

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

FERNANDA RAFAELLY DE OLIVEIRA PEDREIRA

**EXTRATO RICO EM GALACTOGLUCOMANANA (GGM) INIBE PROLIFERAÇÃO
CELULAR, ATENUA ESTRESSE OXIDATIVO E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS
EM RATOS INDUZIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL**

ALFENAS/MG

2023

FERNANDA RAFAELLY DE OLIVEIRA PEDREIRA

**EXTRATO RICO EM GALACTOGLUCOMANANA (GGM) INIBE PROLIFERAÇÃO
CELULAR, ATENUA ESTRESSE OXIDATIVO E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS
EM RATOS INDUZIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Luciana Azevedo

Co-Orientador: Dr. Petri Kilpeläinen
Natural Resources Institute Finland - Luke (Finlândia)

Co-Orientador: Dr. Daniel Granato
University of Limerick (Irlanda)

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Pedreira, Fernanda Rafaelly de Oliveira.

Extrato rico em galactoglucomanana (GGM) inibe proliferação celular, atenua estresse oxidativo e lesões pré-neoplásicas em ratos induzidos à carcinogênese colorretal / Fernanda Rafaelly de Oliveira Pedreira. - Alfenas, MG, 2023.

89 f. : il. -

Orientador(a): Luciana Azevedo.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Picea abies. 2. Compostos fenólicos. 3. Digestão. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Câncer colorretal. I. Azevedo, Luciana, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

FERNANDA RAFAELLY DE OLIVEIRA PEDREIRA

EXTRATO RICO EM GALACTOGLUCOMANANA (GGM) INIBE PROLIFERAÇÃO
CELULAR, ATENUA ESTRESSE OXIDATIVO E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS
EM RATOS INDUZIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Aprovada em: 19 de setembro de 2023.

Profa. Dra. Luciana Azevedo - Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Mariana Araujo Vieira do Carmo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Alessandra Cristina Pupin Silvério

Instituição: Universidade José do Rosário Vellano

UNIFENAS

Prof. Dr. Luciano Aparecido de Almeida Junior

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FORP - USP



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 19/09/2023, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1087083** e o código CRC **5A959124**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, fortalecer e amparar em todos os momentos do caminho que me levaram à conclusão desta etapa tão marcante da minha vida. Sei que meus privilégios são muitos e somente espero ter oportunidade de retribuir um pouco do tanto que sempre recebo das mãos divinas. A Ele toda a honra e toda a glória sempre e em tudo.

Ao meu filho, Joaquim, razão da minha vida, meu amor maior e motivo pelo qual tento melhorar a cada dia, na esperança de que todo este esforço lhe sirva de inspiração. Ao meu marido, Renato, por aceitar dividir este sonho comigo, compreender meus períodos de ausência, assumir meu papel em vários momentos e ser o meu maior incentivador. Esta conquista é da nossa família.

Aos meus pais, André e Zilma, por todo amor e apoio. A minha irmã, Maísa, meu cunhado, Renan, e minha sobrinha, Isabela, pela torcida sempre constante.

À querida orientadora Profa. Dra. Luciana Azevedo, por ser uma grande inspiração profissional e pessoal. Obrigada por não apenas transferir seu conhecimento, mas por criar possibilidades para que eu pudesse construir o meu. Nunca conseguirei agradecer-lhe o suficiente por acreditar em mim, por todos os conselhos certos e pelo olhar inteligente, amoroso e empático com o qual guiou essa experiência nesses três anos.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde – PPGb e ao Laboratório LANTIN por proporcionarem a oportunidade de realizar este doutorado e pela disponibilização da infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Petri Kilpeläinen (Luke) pela confiança na condução dos experimentos e pelo envio da amostra e ao professor Daniel Granato (Universidade de Limerick/Irlanda) por toda ajuda no direcionamento das análises.

À professora Graziela Domingues de Almeida Lima, pelos ensinamentos, conselhos e pela amizade no tempo de convívio no laboratório e à professora Mariana Araújo Vieira do Carmo por toda a paciência nos ensinamentos transmitidos no início da minha prática no LANTIN.

Aos professores Leonardo Augusto de Almeida e Rômulo Dias Novaes que contribuíram com seus conhecimentos na execução deste trabalho.

À colega de jornada, Amanda dos Santos Lima, por todo companheirismo e amizade que tornaram esta caminhada mais prazerosa. Sua ajuda foi fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

À equipe Lantin, que participou ativamente de todos os experimentos, por toda colaboração.

À banca examinadora pelo interesse, disponibilidade e por toda a contribuição a melhoria do meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A galactoglucomanana (GGM) é a hemicelulose predominante em árvores coníferas como o abeto da Noruega. O presente estudo investigou os efeitos bioativos de um extrato aquoso rico em GGM em modelos experimentais. A GGM passou pelo processo de digestão gastrointestinal simulada *in vitro* e as frações resultantes das fases oral, gástrica e intestinal foram submetidas à análise química para investigação do teor de compostos fenólicos, bioacessibilidade e atividade antioxidante. Os extratos foram testados em linhagens celulares cancerosas para avaliação do efeito antiproliferativo, citotóxico e antioxidante. O papel da GGM frente a lesões pré-neoplásicas no cólon e a modulação da microbiota intestinal foi investigado em ratos *Wistar* induzidos quimicamente ao câncer colorretal (CCR). Os resultados da análise química apontaram que o trato gastrointestinal diminuiu o teor de compostos fenólicos totais (de 33,12 para 19,06mg AGE/g) reduzindo a sua bioacessibilidade para 57,54% em relação ao bruto e, conseqüentemente, diminuindo sua capacidade antioxidante (FRAP = de 96,12 para 10,52mg de AAE/g; DPPH = de 77,01 para 10,30mg de AAE/g). Porém, a análise celular não apoiou este achado e constatou ação antioxidante da GGM. Os resultados de IC₅₀ (entre 21,34 e >200µg AGE/mL), IG₅₀ (entre 1,97 e 126,4µg AGE/mL) e LC₅₀ (entre 24,72 e > 200µg AGE/mL) apontaram um comportamento antiproliferativo, citotóxico e letal da GGM nas linhagens cancerosas testadas. A GGM atenuou o início e a progressão do câncer de cólon, diminuindo os focos de criptas aberrantes nos animais e foi capaz de modificar a microbiota intestinal desregulando o equilíbrio entre os filos *Firmicutes/Bacteroidetes*. Com essas evidências, é possível sugerir que a GGM fornece proteção quimiopreventiva contra o desenvolvimento do câncer de cólon e opera como um agente antioxidante intracelular.

Palavras-chave: *Picea abies*; compostos fenólicos; digestão; espécies reativas de oxigênio; câncer colorretal; microbiota.

ABSTRACT

Galactoglucomannan (GGM) is the predominant hemicellulose in coniferous trees such as Norway spruce. The present study investigated the bioactive effects of an aqueous extract rich in GGM in experimental models. The GGM underwent the process of simulated in vitro gastrointestinal digestion and the fractions resulting from the oral, gastric and intestinal phases were subjected to chemical analysis to investigate the content of phenolic compounds, bioaccessibility and antioxidant activity. The extracts were tested on cancer cell lines to evaluate their antiproliferative, cytotoxic and antioxidant effects. The role of GGM in pre-neoplastic lesions in the colon and modulation of the intestinal microbiota was investigated in Wistar rats chemically induced colorectal cancer (CRC). The results of the chemical analysis showed that the gastrointestinal tract decreased the content of total phenolic compounds (from 33.12 to 19.06mg AGE/g), reducing its bioaccessibility to 57.54% in relation to the crude and, consequently, decreasing its capacity antioxidant (FRAP = from 96.12 to 10.52mg of AAE/g; DPPH = from 77.01 to 10.30mg of AAE/g). However, cellular analysis did not support this finding and confirmed the antioxidant action of GGM. The results of IC₅₀ (between 21.34 and >200µg AGE/mL), IG₅₀ (between 1.97 and 126.4µg AGE/mL) and LC₅₀ (between 24.72 and > 200µg AGE/mL) indicated an antiproliferative behavior, cytotoxic and lethal effect of GGM in the tested cancer cell lines. GGM attenuated the initiation and progression of colon cancer, reducing the foci of aberrant crypts in animals and was able to modify the intestinal microbiota by disrupting the balance between the Firmicutes/Bacteroidetes phyla. With this evidence, it is possible to suggest that GGM provides chemopreventive protection against the development of colon cancer and operates as an intracellular antioxidant agent.

Keywords: *Picea*; phenolic compounds; digestion; reactive oxygen species; colorectal neoplasms; microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da galactoglucomanana (GGM)	19
Figura 2 -	Estrutura química dos flavans-3-oides catequina e epicatequinas..	21
Figura 3 -	Principais efeitos de ação das catequinas	22
Figura 4 -	Fatores que afetam a biodisponibilidade de compostos fenólicos e a estabilidade da atividade antioxidante durante a digestão gastrointestinal estimulada <i>in vitro</i>	24
Figura 5 -	Extrato de GGM utilizado nesse estudo	29
Figura 6 -	Liofilização dos extratos digeridos de GGM	30
Figura 7 -	Delineamento do experimento <i>in vivo</i>	36
Figura 8 -	Processo de preparo da GGM para gavagem (pesagem e diluição da GGM)	37
Figura 9 -	Equações utilizadas para determinação nutricional e metabólica dos animais	38
Figura 10 -	Diagrama do conteúdo fenólico total das amostras de GGM não digerida e digeridas	46
Figura 11 -	Citotoxicidade dos extratos brutos e digeridos de GGM nas linhagens celulares SCC-9, A549 e HCT-8	51
Figura 12 -	Efeito dos extratos brutos e digeridos de GGM nas linhagens celulares SCC-9, A549 e HCT-8 frente às EROs	56
Figura 13 -	Efeito dos extratos de GGM nos FCA nos cólons	65
Figura 14 -	Imagens microscópicas do cólon de animais tratados com dimetilhidrazina (DMH) e diferentes concentrações de galactoglucomanana (GGM)	67
Figura 15 -	Imagens microscópicas indicando a distribuição de mucinas e criptas intestinais de animais tratados com dimetilhidrazina (DMH) e diferentes concentrações de galactoglucomanana (GGM)	68
Figura 16 -	Microestrutura do cólon dos animais tratados com EDTA, DMH, GGM e diferentes concentrações GGM associada ao DMH	69
Figura 17 -	Efeito da GGM na modulação da microbiota intestinal	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais do modelo experimental DMH <i>in vivo</i>	36
Tabela 2 - Sequências de <i>primers</i> utilizados na análise de microbiota fecal dos animais para PCR em tempo real	42
Tabela 3 - Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de GGM bruta e de suas frações resultantes das fases de digestão oral, gástrica e intestinal <i>in vitro</i> e seus respectivos controles sem adição de enzimas digestivas	44
Tabela 4 - Teor de catequinas e epicatequinas na GGM bruta e em sobrenadantes e <i>pellets</i> (resíduos) das frações resultantes da digestão oral, gástrica e intestinal <i>in vitro</i> e seus respectivos controles sem adição de enzimas digestivas	49
Tabela 5 - Viabilidade, inibição de crescimento e morte celular das linhagens SCC-9, A549 e HCT-8 após 48 horas de exposição aos extratos brutos e digeridos de GGM expressos em µg/mL	50
Tabela 6 - Efeito das dietas no ganho de massa, na ingestão alimentar e no consumo de água	60
Tabela 7 - Parâmetros metabólicos dos animais após o experimento	61
Tabela 8 - Relação de <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> comparado ao grupo controle EDTA	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Câncer colorretal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CG	Cromatografia gasosa
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Dicloro-dihidro-fluoresceína
DMEM	Eagle Modificado por Dulbecco
DMH	1,2-dimethylhydrazine
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FCA	Foco de Criptas Aberrantes
FDM	Foco Depletado de Mucina
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
g	Gramas
GGM	Galactoglucomanana
kg	Quilograma
mg	Miligrama
MTT	3-4,5 dimetiltiazol-2, 5-brometo de difenil tetrazólio
NaOH	Hidróxido de sódio
p.c.	Peso corpóreo
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
s.c.	Subcutânea
SFB	Soro Fetal Bovino
TCA	Tricloro acético
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>PICEAS ABIES</i>	17
2.2	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA GALACTOGLUCOMANANA (GGM)	18
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS	19
2.4	DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	22
2.5	CÂNCER COLORRETAL	24
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	MÉTODO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DE HEMICELULOSE RICO EM GGM	28
5.2	PROCESSO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA <i>IN VITRO</i>	29
5.3	ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS DE GGM	30
5.3.1	Composição fenólica	30
5.3.2	Atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP	31
5.3.3	Composição de catequinas e epicatequinas nos extratos de GGM.	32
5.4	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	32
5.4.1	Condição de cultivo das linhagens celulares	32
5.4.2	Avaliação da citotoxicidade dos extratos em cultura de células	32
5.4.3	Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	33
5.5	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	34
5.5.1	Animais utilizados no experimento	34
5.5.2	Delineamento experimental in vivo	35
5.5.3	Agente de indução de lesão colorretal (DMH)	36
5.5.4	Caracterização da GGM bruta administrada por gavagem e da ração comercial consumida pelos animais	37
5.5.5	Cálculo dos parâmetros nutricionais e metabólicos	37
5.5.6	Análise da composição da microbiota intestinal	38

5.5.7	Focos de criptas aberrantes (FCA) e focos depletados de mucina (FDM) nos cólons	39
5.5.8	Processamento histológico	39
5.5.9	Análise histopatológica e microestrutural	40
5.5.10	Análises do conteúdo bacteriano em amostras fecais	41
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE GGM	43
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP)	46
6.3	PERFIL QUÍMICO: CATEQUINAS E EPICATEQUINAS	47
6.4	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	49
6.4.1	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de GGM <i>in vitro</i>	49
6.4.2	Geração de espécies reativas de oxigênio <i>intracelular</i> (EROs)	54
6.5	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	59
6.5.1	Parâmetros nutricionais e metabólicos dos animais	59
6.5.2	Focos de criptas aberrantes (FCA) e focos depletados de mucina (FDM) nos cólons	61
6.5.3	Histomorfometria do cólon	66
6.5.4	Efeitos da GGM no microbioma fecal	69
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A	89

1 INTRODUÇÃO

As cascas de árvores coníferas são consideradas biomassa das indústrias de processamento de madeira para recuperação apenas de celulose, mas apresentam outros recursos ainda pouco explorados. Na necessidade de transição da uma economia baseada em fósseis para a bioeconomia, cascas e serragens apresentam um potencial significativo e inexplorado como fonte sustentável de bioquímicos e materiais (ZHAO *et al.*, 2020). A hemicelulose é um polissacarídeo considerado o segundo biopolímero mais abundante no planeta. Dentre as fibras solúveis disponíveis, a galactoglucomanana (GGM) é a principal e mais abundante hemicelulose encontrada nas paredes celulares de árvores coníferas comumente localizadas no norte europeu, como o abeto da Noruega (*Picea abies*) (DAAS; SCHOLS; DE JONGH, 2000; WILLFÖR *et al.*, 2003).

