(a) Senhor(a) pode também entrar em contato com o pesquisador responsável, Prof. Dr. Erasmo Trindade, no

seguinte endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, 3º andar, sala 214, Rua Delfino Conti, s/n, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina.

Se o(a) Senhor(a) estiver de acordo em participar do estudo, garantimos que as informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho com a finalidade de gerar conhecimento em saúde. Os pesquisadores têm o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Esta pesquisa está pautada nas orientações e recomendações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012 e suas complementares.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) Senhor(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenador Washington Portela de Souza pelo telefone (48) 3721-6094 ou diretamente no próprio Comitê que fica localizado no prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina.

#### CONSENTIMENTO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu ....., portador do RG: ..... Fone para contato:..... concordo de maneira livre e esclarecida em participar da pesquisa: **Efeito da suplementação de prebiótico e simbiótico sobre a resposta inflamatória e indicadores do estado nutricional em indivíduos com obesidade mórbida: um ensaio clínico, randomizado, placebo-controlado e triplo cego.** Além de ter lido e entendido todas as informações fornecidas sobre minha participação na pesquisa, tive oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a

qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

---

Nome e assinatura do paciente

---

Prof. Dr. Erasmo B. S. M. Trindade

---

Ricardo Fernande

**Apêndice C – Caracterização dos indivíduos**

Nº prontuário HU/UFSC: \_\_\_\_\_ Nº da randomização: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

Procedência/Endereço:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Intervenção cirúrgica anterior no trato gastrointestinal: ( ) Não ( ) Sim

Se sim, qual: \_\_\_\_\_

Comorbidades: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Medicamentos previamente utilizados (antes da inclusão no estudo): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data de início da suplementação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data do término da suplementação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Número de suplementos ingeridos: \_\_\_\_\_

**Apêndice D – Avaliação antropométrica e laboratorial****AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA**

Nome: \_\_\_\_\_

Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

Estatura: \_\_\_\_\_

<b>Marcador</b>	<b>M<sub>0</sub> (Basal)</b>	<b>M<sub>1</sub> (15 dias)</b>	<b>M<sub>2</sub> (30 dias)</b>	<b>M<sub>3</sub> (60 dias)</b>
Peso atual (kg)				
IMC (kg/m <sup>2</sup> )				
Circunferência da cintura (cm)				

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL**

<b>Marcador</b>	<b>M<sub>0</sub> (Basal)</b>	<b>M<sub>1</sub> (15 dias)</b>	<b>M<sub>2</sub> (30 dias)</b>	<b>M<sub>3</sub> (60 dias)</b>
PCR (mg/L)				
Albumina (g/dL)				
Sódio (mEq/L)				
Potássio (mEq/L)				
Fósforo (mg/dL)				
Vitamina D (ng/mL)				
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)				
Ácido fólico (ng/mL)				
Ferro sérico (µg/dL)				
Cálcio sérico (mg/dL)				
Hormônio do crescimento (ng/mL)				
Insulina (IU/mL)				
Glicemia de jejum (mg/dL)				
Hemoglobina glicada (%)				
Colesterol total (mg/dL)				
HDL-c (mg/dL)				

LDL-c (mg/dL)				
Triglicerídeos (mg/dL)				
Hemáceas (milhões/mm <sup>3</sup> )				
Hemoglobina (g/dL)				
Hematócrito (%)				
Vol. Glob. Média (u2 fl)				
Hem. Glob. Média (pg)				
C. H. Glob. Média (g/dL)				
Leucócitos (p/mm <sup>3</sup> )				
Segmentados (número absoluto)				
Linfócitos (número absoluto)				
Monócitos (número absoluto)				
Eosinófilos (número absoluto)				
Basófilos (número absoluto)				
Contagem de plaquetas (p/mm <sup>3</sup> )				
AST (U/L)				
ALT (U/L)				
Gama-GT (U/L)				
Fosfatase alcalina (U/L)				
TSH (μIU/mL)				
Paratormônio (pg/mL)				
Transferrina (mg/dL)				
Ferritina (ng/mL)				
CLFL (μg/dL)				
CLFT (μg/dL)				
Índice de saturação (%)				