Extratos aquosos ricos em GGM oriundos de serragem de casca de abeto norueguês e obtidos por extração com química verde não poluente são seguros e possuem efeitos de promoção de saúde atuando como agente terapêutico para prevenir e tratar os sintomas da inflamação do trato urinário inferior (KONKOL *et al.*, 2017), além de carregarem uma alta expectativa para a sua utilização em produtos alimentares complexos e com potencial funcional (BHATTARAI *et al.*, 2019; PITHÄNEN; HEINONEN; MIKKONEN, 2018). A GGM é uma matriz versátil que pode ser utilizada na área física e na estabilização química de emulsões (LEHTONEN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019) e ser potencialmente empregada como um hidrocoloide multifuncional para alimentos, cosméticos e em aplicações farmacêuticas (VALOPPI *et al.*, 2019). A GGM também se estabelece como um excelente material de parede para a microencapsulação seca por pulverização de ácidos graxos poli-insaturados (HO *et al.*, 2023). De fato, este biopolímero sustentável almeja competir com outros hidrocoloides alimentares quanto à funcionalidade, custo e disponibilidade aguardando por sua utilização em escala industrial (EBRINGEROVÁ *et al.*, 2008).

Ultimamente, o interesse pelos fenólicos presentes no extrato de GGM tem aumentado, uma vez que esses compostos bioativos naturais, como os flavonoides, revelaram propriedades anticancerígenas inibindo, por exemplo, o desenvolvimento e a carcinogênese no cólon atuando de várias formas, como na proliferação, na angiogênese, na inflamação e induzindo apoptose e parada do ciclo celular (ESMEETA *et al.*, 2022; SPINELLI *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos são

encontrados abundantemente em plantas e exibem também diversas outras propriedades como a modulação da resposta do sistema imunológico e proteção de células normais contra os danos promovidos pelos radicais livres. A união do aumento da biodisponibilidade com as propriedades naturais destes compostos revela que combinações de compostos fenólicos com micronutrientes essenciais para manter a integridade e a estabilidade da matriz extracelular oferecem benefícios anticancerígenos potencializados e ampliados (HAZAFÁ *et al.*, 2020; NIEDZWIECKI *et al.*, 2016). Dentre todos os tipos de compostos fenólicos, os mais comuns são os flavonoides, como as catequinas e epicatequinas investigadas neste estudo. A presença de numerosos grupos hidroxila em suas moléculas lhes conferem fortes propriedades antioxidantes, além de uma ação promissora na prevenção de diversos tipos de câncer (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020; MUSIAL; KUBAN-JANKOWSKA; GORSKA-PONIKOWSKA, 2020).

Devido à alta incidência e taxa de mortalidade, o câncer colorretal (CCR), também denominado adenocarcinoma de cólon e reto, tornou-se um problema de saúde pública global. O CCR é considerado o terceiro tipo mais comum de câncer (MORGAN *et al.*, 2023) atingindo sobretudo pacientes mais velhos, embora exista um aumento nas taxas de incidência em adultos jovens nos últimos anos (DHARWADKAR; ZAKI; MURPHY, 2022). Ele geralmente tem início no intestino grosso e se estende até a parte mais inferior do sistema digestivo (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

A etiologia do CCR está associada a condições genéticas e hereditárias, como presença de histórico familiar para este tipo de carcinoma e doença inflamatória intestinal, e a fatores de risco considerados ambientais, como o estilo de vida (tabagismo, alcoolismo, obesidade, dieta e nutrição) (KIM *et al.*, 2016). O microbioma intestinal também tem um papel decisivo na patogênese do CCR. A importância da microbiota intestinal e dos hábitos diários como fatores modificadores para o desenvolvimento da doença já é conhecida, inclusive com achados iniciais promissores que reforçam o uso da microbiota intestinal como marcador preditivo e/ou prognóstico na abordagem do câncer colorretal (MONTALBAN-ARQUES; SCHARL, 2019).

São escassos os estudos sobre os efeitos antioxidantes e anticarcinogênicos do extrato de GGM *in vitro* e *in vivo* principalmente quanto à análise desta matriz digerida. A digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, embora seja considerado um

modelo estático, tenta imitar as condições do que seria esperado *in vivo* com o intuito de trazer mais segurança na sua utilização em ensaios com animais. Além disso, a composição e concentração de compostos bioativos de extratos provenientes de madeira apresentam alta variação e dependem de fatores de manipulação como idade da madeira, colheita, origem genética, partes da madeira, técnicas de pré-tratamento e sistema de extração (METSAMUURONEN; SIREN, 2019). No entanto, é de conhecimento que o trato gastrointestinal também pode promover alterações no perfil e no conteúdo desses compostos afetando a sua biodisponibilidade na absorção intestinal. A transição do ambiente gástrico ácido para o ambiente intestinal levemente alcalino causa uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos totais bioacessíveis, como dos flavonoides presentes em maçãs e em uvas por exemplo (BOUAYED; HOFFMANN; BOHN, 2011; TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010). Além do mais, a biodisponibilidade dos compostos fenólicos também é variável entre as diferentes classes de polifenóis biodisponíveis (MARTINI; CONTE; TAGLIAZUCCHI, 2018).

Considerando testes *in vivo*, sabe-se que a GGM administrada por via oral mitiga a inflamação prostática induzida por hormônios em ratos (KONKOL *et al.*, 2017). Além disto, ela pode ser considerada potencialmente aplicável como fibra dietética solúvel semelhante à goma guar e outras galactomananas que resistem à digestão hidrolítica e são fermentadas no intestino grosso. A GGM como um carboidrato fermentável, demonstrou ter propriedades bioativas como capacidade de imunomodulação e eliminação de radicais (EBRINGEROVÁ *et al.*, 2008), bem como atividades probióticas e modificadoras do intestino (POLARI *et al.*, 2012).

Após o exposto, se faz necessário o conhecimento sobre a segurança toxicológica e a bioatividade de novos extratos de fontes não convencionais para que esses recursos renováveis, como as hemiceluloses presentes em serragens e lascas de madeira macia, possam ser mais valorizados e melhor aproveitados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos funcionais da GGM por meio da caracterização do seu perfil químico, realizar a digestão gastrointestinal *in vitro*, investigar a bioacessibilidade bem como a ação citotóxica, antiproliferativa e antioxidante celular, além do potencial da GGM na proteção contra lesões pré-cancerígenas e na modulação da microbiota em um modelo animal *in vivo* induzido ao câncer colorretal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PICEAS ABIES

O abeto da Noruega, também conhecido como pinheiro norueguês (*Picea abies*), é uma das espécies de árvores coníferas mais comuns e economicamente importantes da Europa (CHEN *et al.*, 2019; KLIMO; HAGER; KULHAVÝ, 2000). Sua casca, embora seja um recurso amplamente disponível nos países nórdicos, é geralmente considerada um resíduo subaproveitado da indústria madeireira. Porém, esta parte da árvore tem demonstrado ser uma fonte valiosa de compostos fenólicos com capacidade antioxidante e antibacteriana (JYSKE *et al.*, 2023; STRIŽINCOVÁ *et al.*, 2019; VÄLIMAA *et al.*, 2020). Devido a essas características, ela se torna um produto de grande interesse comercial. Apenas na Finlândia, mais de um milhão de toneladas de casca de abeto da Noruega são produzidas no processamento de madeira anualmente, proporcionando uma fonte potencial de extratos de alto valor agregado (STATISTICS FINLAND OSF, 2021).

Diversos compostos químicos podem ser isolados ou produzidos no *P. abies*. Dentre eles, metabólitos primários como as celuloses, hemiceluloses, polissacarídeos e lignina que são unidades químicas fundamentais das células vegetais vivas (METSÄMUURONEN; SIRÉN, 2019). Segundo Kilpeläinen *et al.* (2014), a serragem do abeto norueguês é composta por 26% de lignina, 23% de hemiceluloses, 42% de celulose e 3% de extrativos. O seu extrato aquoso, resultante do processo de extração com água quente pressurizada, é composto por 17% de lignina, 75% de hemicelulose e 7,5% de extrativos. Já o resíduo da serragem é formado por 30% de lignina, 7% de hemiceluloses, 58% de celulose e 2% de extrativos. Além destes, existem também os metabólitos secundários, como: alifáticos, compostos fenólicos, açúcares e alcaloides, que embora não contribuam para o crescimento dos tecidos vegetais, defendem as plantas contra ataques de herbívoros, patógenos, insetos e também da radiação ultravioleta (METSÄMUURONEN; SIRÉN, 2019; WINK, 2003), além de suas múltiplas empregabilidades na promoção de saúde.

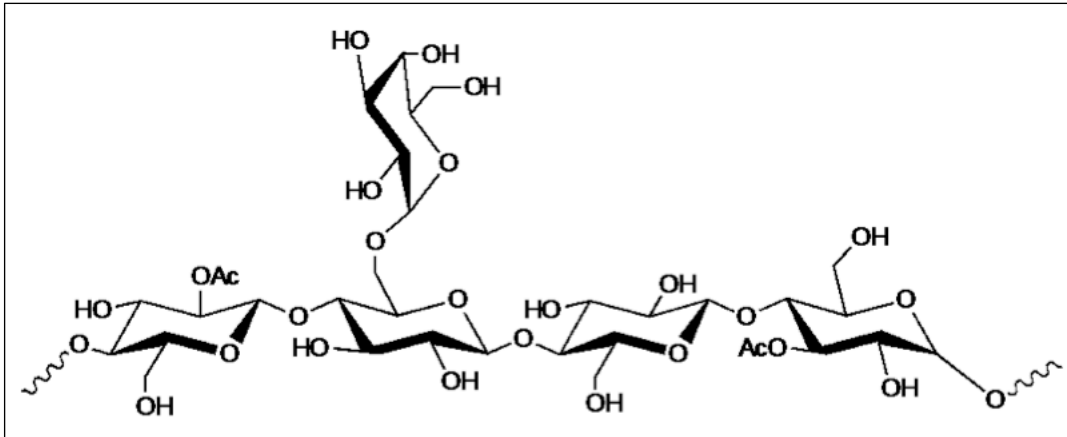
2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA GALACTOGLUCOMANANA (GGM)

As hemiceluloses constituem um grupo de polissacarídeos heterogêneos, com estrutura polimérica desordenada que são encontrados nas paredes celulares vegetais atuando como seu material de suporte (PETTERSEN, 1984). Esses polissacarídeos constituem o segundo maior grupo renovável e amplamente aproveitado de polímeros vegetais, perdendo apenas para a celulose (BOROVKOVA *et al.*, 2022) e representam de 10 a 25% da massa total da madeira macia, sendo ainda pouco explorados como materiais de valor agregado (WILLFOR *et al.*, 2008). Diferentemente das celuloses e devido ao seu baixo peso molecular, as hemiceluloses de madeira macia não costumam ser utilizadas em grande escala pela indústria. Seu principal aproveitamento é na produção de calor e eletricidade e em fábricas de celulose e papel (JYSKE *et al.*, 2020).

As hemiceluloses são classificadas em quatro grupos que apresentam diferenças estruturais: xilanas, mananas, β -glucanas com ligações mistas e xiloglucanas (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005). Mananas são polímeros cuja estrutura pode ser linear ou ramificada, esta última incluindo resíduos de glicose e galactose (glucomanas, galactomananas e galactoglucomanas) (CABAN; LEWANDOWSKA, 2023).

A GGM é a principal hemicelulose encontrada em madeiras macias, como o abeto da Noruega (*P. abies*). Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 1 (HU; DU; ZHANG, 2018). A GGM tem se tornado promissora por se apresentar como um carboidrato potencialmente funcional e disponível em biomassa renovável de baixo custo e em subprodutos industriais florestais com potencial de transformação em produtos (WU *et al.*, 2019). O extrato de GGM de abeto da Noruega, rico em galactoglucomanana, é composto principalmente por carboidratos (GRANATO *et al.*, 2022).

Figura 1 – Estrutura química da galactoglucomanana (GGM).



Fonte: Hu; Du; Zhang (2018).

A extração da GGM pode ser obtida com alto rendimento e com o emprego de produtos seguros, ecológicos e sustentáveis (KILPELÄINEN *et al.*, 2014) e seus extratos podem ser concentrados e purificados geralmente com centrifugação (VALOPPI *et al.*, 2019) ou com precipitação com etanol, sendo que esta diminui a quantidade de compostos fenólicos bioacessíveis do extrato (BHATTARAI *et al.*, 2019).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos constituem o maior grupo de metabólitos secundários em plantas e são caracterizados pela presença de ao menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados (NURZYNSKA-WIERDAK, 2023). Com base na sua estrutura (número de anéis aromáticos e forma como estão conectados), eles são basicamente agrupados em: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonas, flavonóis, flavan-3-óis – catequinas e epicatequinas - flavanonas, isoflavonas e antocianinas), estilbenoides (resveratrol) e lignanas. Estima-se que existam mais de 8.000 tipos diferentes de polifenóis englobando as modalidades monoméricas e poliméricas (ŠAMEC *et al.*, 2021).

Fenólicos podem ser encontrados em todas as partes das plantas, como raízes, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (HERMANN, 1978). Seu tipo e concentração apresentam imensa variação pois são produzidos como um mecanismo de defesa da planta visando adaptação e sobrevivência em condições ambientais adversas. Árvores como pinheiros e abetos apresentam uma variedade de compostos fenólicos

que exibem propriedades antioxidantes, antibacterianas (PIETARINEN *et al.*, 2006; WILLFÖR *et al.*, 2003) e antifúngicas (HARJU *et al.*, 2003).

Esses compostos fenólicos vegetais despertam um crescente interesse científico, pois além de serem os antioxidantes naturais mais abundantes, apresentam potencialmente múltiplas propriedades biológicas, como: efeitos anticancerígenos, protetores do fígado, antioxidantes, antialérgicos, anti-inflamatórios, antimutagênicos e antiproliferativos (KHAN *et al.*, 2019; SHARIF-RAD *et al.*, 2023). Seu emprego na medicina clínica e dietética é promissor, uma vez que apresentam potencial para protegerem e inibirem o desenvolvimento do câncer hepático, seja regulando o metabolismo da glicose ou afetando, por meio do estresse oxidativo, a via mitocondrial ou a regulação de processos inflamatórios, além de revelar uma melhoria da qualidade de vida e do equilíbrio no reestabelecimento de mecanismos de proteção ao organismo (LI *et al.*, 2023).

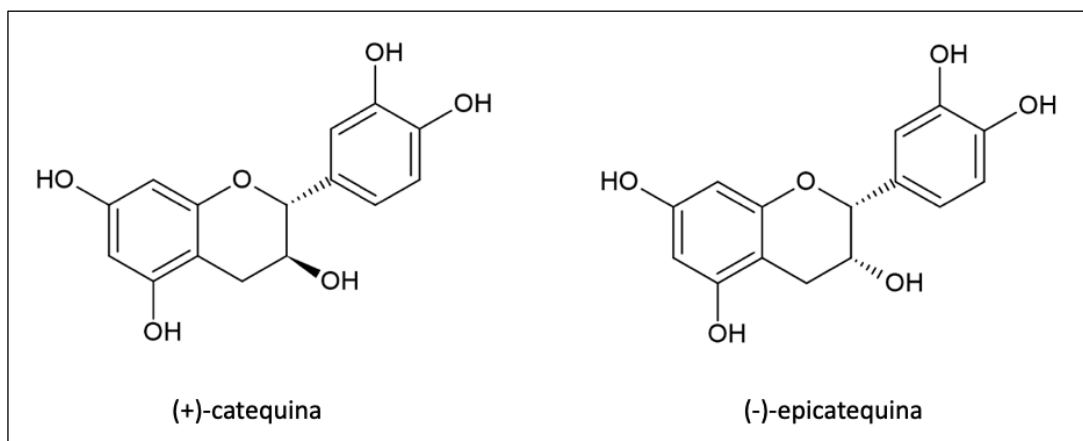
Os compostos fenólicos vegetais são comprovadamente efetivos na eliminação de radicais livres. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas pró-oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante das células o que favorece a acumulação de espécies reativas com possíveis efeitos deletérios nos tecidos biológicos (PINTO *et al.*, 2023). É importante destacar o papel destes componentes bioativos que atuam também sobre a microbiota intestinal, já que o seu metabolismo acontece neste local, e enfatizar a ação da microbiota sobre eles para torná-los bioativos e ajudarem na melhora da saúde geral do intestino (SHABBIR *et al.*, 2021).

Na casca do abeto da Noruega, (+)-catequina e (-)-epicatequina (FIGURA 2) são encontradas como subunidades (ou seja, unidades flavan-3-ol) de procianidinas, que são o tipo mais abundante de taninos condensados também conhecidos como proantocianidinas (JUSKYE *et al.*, 2020a).

As catequinas demonstram atividades moduladoras antivirais, antiapoptóticas, nefroprotetoras, neuroprotetoras e de eliminação de radicais livres que são fortemente associadas às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DINIZ *et al.*, 2021; KHALATBARY; KHADEMI, 2018; MARTINEZ POMIER; AHMED; MELACINI, 2020) (FIGURA 3). Já foi relatado que catequinas e epicatequinas exibem também atividade contra algumas bactérias, como *B. subtilis* e *E. coli* (MIN *et al.*, 2009). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que a epigalocatequina-3-galato, tipo de catequina mais comumente encontrada e considerada altamente eficaz e não tóxica, biologicamente

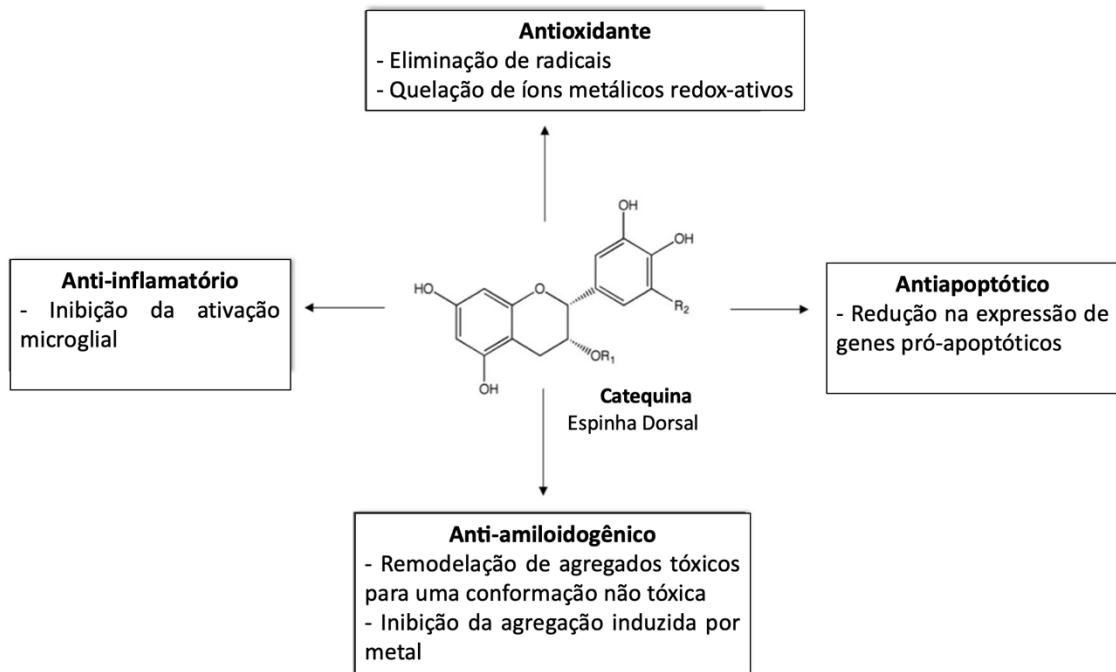
ativa e naturalmente extraída, reduz a proliferação, induz apoptose e inibe migração e invasão celular promovendo efeito antitumoral em células de carcinoma de língua humana (GAO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2018; WEIN *et al.*, 2022), além de inibir a formação de câncer colorretal induzido por DMH em ratos ao regular as principais vias envolvidas na origem dessa neoplasia (WANG *et al.*, 2020). Desta forma, estes compostos são potenciais na terapia destes dois tipos de cânceres tão potencialmente agressivos (ZHANG *et al.*, 2023). Já a epicatequina administrada dieteticamente suaviza o dano inflamatório em camundongos induzidos, por lipopolissacarídeo (LPS), à lesão renal (PRINCE *et al.*, 2017). Do Carmo *et al.* (2020) revelaram epicatequinas encontradas na fruta amazônica camu-camu e em concordância com outros estudos, como o de Santos *et al.* (2018), parece ser uma das responsáveis por inibir a capacidade de proliferação de linhagens celulares cancerosas.

Figura 2 - Estrutura química dos flavans-3-oides catequina e epicatequina.



Fonte: Šamec *et al.* (2021).

Figura 3 - Principais efeitos de ação das catequinas.



Fonte: Adaptação de Martinez Pomier; Ahmed; Melacini (2020).

Os efeitos biológicos potenciais dos compostos fenólicos presentes em árvores tipicamente de zona de clima temperado, como o abeto da Noruega, são benéficos e favoráveis à promoção da saúde, atuando principalmente sobre a inflamação, a eliminação de radicais livres e nas atividades pré-bióticas e modificadoras do intestino como demonstrado por alguns estudos (POLARI *et al.*, 2012; SZWAJKOWSKA-MICHAYĚK *et al.*, 2020).

2.4 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

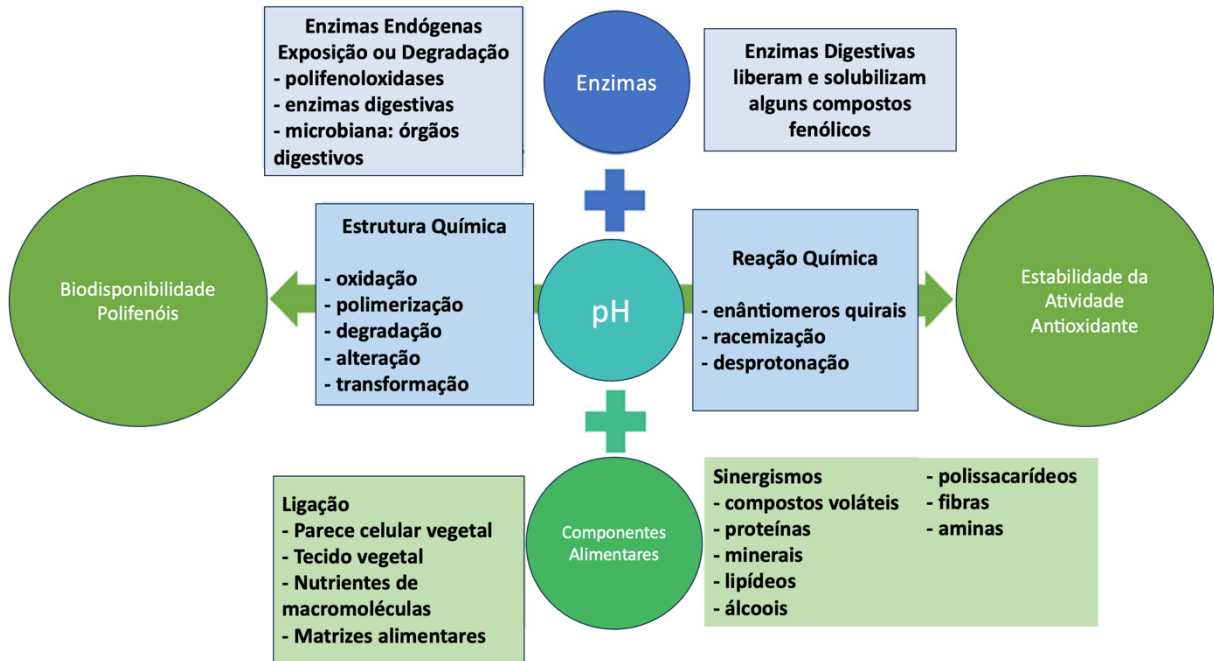
A atividade benéfica dos compostos fenólicos na promoção de saúde é altamente influenciada pela bioacessibilidade (TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010). Bioacessibilidade é conceituada como a quantidade de um composto liberado da matriz alimentar que persiste em condições estomacais e intestinais e que pode ser considerado disponível para absorção no trato gastrointestinal (GUTIÉRREZ-GRIJALVA *et al.*, 2016). Esta etapa é de extrema importância, pois somente os compostos que são liberados da matriz alimentar e persistem estáveis no ambiente gastrointestinal apresentam potencial para serem acessíveis e desempenharem seus

efeitos locais no sistema digestivo, ou até mesmo agirem de forma sistêmica (HELAL *et al.*, 2022).

Os efeitos destes compostos bioativos são fundamentados também na biodisponibilidade, velocidade com que uma substância ativa é absorvida e chega à circulação, que pode sofrer variação quanto à própria matriz alimentar, a ambientes da digestão, à microbiota do cólon e ao tratamento hidrotérmico (CAI *et al.*, 2020; CHAIT *et al.*, 2020; SECZYK *et al.*, 2021; SELMA; ESPIN; TOMAS-BARBERAN, 2009). Tanto o conteúdo fenólico quanto a atividade antioxidante podem ser alterados significativamente nas diferentes etapas de uma digestão *in vitro* simulada (ODRIOZOLA-SERRANO *et al.*, 2023).

O objetivo do processo de digestão *in vitro* é a tentativa de se mimetizar, fora do organismo, condições fisiológicas *in vivo*, considerando diversos fatores, dentre eles, os mais importantes e modificadores como a utilização de enzimas em diferentes concentrações, alterações de pH, tempo de digestão e atividade metabólica da microbiota natural do trato digestivo. Este modelo engloba a simulação de uma digestão humana que inclui fases oral, gástrica e do intestino delgado e, eventualmente, a fermentação do intestino grosso (KETNAWA; SUWANNACHOT; OGAWA, 2020; MINEKUS *et al.*, 2014). A Figura 4 exemplifica os fatores que afetam a biodisponibilidade de compostos fenólicos durante o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

Figura 4 - Fatores que afetam a biodisponibilidade de compostos fenólicos e a estabilidade da atividade antioxidante durante a digestão gastrointestinal estimulada *in vitro*.



Fonte: Adaptação de Ketnawa *et al.* (2021).

2.5 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é caracterizado pela divisão descontrolada ou crescimento anormal das células do cólon ou do reto, sendo uma doença grave e de grande impacto na população mundial por apresentar alta letalidade (EBRAHIMZADEH *et al.*, 2021). O CCR é dos tipos de cânceres mais prevalentes, considerado a terceira maior causa de morte no mundo (SUNG *et al.*, 2021).