### Apêndice E – Parâmetros clínicos

Fármacos utilizados:	
M <sub>0</sub> –	
M <sub>1</sub> –	
M <sub>2</sub> –	
M <sub>3</sub> –	
Alterações gastrointestinais:	
M <sub>0</sub> - ( ) Não      ( ) Sim	Quais:
M <sub>1</sub> - ( ) Não      ( ) Sim	Quais:
M <sub>2</sub> - ( ) Não      ( ) Sim	Quais:
M <sub>3</sub> - ( ) Não      ( ) Sim	Quais:
Presença de constipação (segundo critérios do ROMA III, 2006):	
M <sub>0</sub> –	
M <sub>1</sub> –	
M <sub>2</sub> –	
M <sub>3</sub> –	
Consistência e formato das fezes (segundo critérios da Escala de Bristol, 1997):	
M <sub>0</sub> – ( ) 1    ( ) 2    ( ) 3    ( ) 4    ( ) 5    ( ) 6    ( ) 7	
M <sub>1</sub> – ( ) 1    ( ) 2    ( ) 3    ( ) 4    ( ) 5    ( ) 6    ( ) 7	
M <sub>2</sub> – ( ) 1    ( ) 2    ( ) 3    ( ) 4    ( ) 5    ( ) 6    ( ) 7	
M <sub>3</sub> – ( ) 1    ( ) 2    ( ) 3    ( ) 4    ( ) 5    ( ) 6    ( ) 7	
Uso de suplementos vitamínicos e minerais:    ( ) Não      ( ) Sim	
Qual:	
Dose:	
Prática de atividade física:	
( ) Não      ( ) Sim	
Quantas vezes por semana:	
Tipo de atividade:	
Duração da atividade:	
<i>*Somente para o sexo feminino:</i>	

Período menstrual regular: ( ) Sim ( ) Não

Data da última menstruação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Menopausa: ( ) Sim ( ) Não

Ausência de ovulação por contracepção hormonal contínua: ( ) Sim ( ) Não



Dia \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Dia \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Dia \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Dia \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## **Anexo A - Orientação nutricional oferecida aos pacientes durante a pesquisa.**

### **ORIENTAÇÕES NUTRICIONAIS**

#### **Retirar/Evitar na alimentação:**

- Embutidos (salsicha, linguiça, bacon, mortadela, salame, etc.)
- Enlatados e conservas
- Temperos industrializados (caldo Knorr, Sazon, Ajinomoto e similares)
- Chocolate
- Bebida alcoólica e refrigerante
- Açúcar refinado
- Evitar adoçar os alimentos. Em caso de extrema necessidade: adoçante à base de Stévia.

#### **Incluir na alimentação:**

- 2 litros de água e consumir chás e sucos (sugestão: água saborizada – acrescentar hortelã, alecrim, cravo, canela, gengibre).
- Frutas como: abacaxi, melancia, melão, goiaba, acerola, morango (3-4 porções/dia)
- Folhosos verde-escuros: couve, hortelã, alface e rúcula (2x/dia).
- Alimentos integrais ao invés de refinados (arroz integral, aveia, pão integral, granola sem açúcar, etc.).
- Leguminosas: feijão (todos os tipos), lentilha, soja, quinoa, amaranto.
- Carnes magras (de preferência brancas): peixe, frutos do mar, frango sem pele, ovos (de preferência caipira e não fritos).
- Controlar o consumo de sal, evitar excessos. Não levar o saleiro à mesa. Temperar a salada somente com azeite de oliva e limão. Pode acrescentar linhaça, gergelim, etc.