A etiologia da carcinogênese colorretal é induzida por uma combinação extensa e complexa de fatores ambientais e genéticos que são de fundamental importância, principalmente quanto à preocupação por estratégias de prevenção para o controle do aumento de sua incidência na população (MÁRMOL *et al.*, 2017). O mecanismo exato para o início e progressão do CCR ainda não foi totalmente elucidado, porém a alimentação, o estado nutricional e a prática de atividade física revelaram estar associadas à patogênese do câncer colorretal (THANIKACHALAM; KHAN, 2019). Carboidratos complexos não digeríveis resistentes à digestão pelas enzimas humanas são fermentados no intestino em ácidos graxos de cadeia curta que atuam como uma

importante fonte de energia para os colonócitos da mucosa intestinal e influenciam o sistema imunológico. A ingestão de fibra alimentar está inversamente correlacionada com as ocorrências de CCR. Assim, uma maior ingestão de fibra alimentar pode reduzir o risco de CCR (NIEKAMP; KIM, 2023).

O microambiente inflamatório também constitui um dos fatores intrínsecos que exige grande atenção nas neoplasias colorretais (NADEEM *et al.*, 2020). De fato, diversos estudos evidenciaram que alterações na composição da microbiota intestinal afetam o início de lesões pré-cancerosas e a progressão do câncer e, sendo a região colorretal o local onde essas alterações podem influenciar diretamente os órgãos, o câncer colorretal é mais afetado pela microbiota que as demais neoplasias (KIM; LEE, 2021). Pacientes com CCR apresentam diversidade e abundância bacteriana diminuídas em comparação a indivíduos saudáveis (CHEN *et al.*, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Visto que o processo digestivo pode atuar na modificação de compostos bioativos e interferir na sua bioacessibilidade, esse estudo foi realizado para comparar amostras não digeridas e digeridas (em todas suas frações, incluindo as fases oral, gástrica e intestinal) de um extrato aquoso rico em GGM. A interferência do processo de digestão na bioacessibilidade dos compostos presentes nesse extrato, bem como a identificação do seu perfil fenólico, são os fundamentos iniciais do presente trabalho.

O trabalho é igualmente estruturado no ainda desconhecido potencial da GGM sobre os efeitos biológicos envolvidos na carcinogênese colorretal e na microbiota intestinal de um modelo animal experimental.

Somando-se a esses fundamentos e ainda relevante, é o enfoque do reaproveitamento de resíduos florestais subutilizados, como cascas e serragem, que podem estimular o interesse em um maior aproveitamento verde e integral de árvores de madeira macia, até então empregadas com maior interesse apenas na indústria de celulose e na geração de calor. Esta abordagem está dentro das tarefas estratégicas do *International Center for Underutilized Crops* em parceria com Organização para Alimentos e Agricultura (ICUC - International Center for Culturas Subutilizadas, n.d.) e cumpre as Metas de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas ao promover a melhora na eficiência destes recursos. Este contexto contribuirá para a diversificação de fontes renováveis garantindo sustentabilidade geral, social, econômica e potencializando a promoção da saúde mundial, além de favorecer uma maior consciência ambiental.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil químico de um extrato aquoso rico em GGM, além dos efeitos da digestão gastrointestinal simulada quanto à bioacessibilidade de compostos fenólicos, efeito citotóxico e antioxidante *in vitro*, bem como a modulação da microbiota intestinal e sua ação frente a lesões pré-neoplásicas em um modelo animal *in vivo*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) quanto à identificação do perfil fenólico do extrato aquoso de GGM:
 - analisar o conteúdo fenólico total pelo método *Folin-Ciocalteu*;
 - analisar o conteúdo de catequinas e epicatequinas pelo método HPLC;
 - analisar a atividade antioxidante através do método de eliminação de radicais livres (DPPH) e capacidade redutora de ferro (FRAP);
- b) realizar o processo de digestão gastrointestinal simulada *in vitro* da GGM e analisar as frações resultantes do processo de digestão da GGM (fase oral, gástrica e intestinal) pelos mesmos métodos utilizados para a análise da GGM;
- c) quanto ao potencial funcional dos extratos de GGM frente às linhagens celulares cancerosas SCC-9, A549 e HCT-8:
 - avaliar a viabilidade celular, atividade antiproliferativa e citotóxica pelo ensaio MTT;
 - avaliar a atividade antioxidante pelas formação de espécies reativas de oxigênio intracelular utilizando a sonda DCFH-DA;
- d) quanto ao potencial funcional do extrato de GGM em modelo *in vivo* em ratos *Wistar* quimicamente câncer-induzidos:
 - avaliar os parâmetros nutricionais e metabólicos dos animais;
 - avaliar o efeito anti-neoplásico da GGM pela análise de focos de criptas aberrantes (FCA) e focos depletados de mucina (FDM);
 - avaliar histopatologicamente e microestruturalmente os cólons dos animais;
 - avaliar o efeito da administração da GGM sobre a modulação da microbiota fecal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MÉTODO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DE HEMICELULOSE RICO EM GGM

A amostra utilizada nesse estudo foi cedida gentilmente pelo Dr. Petri Kilpeläinen do *Natural Resources Institute Finland* (Luke) e obtida a partir de serragem de madeira de abeto da Noruega (*Picea abies*) coletada em serrarias no centro e sul da Finlândia e enviada ao Brasil para condução dos experimentos. As amostras de serragem foram armazenadas em freezer a -20° antes das extrações sem sofrerem os processos de moagem ou qualquer outro tipo de tratamento. O processo de extração foi realizado com água quente pressurizada (PHWE) por um extrator de fluxo utilizando apenas água por 60 minutos a 170°C conforme descrito por Valoppi *et al.* (2019) ainda na Finlândia.

O extrato resultante desta etapa foi filtrado por um sistema de ultrafiltração (membranas PCI) utilizando membranas de polietersulfona tubular modificada (EM006). Antes da ultrafiltração, o pH do extrato foi ajustado para neutro com hidróxido de sódio para aumentar o fluxo do permeado através da membrana. À medida em que o pH diminuía durante a ultrafiltração, NaOH foi adicionado para manter o pH do concentrado neutro mantendo o fluxo do permeado estável. Ao final do processo, um concentrado foi coletado e utilizado como tal após a secagem por pulverização que foi realizada à temperatura de entrada de 170°C , temperatura de saída de 65°C e taxa de fluxo de ar de secagem de 667L/h (VALOPPI *et al.*, 2019). O conteúdo resultante foi armazenado em pacote protegido da luz e enviado ao Brasil, passando a ser mantido a uma temperatura de -20°C até o momento da sua utilização nas análises e nos experimentos (FIGURA 5).

Figura 5 – Extrato de GGM utilizado nesse estudo.



Fonte: Da autora (2023).

5.2 PROCESSO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA *IN VITRO*

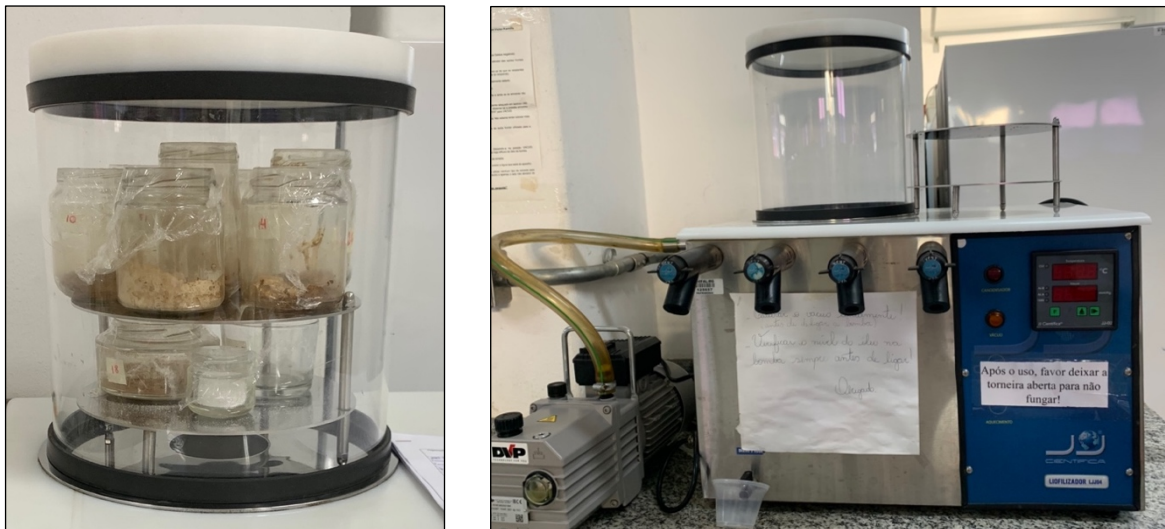
A simulação *in vitro* do processo de digestão gastrointestinal foi realizada conforme o protocolo COST INFOGEST (MINEKUS *et al.*, 2014). O protocolo incluiu as fases: oral, oral + gástrica e oral + gástrica + intestinal simulando o processo de digestão. Desta forma, 2g do extrato de GGM foram submetidos à fase oral (pH 7, solução de amilase) e 5g às fases gástrica (pH 2, solução de pepsina) e intestinal (pH 7, solução de pancreatina/sais biliares). As amostras foram colocadas em uma incubadora em banho-maria a 110 oscilações/minuto, a 37°C, durante 5 minutos na fase oral e durante 2 horas nas fases gástrica e intestinal. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM durante 10 minutos com o intuito de separar a fração solúvel ou bioacessível da fração residual precipitada, sendo coletados todos os sobrenadantes e *pellets* (resíduos). O processo de digestão foi realizado em duplicata. Foram realizados, ainda, tratamentos controles sem a adição das respectivas enzimas digestivas para cada uma das fases para verificar se a interferência no conteúdo de compostos fenólicos é devido à alteração enzimática ou alterações do pH. Nas amostras que seriam testadas em cultura de células, foi utilizado ainda 2% de ácido tricloroacético (TCA), após a digestão gastrointestinal, com o objetivo de se inibir as diferentes reações enzimáticas. Todas as amostras foram filtradas utilizando-se um filtro para seringa com membrana 0,22µm estéril e armazenados em microtubos estéreis para futura utilização em análises celulares. Controles sem a presença de amostra e contendo apenas as enzimas e os sais foram

realizados em paralelo e também analisados com o objetivo de se remover interferências dos reagentes utilizados no processo de digestão gastrointestinal.

5.3 ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS DE GGM

Todas as frações (sobrenadantes e resíduos) dos extratos de GGM não digerida, digeridas (fases oral, gástrica e intestinal) e respectivos controles das fases digeridas sem adição de enzimas digestivas, foram transferidas para potes de vidro previamente identificados e codificados, secas em um liofilizador de bancada (LJJ04 JJ Científica®, Brasil) e enviadas à Finlândia, onde foram realizadas as análises químicas: conteúdo fenólico total, conteúdo de catequinas e epicatequinas e atividade antioxidante DPPH e FRAP (FIGURA 6).

Figura 6 – Liofilização dos extratos digeridos de GGM.



Fonte: Da autora (2023). LFQMM - laboratório de fitoquímica e química medicinal e metabolômica da UNIFAL-MG.

5.3.1 Composição fenólica

O conteúdo fenólico total de todos os extratos de GGM foi determinado pela capacidade redutora de *Folin-Ciocalteu* conforme descrito por Satue; Huang; Frankel (1995). Para tal, cerca de 20mg das amostras liofilizadas de GGM foram dissolvidas em 10mL de água ultrapura. Resumidamente, foram misturados 150 μ L de amostra,

750µL de reagente *Folin-Ciocalteu* diluído 1:10 com água e 600µL de Na₂CO₃ a 7,5% (p/v) mantidos por 30 minutos no escuro. Foram utilizadas microplacas de 96 poços. As amostras foram lidas a 725nm, espectrofotometricamente, por meio de um Espectrofotômetro UV-1800 UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando água como branco. Os compostos fenólicos foram expressos como equivalentes de ácido gálico (AGE) em mg por grama de amostra de GGM, usando uma curva analítica de calibração padrão de ácido gálico de 8 pontos (VALOPPI *et al.*, 2019).

5.3.2 Atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP

No presente estudo, a atividade antioxidante da GGM bruta e das GGM digeridas foi determinada pelos ensaios DPPH e FRAP e expressa em mg de equivalente de ácido ascórbico por grama de GGM (AAE/g). A atividade eliminadora de radicais livres do DPPH foi avaliada utilizando-se o método descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). Para tal, foram utilizadas microplacas de 96 poços onde 40µL de amostras dos diferentes extratos de GGM diluídas (1:50 v/v) e 260µL de solução metanólica de 0,10mmol/L de DPPH foram adicionados. A absorbância foi registrada no comprimento de onda de 517nm por meio do espectrofotômetro de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA), após 30 minutos de reação, ao abrigo da luz e temperatura ambiente próxima a 25°C. Foi preparada a curva analítica com solução padrão de ácido ascórbico, na faixa de concentração de 0 a 21mg/L.

Já o poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi determinado pelo método apresentado por Benzie; Strain (1996). A preparação do reagente FRAP foi realizada com a mistura de 2,5mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10mmol.L⁻¹, 2,5mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20mmol.L⁻¹ e 25mL de tampão acetato 0,3mol.L⁻¹. Então, 120µL da amostra diluída foram misturados a 1680µL de reagente FRAP preparado no momento da reação. Ao final, as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C durante 30 minutos e em seguida, lidas em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 595nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados, calculados a partir da curva de calibração.

5.3.3 Composição de catequinas e epicatequinas nos extratos de GGM

Os compostos fenólicos catequinas e epicatequinas foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme descrito por Dos Santos Lima et al. (2022). O dispositivo de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Espoo, Finlândia) equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD) e uma coluna Gemini C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) foi usado e a separação foi realizada com uma eluição em gradiente de acetonitrila em 5% de ácido fórmico (aq). Todas as catequinas e epicatequinas foram quantificadas no comprimento de onda de detecção de 518 nm. Três réplicas foram analisadas a partir das amostras.

5.4 EXPERIMENTO *IN VITRO*

5.4.1 Condição de cultivo das linhagens celulares

As linhagens celulares cancerosas: SCC-9 (carcinoma de células escamosas de língua humana), A549 (adenocarcinoma de células epiteliais de pulmão humano) e HCT8 (adenocarcinoma ileocecal colorretal humano) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Todas as linhagens foram armazenadas em nitrogênio líquido a -195°C, em alíquotas de 2×10^6 células/mL em solução de congelamento combinada de 90% de soro bovino fetal (*Nutricell*) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, *SigmaAldrich*).

As células foram expandidas e cultivadas em meio de cultura DMEM/Ham-F12 (Gibco, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (SFB, Gibco, São Paulo, Brasil) e penicilina (100 unidades/mL), sendo que, ao meio de cultura destinado à linhagem SCC-9, foi adicionada uma solução de hidrocortisona (7,3µL/mL). As células foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂ e replicadas a cada 2 ou 3 dias.

5.4.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos em cultura de células

O efeito citotóxico *in vitro* dos extratos não digeridos e digeridos de GGM foram analisados por meio do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio). Os tratamentos envolveram, para todas as fases do processo

de digestão: a amostra não digerida, a amostra digerida e uma amostra controle somente com a presença das enzimas digestivas correspondentes a cada uma das fases do processo de digestão. As células de todas as linhagens foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100 μ L de extratos brutos e digeridos de GGM em concentrações seriadas relativas à quantidade de compostos fenólicos previamente definidos nas amostras (10, 25, 50, 100, 150 e 200 μ gAGE/mL). Após 48 horas de tratamento, 10 μ L de solução de MTT (0,5mg/mL) foram acrescentados em cada poço. Após 4 horas de período de incubação a 37°C com o MTT, os sobrenadantes de todos os poços foram removidos e os cristais de formazan que se formaram no fundo dos poços foram dissolvidos em 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para ser possível a leitura da absorbância. É importante ressaltar que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional à quantidade de células vivas presentes nos poços ao final do experimento. O MTT é um corante amarelo facilmente absorvido pelas células viáveis devido a sua natureza solúvel em água, e é reduzido ao formazan de cor roxa nas mitocôndrias (DO CARMO; GRANATO; AZEVEDO, 2021). Um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek) foi utilizado na leitura da absorbância com um comprimento de ondas de 570nm.

Conforme apresentado por Do Carmo *et al.* (2019), a concentração que reduz a viabilidade celular em 50% (IC_{50}), a concentração que inibe o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas (IG_{50}) e a concentração que resulta em uma morte celular ou letalidade de 50% em comparação com o número de células no início dos tratamentos (LC_{50}) foram determinadas. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicadas e a análise dose-resposta foi avaliada por regressão não-linear utilizando o *software* GraphPad Prism® versão 9.0.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.4.3 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A atividade antioxidante celular foi determinada por meio do ensaio de diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) utilizado para detectar produtos oxidativos de todas as linhagens celulares (DO CARMO *et al.*, 2019). As células SCC-9, A549 e HCT-8 foram cultivadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 6×10^4 célula por poço, 100 μ L/poço. Decorridas 24 horas de aderência, as células foram tratadas

com 100µL de diferentes concentrações seriadas dos extratos brutos e digeridos de GGM (5 – 15 µgAGE/mL) definidas logo após os resultados de IC₅₀. Os extratos foram previamente diluídos em solução de DCFH-DA (25mmol/L) com ou sem a presença de peróxido de hidrogênio (22,5µmol/L), durante 1 hora a 37°C. O peróxido de hidrogênio foi utilizado com o objetivo de induzir espécies reativas de oxigênio e avaliar a indução de ROS causada pelos extratos. O controle positivo foi tratado com H₂O₂ (22,5µmol/L). Após essa etapa de ação dos tratamentos, eles foram removidos, os poços foram então lavados com 100µL de tampão fosfato-salino (PBS) e foi adicionada uma combinação de H₂O₂ (22,5µmol/L) diluído em solução de HANKS em cada um dos poços. As células de controle negativo foram tratadas apenas com um meio de cultura o que foi utilizado para referenciar o percentual de proteção contra H₂O₂. A intensidade de fluorescência (emissão = 538nm e excitação = 485nm) foi mensurada como proposto por Escher *et al.* (2018) utilizando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek). O experimento foi conduzido em quadruplicata e os resultados, analisados com o *software* GraphPad Prism® versão 9.0.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.5 EXPERIMENTO *IN VIVO*

5.5.1 Animais utilizados no experimento

A condução experimental foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas - CEUA sob protocolo nº 0016/2021, (ANEXO A) e seguiu os Princípios Éticos Para Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais utilizados neste estudo foram ratos machos da linhagem *Wistar* (espécie *Rattus norvegicus*), apresentavam 28 dias de vida e peso corpóreo (p.c.) inicial entre 80 e 100 gramas aproximadamente, e eram procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas. Um total de 36 animais foram divididos em 6 grupos experimentais. Antes do experimento, os animais foram submetidos a um período de aclimação de 1 semana (22 ± 2 °C), umidade relativa (55 ± 10%) e alojados em caixas de polipropileno com ciclo claro/escuro de 12 horas com acesso *ad libitum* à ração e à água. Durante o período experimental, todos os animais foram mantidos nas mesmas condições. O peso dos

animais foi monitorado do início ao final do experimento, assim como o consumo alimentar e a ingestão de água.

5.5.2 Delineamento experimental *in vivo*

O delineamento experimental foi realizado com 6 grupos (n = 6 animais por grupo), totalizando 36 animais (TABELA 1). Os 36 animais foram distribuídos, aleatoriamente, nos grupos: EDTA (controle negativo), EDTA+400GGM (controle positivo GGM 400mg/kg), DMH (controle DMH), DMH+50GGM (DMH + GGM 50mg/kg), DMH+200GGM (DMH + GGM 200mg/kg) e DMH+400GGM (DMH + GGM 400mg/kg).

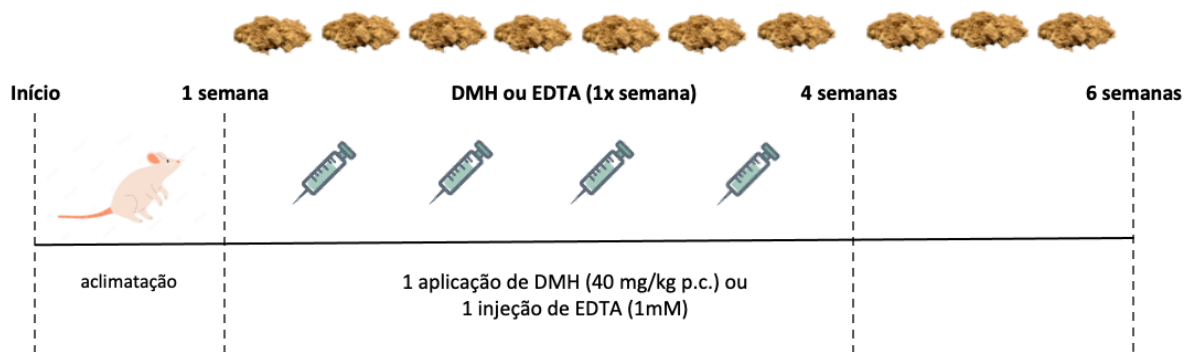
O tempo total de condução do experimento foi de 6 semanas. A GGM foi administrada aos animais 1 vez ao dia através de gavagem durante todo o período experimental. Os animais dos grupos induzidos ao câncer receberam a aplicação do pró-carcinógeno DMH, durante 4 semanas do experimento. As diferentes doses de GGM utilizadas neste estudo foram estabelecidas com base em trabalhos anteriores que utilizaram a mesma amostra e o mesmo modelo animal (PAN *et al.*, 2012; KONKOL *et al.*, 2017; KONKOL *et al.*, 2019). O DMH foi administrado nos animais sempre com intervalo de 7 dias, 1 vez por semana, durante o período de 4 semanas, por via subcutânea (s.c.), de forma que a dose final foi de 160 mg/kg p.c. ao final da quarta semana conforme delineamento proposto por Fidelis *et al.* (2021). Os animais do grupo controle negativo (EDTA) e controle GGM (EDTA + GGM 400mg/kg) receberam a mesma quantidade de EDTA 1mM s.c., com o intuito de se simular o estresse experimental ao qual os demais animais também foram submetidos.

Tabela 1 - Grupos experimentais do modelo experimental *in vivo*.

Grupos	Tratamentos
EDTA	Controle negativo (EDTA 1 mM, s.c.)
EDTA + 400GGM	Controle GGM (EDTA 1 mM, s.c. + GGM 400mg/kg p.c.)
DMH	Controle positivo (DMH 40 mg/kg p.c., s.c.)
DMH + 50GGM	GGM 50 (DMH 40 mg/kg p.c., s.c. + GGM 50mg/kg p.c.)
DMH + 200GGM	GGM 200 (DMH 40 mg/kg p.c., s.c. + GGM 200mg/kg p.c.)
DMH + 400GGM	GGM 400 (DMH 40 mg/kg p.c., s.c. + GGM 400mg/kg p.c.)

Fonte: Elabora pela autora (2023).

Legenda: EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); GGM (galactoglucomanana); DMH (1,2 Dimetilhidrazina); s.c. (subcutâneo); p.c. (peso corpóreo).

Figura 7 – Delineamento do experimento *in vivo*.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Início a 1 semana: período de adaptação animal; do final semana 1 até o final da semana 4: período de 4 semanas com aplicação de 1 injeção de DMH por semana, durante 4 semanas, com administração concomitante de GGM; do final da semana 4 ao final da semana 6: período de 2 semanas de administração da GGM; final da semana 6: eutanásia.

5.5.3 Agente de indução de lesão colorretal (DMH)

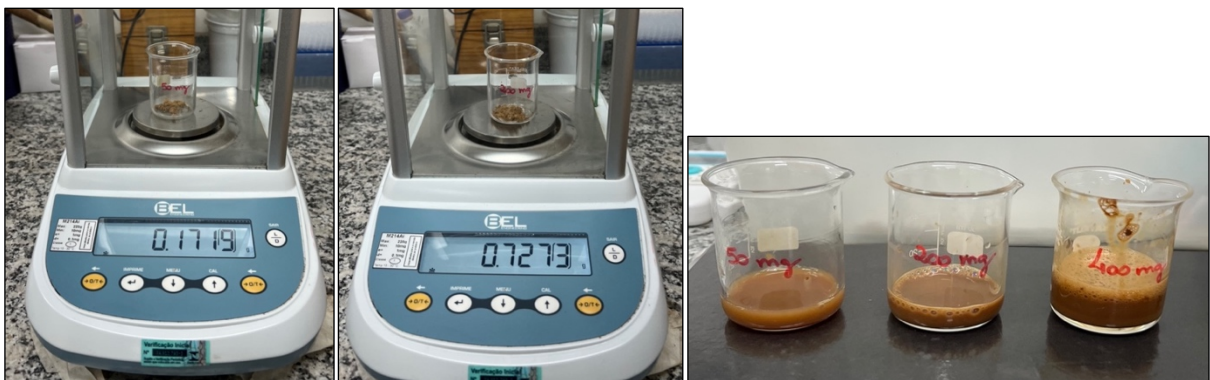
Para avaliar os efeitos da GGM em ratos com câncer de cólon, os animais foram induzidos às lesões neoplásicas pela administração de quatro injeções subcutâneas (s.c.) de dicloridrato de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 40 mg/kg p.c., *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), uma vez por semana durante o total de quatro semanas. O pró-carcinógeno foi dissolvido no veículo ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA, 1mM) e os animais dos grupos não induzidos receberam injeções semelhantes de solução de EDTA para simular o estresse experimental pelo qual passaram os outros animais.

5.5.4 Caracterização da GGM bruta administrada por gavagem e da ração comercial consumida pelos animais

A ração fornecida aos animais foi a ração comercial peletizada Nuvilab® CR-1 irradiada (Quimtia S/A, Colombo, Brasil) em livre acesso. De acordo com o fabricante, a composição química de interesse da ração revela a presença de proteínas (220 g/kg), fibra bruta (70 g/kg) e lipídeos (50 g/kg). Segundo Kilpeläinen *et al.* (2014) e Valoppi *et al.* (2019), o extrato aquoso rico em GGM oriundo da serragem de abeto da Noruega utilizado nesse estudo é composto por 17% de lignina, 75% de hemicelulose e 7,5% de extrativos, sendo 734,7 mg de carboidratos totais por grama de GGM, dados importantes para o cálculo de ingestão calórica dos animais.

As dosagens dos extratos de GGM bruta fornecidos por gavagem aos animais foram determinadas conforme parâmetros utilizados em estudo prévios que investigaram os efeitos deste mesmo extrato em modelos animais experimentais (PAN *et al.*, 2012; KONKOL *et al.*, 2017; KONKOL *et al.*, 2019). Diariamente, os animais eram pesados e a GGM, preparada em diluição em água e administrada uma vez ao dia proporcionalmente ao peso apresentado por cada animal no momento da pesagem (2mL/kg), nas dosagens de 50, 200 e 400 (mg/kg p.c.) (FIGURA 8) durante 5 semanas.

Figura 8 – Processo de preparo da GGM para gavagem (pesagem e diluição da GGM).



Fonte: Da autora (2023).

5.5.5 Cálculo dos parâmetros nutricionais e metabólicos

Para determinar os parâmetros nutricionais e metabólicos, dados como: peso, quantidade de ração ingerida, quantidade de gavagem administrada e volume de água

consumido foram anotados diariamente e, posteriormente, tabulados. As equações para os cálculos de BMG (ganho de massa corporal), SGR (taxa de crescimento específica), MGR (taxa de crescimento metabólico), PER (taxa de eficiência proteica) e FER (taxa de eficiência alimentar) estão apresentadas na Figura 9 (FERREIRA *et al.*, 2018; PRADO-SILVA *et al.*, 2014). As equações consideraram os dados de cada rato individualmente, conforme proposto por Kumar *et al.* (2011). A equação de FER foi empregada segundo Kalra; Jood (1998).