### **DICAS**

- Não pule nenhuma refeição. Faça 3 grandes refeições (café da manhã, almoço e janta) e 2-3 pequenos lanches entre as grandes refeições.
- Prepare todo e qualquer tipo de carne retirando toda a gordura aparente e/ou peles.
- Alimentos como: azeite de oliva, sementes de linhaça, de girassol, peixes, aveia, farinha de mandioca, soja e leite de soja auxiliam no combate ao colesterol elevado.
- A castanha de caju granulada pode também ser usada para temperar as saladas, assim como o azeite de oliva, suco de limão, gergelim ou linhaça (use 1 colher de sopa).
- Manter horário regular para as refeições (não ultrapassar 3 horas sem comer).
- Mastigar bem os alimentos (tempo mínimo para cada refeição de 20 min para as grandes refeições e 10 minutos para as pequenas refeições, apreciar e sentir o sabor dos alimentos); a comida deve ser engolida quando em consistência pastosa.
- Evitar líquidos durante as refeições. Espere no mínimo 40 minutos para beber água ou sucos.

**Anexo B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Efeito da suplementação de prebiótico ou simbiótico em indivíduos com obesidade mórbida

**Pesquisador:** Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 49274715.9.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.340.253

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa está adequadamente instrumentalizada e os pesquisadores acataram as orientações de ajuste do TCLE conforme a Resolução 466/2012.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi reajustado adequadamente conforme a Resolução 466/2012.

**Recomendações:**

sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

conclusão: aprovado.

## Anexo C – Registro do estudo na plataforma de registro de ensaios clínicos.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02660333>

**ClinicalTrials.gov**  
 A service of the U.S. National Institutes of Health

Search for studies:    
[Advanced Search](#) | [Help](#) | [Studies by Topic](#) | [Glossary](#)

[Find Studies](#) | [About Clinical Studies](#) | [Submit Studies](#) | [Resources](#) | [About This Site](#) | [Text Size](#)

[Home](#) > [Find Studies](#) > [Study Record Detail](#)

### Effect of Prebiotic or Symbiotic on Inflammatory Response and Indicators of Nutritional Status in Obesity

**This study is currently recruiting participants. (see Contacts and Locations)**  
*Verified January 2016 by Universidade Federal de Santa Catarina*

**Sponsor:**  
 Universidade Federal de Santa Catarina

**Information provided by (Responsible Party):**  
 Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade, Universidade Federal de Santa Catarina

**ClinicalTrials.gov Identifier:**  
 NCT02660333  
 First received: January 14, 2016  
 Last updated: January 18, 2016  
 Last verified: January 2016  
[History of Changes](#)

[Full Text View](#) | [Tabular View](#) | [No Study Results Posted](#) | [Disclaimer](#) | [How to Read a Study Record](#)

#### Purpose

The purpose of this study is to evaluate the effect of prebiotic or symbiotic supplementation on inflammatory response and indicators of nutritional status in patients with morbid obesity. Study hypothesis: Supplementation of 12 g/day of fructooligosaccharides (prebiotic) or 12 g/day of fructooligosaccharides + strains of lactobacilli and bifidobacteria (symbiotic) during 30 days promotes reduction of plasma/serum levels of acute phase proteins, cytokines, metabolic and anthropometric parameters in individuals with BMI  $\geq$  40kg/m<sup>2</sup>.



**Anexo D – Comprovante de submissão do projeto ao edital Universal CNPq 2016.****RECIBO DE ENVIO DE FORMULÁRIOS ELETRÔNICOS**

Número do protocolo	9397955986218238
Solicitante	Erasmu Benício Santos de Moraes Trindade
CPF/CGC	24035076368
Formulário	Formulário de Propostas Web (1.0.0)
Edital / Chamada	Universal 01/2016 - Faixa B - até R\$ 60.000,00

O sistema de recepção de formulários eletrônicos do CNPq registra que em 19/02/2016, às 20:08:36 horas, o formulário identificado acima foi recebido e reconhecido no CNPq, recebendo o número de protocolo 9397955986218238

Acompanhe o andamento de sua solicitação no site do CNPq (<http://www.cnpq.br>) em 'PLATAFORMA CARLOS CHAGAS'.