Figura 9 – Equações utilizadas para determinação nutricional e metabólica dos animais.

$$\begin{aligned}
 \text{BMG - ganho de massa corporal} &= \text{BMG(\%)} = \frac{\text{Massa corporal final} - \text{Massa corporal inicial}}{\text{Massa corporal inicial}} \times 100 \\
 \text{SGR - taxa de crescimento específica} &= \text{SGR(\% por dia)} = \frac{\text{Massa corporal final (g)} - \text{Massa corporal inicial (g)}}{\text{Número de dias de experimento}} \times 100 \\
 \text{MGR - taxa de crescimento metabólico} &= \text{MGR(g kg}^{0.8} \text{ dia}^{-1}) = \frac{\text{BMG (g)}}{\left\{ \frac{\left(\frac{\text{Massa corporal inicial (g)}}{1000} \right)^{0.8} + \left(\frac{\text{Massa corporal final (g)}}{1000} \right)^{0.8}}{2} \right\}} \\
 &\quad \times \frac{1}{\text{Duração dos dias de experimento}} \\
 \text{PER - taxa de eficiência proteica} &= \text{PER} = \frac{\text{Ganho de peso corporal (g)}}{\text{Consumo de proteína (g)}} \\
 \text{FER - taxa de eficiência alimentar} &= \text{FER} = \frac{\text{Ganho de peso corporal (g)}}{\text{Consumo alimentar (g)}}
 \end{aligned}$$

Fonte: Adaptado de Prado-Silva *et al.* (2014).

5.5.6 Análise da composição da microbiota intestinal e eutanásia

Para a análise da composição da microbiota intestinal, as fezes dos animais de cada grupo foram coletadas assepticamente ao final do estudo. Logo em seguida, todos os animais foram anestesiados com ketamina (0,08 mg/kg p.c.) e xilazina (0,04 mg/kg p.c.) e eutanasiados. Após a eutanásia, foi realizada laparotomia seguida da excisão dos cólons. Estes passaram por um processo de limpeza, com solução salina 0,9%, com o objetivo de se eliminar os resíduos fecais. As partes distais (ceco) dos cólons foram retiradas para futura análise histomorfológica. Os cólons ainda foram abertos longitudinalmente, esticados em placas de poliestireno previamente

codificadas, fixados com formalina tamponada com fosfato a 10% não ultrapassando o período de 24 horas. Após este período, eles foram removidos das placas e preservados em álcool 70% até a realização da análise (DIAS *et al.*, 2010).

5.5.7 Focos de criptas aberrantes (FCA) e focos depletados de mucina (FDM) nos cólons

Os intestinos removidos dos animais foram separados igualmente em fragmentos proximal, medial e distal após a fixação. Foi realizada a coloração dos intestinos com azul de metileno a 0,2% (m/v) durante 1 minuto e colocados em lâminas e observados em microscópio com a face mucosa voltada para cima. Para a detecção de focos de criptas aberrantes (FCA), campos sequenciais dos segmentos médio e distal dos cólons foram analisados em microscópio de luz, com aumento de 100x. Um FCA se diferencia das criptas normais por apresentar paredes mais escuras, espessas e elevadas, com lúmens alongados e distância significativamente ampliada da lâmina até a superfície basal (BIRD, 1995). O número de FCAs e o número de criptas aberrantes (CA) por foco foram anotados e categorizados determinando a quantidade de criptas aberrantes identificadas para cada foco analisado.

Os segmentos dos cólons foram armazenados em solução de etanol a 70% (v/v) com o objetivo de se remover o azul de metileno para análise de focos depletados de mucina (FDM). Os cólons foram depositados em solução de azul de toluidina 1% em ácido acético 3% durante 5 minutos conforme proposto por Prado-Silva *et al.* (2014). As amostras foram observadas em microscópio com uma ampliação de 40x para identificação dos focos depletados de mucina. O FDM tem como características: ausência ou produção escassa de mucina, distorção da abertura do lúmen em comparação às criptas circundantes normais e elevação acima da superfície da mucosa normal (CUI *et al.*, 2012).

5.5.8 Processamento histológico

Fragmentos de cólon foram fixados em formalina tamponada a 10% (pH 7,2) por 24 horas, desidratados em etanol, diafanizados em xileno e embebidos em parafina (DO CARMO *et al.*, 2021). Cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados em *Alcian Blue* e *Fast Red* para detecção

histoquímica de mucina (SEQUETTO *et al.*, 2013, 2014). Os cortes histológicos foram obtidos em semi-séries, coletando um em cada 20 cortes para evitar a análise da mesma área intestinal (SANTOS *et al.*, 2018). As imagens digitais foram obtidas utilizando um fotomicroscópio de campo claro (Axioscópico A1, Carl Zeiss, Alemanha). Doze campos microscópicos foram amostrados aleatoriamente para cada animal usando uma lente objetiva de 40x (ampliação de 400x) (DO CARMO *et al.*, 2021). Assim, foi analisada uma área de 62,8 x 105 μm^2 da área do cólon para cada um dos grupo experimentais.

5.5.9 Análise histopatológica e microestrutural

A análise histopatológica do cólon foi realizada de forma comparativa, utilizando os animais tratados com veículo (Grupo EDTA) como referência da microestrutura intestinal normal. Assim, evidência microscópica de hipertrofia do epitélio de revestimento, mucosa e criptas; infiltrado inflamatório, distribuição de células caliciformes e tecido conjuntivo da lâmina própria foram analisados qualitativamente (NOVAES *et al.*, 2016; SEQUETTO *et al.*, 2013, 2014).

A microestrutura do cólon foi analisada quantitativamente a partir de planimetria computacional 2D usando uma ferramenta de medição linear (“*drag line feature*”) do *software* de análise de imagens Image Pro-Plus 4.5® (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA) (NOVAES *et al.*, 2016). Os seguintes parâmetros microestruturais foram analisados (SEQUETTO *et al.*, 2013, 2014): (i) espessura da mucosa, (ii) altura do epitélio de revestimento, (iii) número de criptas por área histológica, (iv) profundidade das criptas e (v) largura das criptas. O número de criptas por área histológica foi quantificado em cortes transversais e dividido pela área da imagem. Os demais parâmetros foram estimados a partir de cortes longitudinais. A profundidade e largura das criptas foram quantificadas a partir de 120 criptas por animal. A largura foi medida na região central de cada cripta. A espessura da mucosa foi calculada como o valor médio da espessura medida na região central e em dois pontos equidistantes nas extremidades direita e esquerda das imagens histológicas (DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2023).

A distribuição relativa da mucina (%) foi quantificada utilizando um método de segmentação por cores previamente relatado (GONÇALVES *et al.*, 2019). Resumidamente, as imagens foram convertidas para o canal de 8 bits e submetidas à

segmentação de cores para preto e branco. A área histológica ocupada por essas moléculas foi computada automaticamente utilizando a função limiar do programa imagem J, com as mucinas segmentadas em preto (DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2023).

5.5.10 Análises do conteúdo bacteriano em amostras fecais

Foi realizada a análise quantitativa do conteúdo bacteriano das fezes dos animais que participaram do experimento. Um dia antes do momento da eutanásia, as fezes de cada um dos animais foram coletadas assepticamente e separadas por grupo. O DNA total foi extraído das amostras fecais de todos os grupos utilizando um QIAamp DNA Stool Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Alemanha*). Para tal, pequenas porções das fezes foram ressuspensas em uma solução salina estéril. Antes do momento de extração do DNA e com o objetivo de impedir qualquer efeito inibitório, o tampão InhibitEX foi adicionado. O DNA total foi obtido usando a coluna de spin QIAamp e quantificado por *Invitrogen Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA)*. Um nanograma de DNA total foi utilizado na análise de genes de RNA ribossômico 16S (rRNA) usando *primers* específicos para Bactérias Totais, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Gammaproteobacteria* (TABELA 2) (DO CARMO *et al.*, 2021; DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2022).

Foi realizada a PCR em tempo real em um volume final de 10 μ L que continha SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), cDNA como modelo de PCR e 20 μ M de *primers*. A PCR foi realizada utilizando o *StepOne PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)* usando os seguintes parâmetros de ciclagem: 60°C por 10 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e uma etapa de dissociação de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos. A normalização dos valores de expressão dos genes alvo foi realizada utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH. O método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência foi usado no cálculo da expressão relativa de cada gene. Todas as medições foram realizadas em triplicatas (DO CARMO *et al.*, 2021; DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2022).

Tabela 2 - Sequências de *primers* utilizados na análise de microbiota fecal dos animais para PCR em tempo real.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Bactérias totais	5'- AAACCTCAAAGGAATTGACGG-3'	5'- CTCACRRCACGAGCTGAC-3'
<i>Firmicutes</i>	5'-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3'	5'- AGCTGACGACAACCATGCAC-3'
<i>Bacteroidetes</i>	5'- GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3'	5'- TTAASCCGACACCTCACGG-3'
<i>Gammaproteobacteria</i>	5' -GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3'	5' -GCCATGCRGCACCTGTCT-3'

Fonte: Adaptado de Do Carmo *et al.* (2021).

Legenda: Símbolos de nucleotídeos: R = A ou G; Y = C ou T; S = C ou G. *Bacteroidetes* (Bac960F e Bac1100R), *Firmicutes* (Firm934F e Firm1060R), *Gammaproteobacteria* (Gamma877F e Gamma1066R) e bactérias totais (926F e 1062R).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em quadruplicata e os resultados, expressos como médias seguidas do desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram comparadas usando análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*) para experimentos aleatorizados. As médias foram comparadas usando o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Quando duas amostras foram comparadas, foi realizado um teste-t de *Student* não pareado. O *software* utilizado para a análise estatística de todos os resultados foi o *Graph Pad Prism*® (Versão 9.0.0) e também para as representações gráficas.

Para a análise estatística da histomorfometria, os dados foram representados como mediana e intervalo interquartil. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados com distribuição normal foram comparados por meio da ANOVA unidirecional seguida do teste de *Student-Newman-Keuls*. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste *Kruskal-Wallis* (*One-way ANOVA*). Resultados com valor de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE GGM

O extrato de GGM utilizado neste estudo foi proveniente de serragem de abeto da Noruega obtido pelo método de extração com água quente pressurizada (PHWE) que utiliza água como solvente, sendo considerado assim, um processo de extração ecológico, seguro e livre de produtos químicos nocivos, além de preservar uma maior quantidade de compostos fenólicos, pois não é precipitado com etanol (VALOPPI *et al.*, 2019). O final desse processo resultou em uma mistura heterogênea que contém, sobretudo, hemiceluloses, lignina e extrativos (PITHÄNEN; HEINONEN; MIKKONEN, 2018; VALOPPI *et al.*, 2019).

Para melhor compreender os efeitos biológicos potenciais dos compostos fenólicos, o perfil químico da GGM foi investigado e apontou uma quantidade de fenólicos totais estimada em $33,12 \pm 2,13$ mg AGE/g (TABELA 3), próximo ao conteúdo encontrado por Valoppi *et al.* (2019) (40mg AGE/g) e Mikkonen *et al.* (2019) (48,7mg AGE/g) também na investigação do mesmo extrato aquoso de GGM proveniente também do abeto norueguês. Porém, diferente do conteúdo total fenólico presente em outros tipos de casca de pinheiros que sofreram extração hidroalcóolica, como *Pinus roxburghii*, *Pinus wallichiana* e *Pinus gerardiana* ($246,66 \pm 1,52$ mg AGE/g, $222,33 \pm 1,15$ mg AGE/g e $248,66 \pm 0,57$ mg AGE/g, respectivamente) (SHARMA; GOYAL; SHARMA, 2016). É conhecido que a casca corresponde a uma parte da árvore especialmente complexa. Alterações sazonais de tratamento e armazenamento da casca de abeto norueguês alteram a atividade e diminuem a quantidade de compostos fenólicos como taninos e glicosídeos. A integridade da casca e suas camadas (externa e interna) também se diferenciam na quantidade de compostos bioativos (JYSKE *et al.*, 2020b). Além disso, a utilização de forças centrífugas no processo de extração pode modular a composição, quantidade e característica do conteúdo fenólico do sobrenadante dos extratos de GGM (VALOPPI *et al.*, 2019a).

Tabela 3 - Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de GGM bruta e de suas frações resultantes das fases de digestão oral, gástrica e intestinal *in vitro* e seus respectivos controles sem adição de enzimas digestivas.

Amostras	Conteúdo Fenólico Total (mg AGE/g)	Bioacessibilidade %	DPPH (mg AAE/g)	Atividade %	FRAP (mg AAE/g)	Atividade %	
GGM Bruta	33.12±2.13 ^a	100±0.00 ^a	77.01±2.24 ^a	100±0.00 ^a	96.12±1.49 ^a	100±0.00 ^a	
Sobrenadante	Digestão Oral						
	GGM Oral	20.85±0.61 ^b	62.96±1.84 ^b	11.13±0.12 ^{bc}	14.45±0.16 ^c	8.84±0.67 ^d	9.19±0.69 ^e
	GGM Oral + Enzima	18.47±0.69 ^{bc}	55.78±2.08 ^{cd}	12.49±0.24 ^b	16.22±0.31 ^b	11.17±0.49 ^{bcd}	11.62±0.51 ^{cd}
	Digestão Gástrica						
	GGM Gástrica	20.51±0.70 ^b	61.94±2.11 ^b	10.43±0.30 ^{bcd}	13.55±0.40 ^d	13.45±0.37 ^b	13.99±0.38 ^b
	GGM Gástrica + Enzima	19.06±0.30 ^{bc}	57.56±0.90 ^c	10.8±0.47 ^{cd}	13.09±0.61 ^d	9.92±0.92 ^{cd}	10.32±0.96 ^{de}
	Digestão Intestinal						
	GGM Intestinal	17.65±0.09 ^b	53.29±0.28 ^{de}	8.42±0.20 ^{de}	10.93±0.26 ^e	11.82±0.45 ^{bc}	12.30±0.47 ^{bc}
	GGM Intestinal + Enzima	19.06±0.44 ^{bc}	57.54±1.33 ^c	10.30±0.16 ^{bcd}	13.37±0.21 ^d	10.52±1.01 ^{cd}	10.95±1.05 ^{cde}
Pellet	Digestão Intestinal						
	GGM Intestinal	18.33±0.38 ^c	55.33±1.15 ^{cd}	8.29±0.07 ^{de}	10.77±0.09 ^e	11.33±0.40 ^{bc}	11.78±0.42 ^{cd}
	GGM Intestinal + Enzima	16.60±0.22 ^c	50.12±0.66 ^e	7.44±0.04 ^e	9.67±0.05 ^f	10.12±0.91 ^{cd}	10.53±0.95 ^{cde}

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; FRAP, Poder Antioxidante Redutor Férrico; AGE, ácido gálico equivalente; AAE, ácido ascórbico equivalente. Médias ± DP. ^{a, b, c, d, e, f} letras diferentes revelam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Entretanto, para exercerem suas propriedades biológicas, os compostos fenólicos devem ser bioacessíveis. Assim, buscando a melhor compreensão da bioacessibilidade desses compostos, foi investigado também o perfil químico dos extratos de GGM digeridos. As frações resultantes das fases do processo de digestão simulada *in vitro* (oral, gástrica e intestinal) do extrato de GGM foram analisados juntamente com seus respectivos controles sem a adição de enzimas digestivas com o objetivo de se compreender além da ação do trato gastrointestinal, a função das enzimas nesse processo.

Segundo Martini; Conte; Tagliazucchi (2018), a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* diminui a liberação de compostos fenólicos. De fato, foi possível constatar que a GGM não digerida apresentou uma maior concentração de conteúdo fenólico total estimado (33,12mg AGE/g), diferente das GGMs digeridas que apresentaram uma variação de 17,65 a 20,85mg AGE/g (FIGURA 10). Ou seja, o início

do processo de digestão, fase oral, reduziu a 62,96% a bioacessibilidade destes fenólicos em comparação à GGM não digerida. Isso foi ainda mais evidente na presença das enzimas digestivas que alcançou 55,78% da bioacessibilidade inicial, possivelmente devido à degradação ou mudanças estruturais iniciais desses compostos promovidas pela ação enzimática. No entanto, avaliando a etapa final do processo de digestão, fase intestinal, a bioacessibilidade foi maior na presença das enzimas digestivas (57,54%) comparada a GGM digerida sem a presença de enzimas (53,29%) apontando as alterações de pH como provável agente modificador destes compostos fenólicos a partir da fase gástrica.

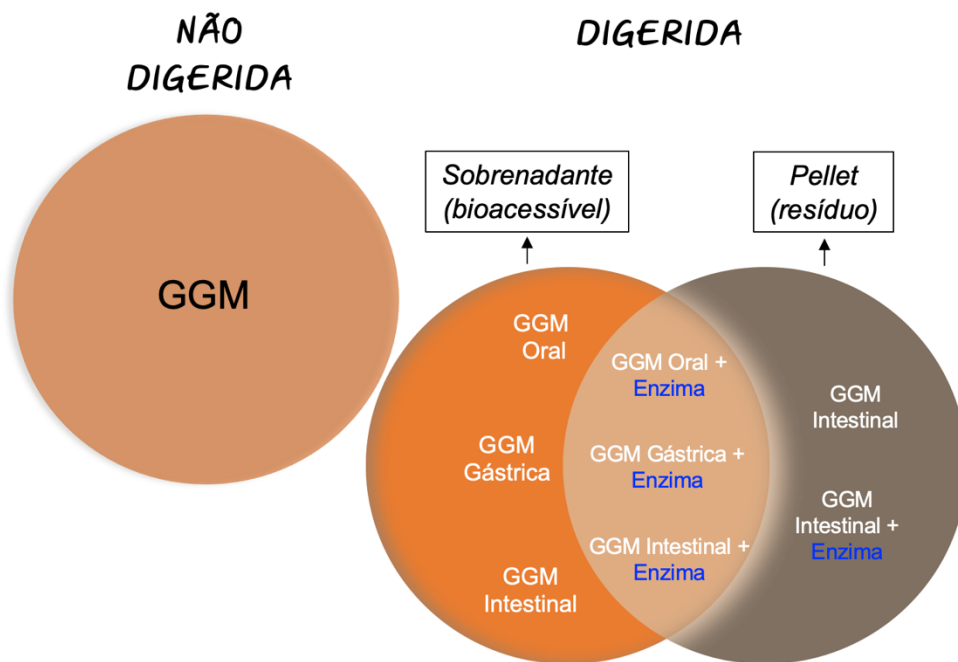
Existem diversos tipos de ligações entre a cadeia de carboidratos e as complexas estruturas nativas de fenólicos presentes na GGM (LEHTONEN *et al.*, 2018) que também justificam esta variação na bioacessibilidade, mas o que torna este nível de perda ainda mais interessante é a composição característica desta hemicelulose. A GGM é um polissacarídeo de parede celular vegetal geralmente resistente à digestão no trato gastrointestinal superior, conseguindo manter sua estrutura e conformação ao longo do processo de digestão *in vitro*, resistindo às condições orais e gástricas e permanecendo estável até a fase intestinal, além de se conservar inalterável em uma ampla faixa de pH e em alterações termodinâmicas conforme constatado por Zhao *et al.* (2020).

Comparando a digestão com enzima e a digestão sem enzima, a bioacessibilidade de compostos fenólicos no sobrenadante diminuiu nas fases oral e gástrica 7,18% e 4,38%, respectivamente. De forma interessante, na fase intestinal que corresponde ao final do processo de digestão, a bioacessibilidade dos compostos aumentou (4,25%). Este dado é confirmado com a análise da relação *pellet* (resíduo) e sobrenadante onde se constatou o aumento da bioacessibilidade no sobrenadante (57,54mg AGE/g) que é a parte biodisponível dessa matriz, e a sua respectiva diminuição no resíduo (50,12mg AGE/g). Com estes achados é possível afirmar que o intestino se comportou como um agente promotor da liberação de compostos fenólicos da GGM em comparação à boca e ao estômago, apesar da baixa bioacessibilidade geral.

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos no trato gastrointestinal é complexa e influenciada por diversos fatores, como: estrutura química, peso molecular, liberação da matriz alimentar, absorção gastrointestinal, metabolismo da microbiota e a extensão da digestão são alguns dos pontos que devem ser

considerados na avaliação dos resultados de um processo de análise de compostos fenólicos (CAO *et al.*, 2021; COSTEA *et al.*, 2020). A modificação nos perfis e menor estabilidade desses compostos bioativos encontrados neste trabalho evidenciam a diminuição da sua bioacessibilidade.

Figura 10 - Diagrama do conteúdo fenólico total das amostras de GGM não digerida e digeridas.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: GGM oral (GGM submetida à fase oral do processo de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*); GGM gástrica (GGM relativa à fase oral e gástrica); GGM intestinal (GGM relativa às fases oral, gástrica e intestinal); + Enzima (acréscimo de enzimas digestivas).

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP)

O prejuízo da digestão gastrointestinal na GGM aconteceu de tal forma que a atividade antioxidante (DPPH e FRAP) correspondeu a 9-16% em comparação à GGM não digerida. A presença de enzimas digestivas também foi responsável pelas alterações antioxidantes apresentadas pela fase gástrica do processo de digestão (TABELA 3). Em comparação ao controle sem enzima, elas diminuíram FRAP (de 13,45 para 9,92mg AAE/g) e na comparação entre as três fases, diminuíram DPPH (de 12,49mg AAE/g para 10,8mg AAE/g).

Apesar das análises de FRAP e DPPH apontarem a diminuição do potencial antioxidante da GGM após o processo de digestão simulada, possivelmente provocado pela diminuição da bioacessibilidade de compostos fenólicos após a ação do trato gastrointestinal, esse efeito não foi observado na avaliação antioxidante em cultura de células como será apresentado na seção 6.3.2 da experimentação celular *in vitro* neste trabalho.

6.3 PERFIL QUÍMICO: CATEQUINAS E EPICATEQUINAS

As catequinas são compostos fenólicos encontrados em diversos alimentos naturais e em bebidas à base de planta, principalmente no chá verde. O grupo das catequinas inclui as epigalocatequina-3-galato, epigalocatequina, epicatequina, epicatequina 3-galato, galocatequina galato e galocatequinas (KHAN; MUKHTAR, 2019). Estes compostos demonstram atividades moduladoras antivirais, antiapoptóticas, nefroprotetoras, neuroprotetoras e de eliminação de radicais livres que são fortemente associadas às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DINIZ *et al.*, 2021; MARTINEZ POMIER; AHMED; MELACINI, 2020).

A epicatequina constitui um dos tipos de catequina mais resistente à simulação de digestão gastrointestinal *in vitro* em comparação à epigalocatequina-3-galato, por exemplo, o que pode ser explicado pelo anel B diidroxila (porção catecol). As diferenças estruturais deste anel podem ser úteis na previsão da sensibilidade intestinal das catequinas, pois, quando em pH próximo ao neutro, a capacidade de doação de elétrons dos grupos pirogalol para epigalocatequina-3-galato é maior do que para grupos catecol na epicatequina resultando em um aumento na taxa de oxidação e tornando a epicatequina mais resistente à digestão (GREEN *et al.*, 2007; MOCHIZUKI *et al.*, 2002; OH *et al.*, 2021) e, por isso, estes compostos foram utilizados como referência para comportamento fenólico neste estudo.

Foram encontrados baixos valores de catequinas na GGM não digerida ($45,2 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$), porém valores mais altos que nas GGMs digeridas (variou entre $32,96 \pm 0,56$ e $41,86 \pm 1,51 \mu\text{g/g}$) como pode ser visto na Tabela 4. Os sobrenadantes das GGMs digeridas apresentaram maior teor de catequinas e epicatequinas totais (variou de 139,89 a 181,72 $\mu\text{g/g}$) que os *pellets* (46,07 a 93,02 $\mu\text{g/g}$) demonstrando que elas se encontram biodisponíveis mesmo após o processo de digestão. Catequinas geralmente são pouco solúveis em água e menos detectadas em análises quando a

água é utilizada como solvente de um composto como é o caso da GGM utilizada nesse estudo (FERREIRA-SANTOS *et al.*, 2020).

No geral, o trato gastrointestinal diminuiu a bioacessibilidade do total de catequinas e epicatequinas (de 221 para 139,89 $\mu\text{g/g}$), mas as enzimas garantiram que a quantidade desses compostos se mantivesse estável na fase intestinal (166,44 para 167,66 $\mu\text{g/g}$). O padrão de liberação de catequinas e epicatequinas foi diferente do que aconteceu com os fenólicos totais. Catequina e epicatequinas diminuíram ao longo de todas as etapas do processo de digestão, com a menor quantidade encontrada na fase intestinal (139,89 \pm 1,59 $\mu\text{g/g}$). Esta estabilidade na quantidade de fenólicos totais aconteceu possivelmente pela presença de outros compostos fenólicos presentes na GGM, ainda mais resistentes à digestão, e que não foram investigados nesse estudo.

A estabilidade das catequinas e epicatequinas é considerada baixa em condições de pH neutro e quase alcalino, pois elas sofrem oxidação nestes meios, e é considerada mais estável em ambientes ácidos (HARATIFAR; MECKLINGB; CORREDIGA, 2014; NIEDZWIECKI *et al.*, 2016). De fato, quando se remove a variável enzima, fica mais claro que a perda no total de catequinas e epicatequinas na fase intestinal foi devido às alterações de pH (de 176,8 \pm 6,80 da fase oral para 139,89 \pm 1,59 $\mu\text{g/g}$ na fase intestinal).

Tabela 4 – Teor de catequinas e epicatequinas na GGM bruta e em sobrenadantes e *pellets* (resíduos) das frações resultantes da digestão oral, gástrica e intestinal *in vitro* e seus respectivos controles sem adição de enzimas digestivas.

Amostra		Catequina ($\mu\text{g/g}$)	Epicatequina ($\mu\text{g/g}$)	Total ($\mu\text{g/g}$)
Bruta		45.2 \pm 0.20 ^a	176.6 \pm 0.30 ^a	221.00 \pm 0.5 ^a
Sobrenadante (biodisponível)	Digestão Oral			
	GGM Oral	41.65 \pm 3.31 ^b	135.15 \pm 2.55 ^{bc}	176.8 \pm 6.80 ^{bc}
	GGM Oral + Enzima	41.86 \pm 1.51 ^b	139.86 \pm 4.72 ^b	181.72 \pm 6.62 ^b
	Digestão Gástrica			
	GGM Gástrica	36.26 \pm 0.70 ^c	130.19 \pm 1.65 ^c	166.45 \pm 2.47 ^d
	GGM Gástrica + Enzima	35.78 \pm 0.68 ^c	130.66 \pm 2.56 ^c	166.44 \pm 3.42 ^{cd}
	Digestão Intestinal			
	GGM Intestinal	32.96 \pm 0.56 ^{cd}	106.93 \pm 0.79 ^d	139.89 \pm 1.59 ^e
GGM Intestinal + Enzima	37.92 \pm 3.49 ^{bc}	129.74 \pm 1.99 ^c	167.66 \pm 5.99 ^{cd}	
Pellet (resíduo)	Digestão Oral			
	GGM Oral	18.17 \pm 1.74 ^e	52.14 \pm 0.66 ^{gh}	70.31 \pm 2.42 ^g
	GGM Oral + Enzima	27.75 \pm 1.22 ^d	65.27 \pm 0.61 ^e	93.02 \pm 1.83 ^f
	Digestão Gástrica			
	GGM Gástrica	8.13 \pm 0.05 ^{ef}	37.94 \pm 0.87 ⁱ	46.07 \pm 0.87 ^h
	GGM Gástrica + Enzima	12.97 \pm 0.30 ^{ef}	57.17 \pm 0.40 ^{fg}	70.14 \pm 0.81 ^g
	Digestão Intestinal			
	GGM Intestinal	9.77 \pm 0.56 ^{ef}	60.78 \pm 0.69 ^{ef}	70.55 \pm 1.16 ^g
GGM Intestinal + Enzima	6.99 \pm 0.26 ^f	49.02 \pm 0.19 ^h	56.01 \pm 0.38 ^h	

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: Médias \pm DP. ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i} letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.4 EXPERIMENTO *IN VITRO*

6.4.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de GGM *in vitro*

Imediatamente após a identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de GGM, seus efeitos antiproliferativos e citotóxicos *in vitro* foram analisados em um experimento fundamentado em cultura de células cancerosas com as linhagens SCC-9 (carcinoma de células escamosas de língua humana), A549 (adenocarcinoma de células epiteliais de pulmão humano) e HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal colorretal humano) (TABELA 5). Foram estudadas diferentes concentrações

(10 - 200µg AGE/mL) referentes à quantidade de fenólicos totais presentes em cada extrato bruto e dos seus respectivos correspondentes em cada uma das fases do processo de digestão *in vitro*, boca, estômago e intestino (FIGURA 11).

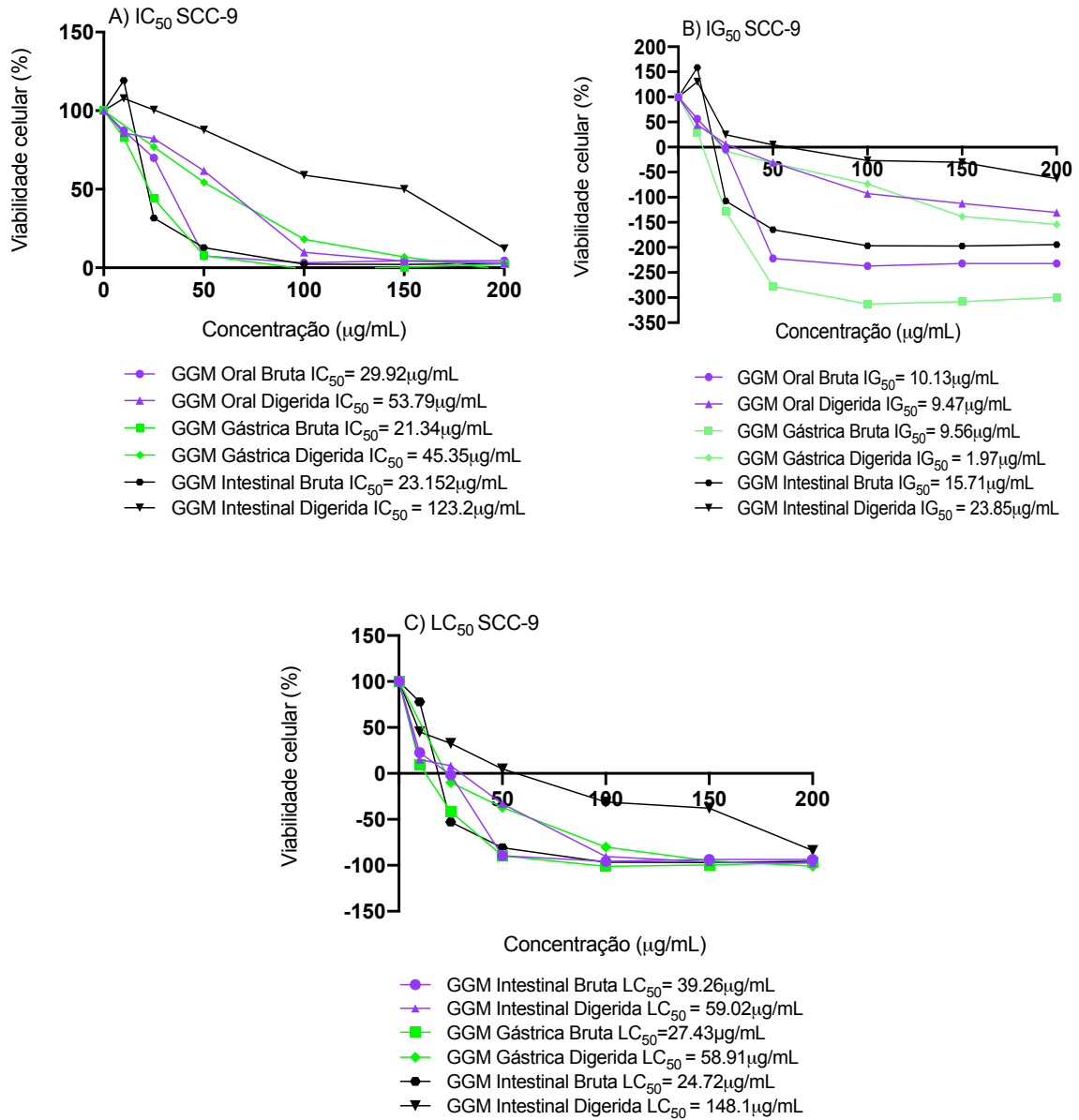
Tabela 5 – Viabilidade, inibição de crescimento e morte celular das linhagens SCC-9, A549 e HCT-8 após 48 horas de exposição aos extratos brutos e digeridos de GGM expressos em µg/mL.

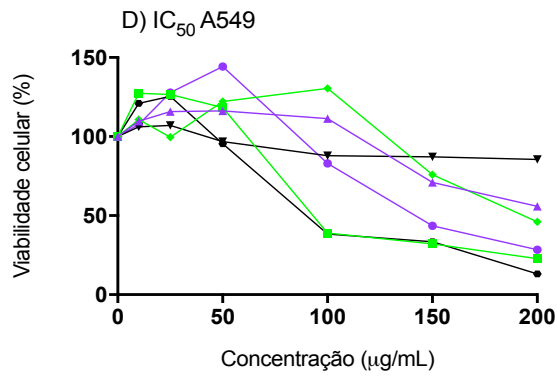
Linhagem Celular		Extratos (µg/mL)					
		GGM Oral Bruta	GGM Oral Digerida	GGM Gástrica Bruta	GGM Gástrica Digerida	GGM Intestinal Bruta	GGM Intestinal Digerida
SCC-9	IC ₅₀	29.92	53.79	21.34	45.35	23.15	123.2
	IG ₅₀	10.13	9.47	9.56	1.97	15.71	23.85
	LC ₅₀	39.26	59.02	27.43	58.91	24.72	148.1
A549	IC ₅₀	148.5	>200	108	192.2	100.6	>200
	IG ₅₀	117.8	118.5	95.36	155.6	71.06	126.4
	LC ₅₀	>200	>200	>200	>200	>200	>200
HCT-8	IC ₅₀	34.12	77.5	37.3	69.6	42.3	166.1
	IG ₅₀	25	34.1	26.5	24.2	27.1	36.8
	LC ₅₀	49.1	99.3	49.5	123.4	82.9	200

Fonte: Elabora pela autora (2023).

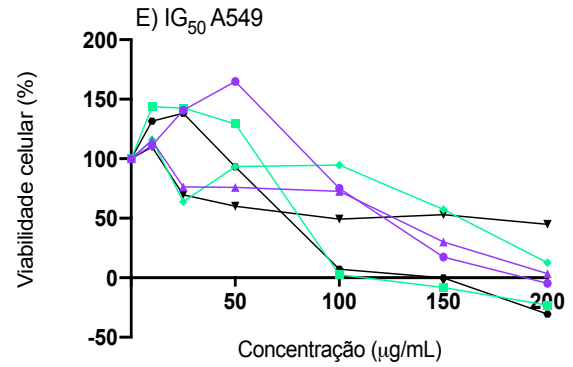
Legenda: SCC-9 (carcinoma de células escamosas de língua humana); A549 (adenocarcinoma de células epiteliais de pulmão humano); HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal colorretal de humano); GGM (extrato rico em galactoglucomanana); IC₅₀ (concentração dos extratos que inibe a viabilidade celular em 50%, é a concentração na qual $(T/C) \times 100 = 50$, onde T = número de células, no tempo t de tratamento, C = células de controle no tempo t de tratamento); IG₅₀ (concentração dos extratos que inibe o crescimento celular em 50% em relação às células não tratadas é a concentração na qual $([T - TO]/[C - TO]) \times 100 = 50$, onde T e C são o número de células tratadas e controle, respectivamente, no tempo t de tratamento e $T > TO$; TO é o número de células no tempo zero); e LC₅₀ (concentração dos extratos que resultam em perda líquida de 50% de células em relação ao número no início do tratamento, é o concentração na qual $([T - TO]/TO) \times 100 = -50$; $T < TO$). As concentrações são expressas em µg/mL de extratos brutos e digeridos liofilizados.

Figura 11 - Citotoxicidade dos extratos não digeridos e digeridos de GGM nas linhagens celulares SCC-9, A549 e HCT-8.

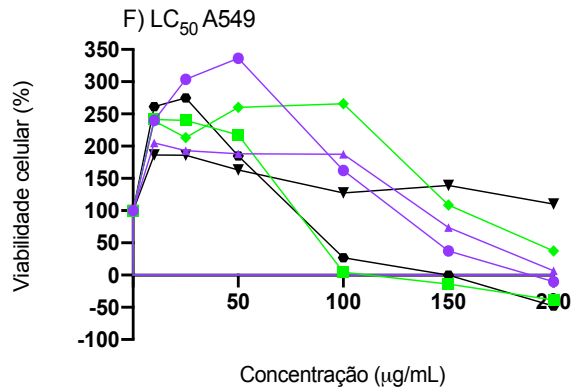




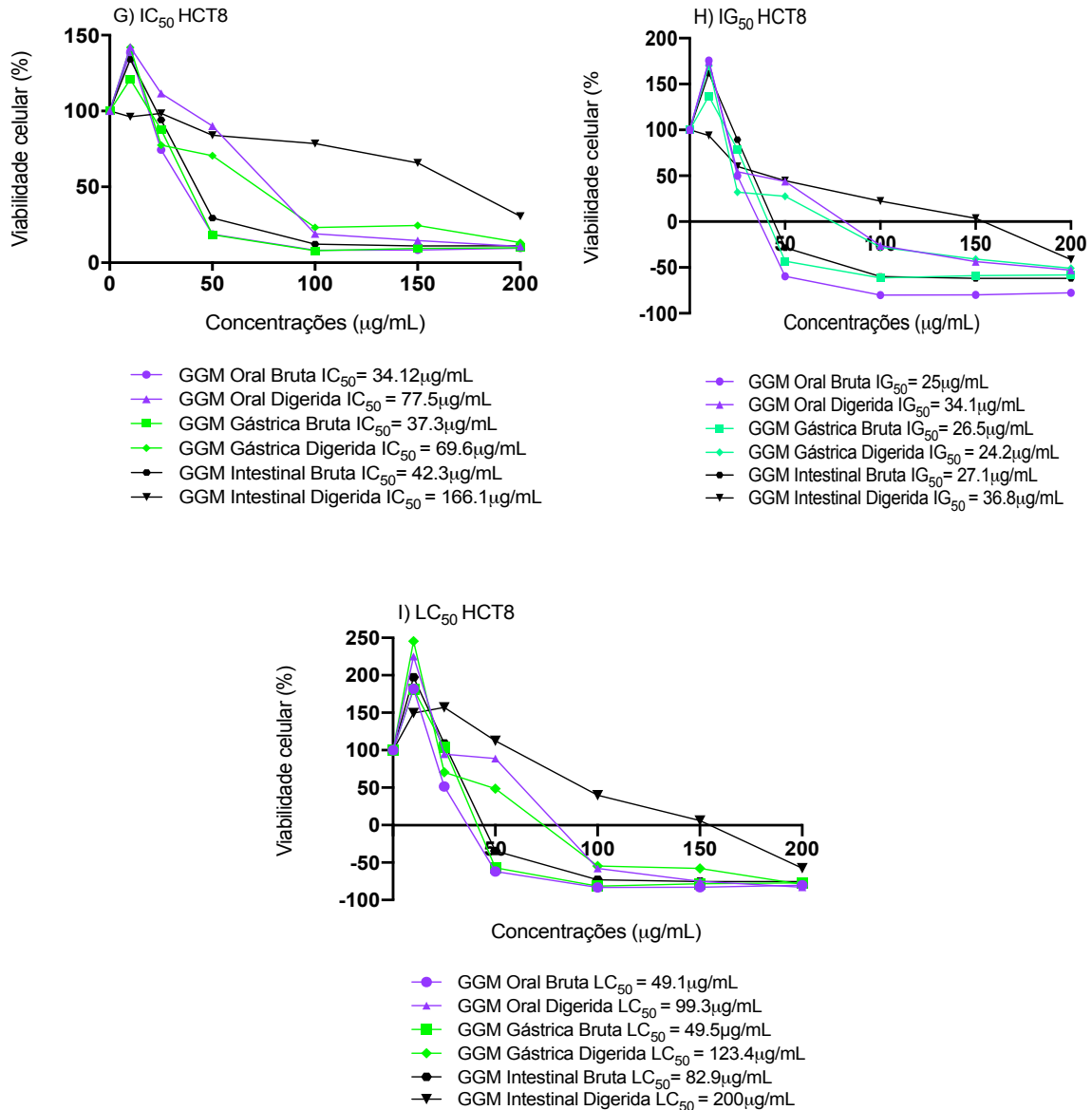
- GGM Oral Bruta IC₅₀ = 148.5µg/mL
- ▲ GGM Oral Digerida IC₅₀ > 200µg/mL
- GGM Gástrica Bruta IC₅₀ = 108µg/mL
- ◆ GGM Gástrica Digerida IC₅₀ = 192.2µg/mL
- GGM Intestinal Bruta IC₅₀ = 100.6µg/mL
- ▼ GGM Intestinal Digerida IC₅₀ > 200µg/mL



- GGM Oral Bruta IG₅₀ = 117.8µg/mL
- ▲ GGM Oral Digerida IG₅₀ = 118.5µg/mL
- GGM Gástrica Bruta IG₅₀ = 95.36µg/mL
- ◆ GGM Gástrica Digerida IG₅₀ = 155.6µg/mL
- GGM Intestinal Bruta IG₅₀ = 71.06µg/mL
- ▼ GGM Intestinal Digerida IG₅₀ = 126.4µg/mL



- GGM Oral Bruta LC₅₀ > 200µg/mL
- ▲ GGM Oral Digerida LC₅₀ > 200µg/mL
- GGM Gástrica Bruta LC₅₀ > 200µg/mL
- ◆ GGM Gástrica Digerida LC₅₀ > 200µg/mL
- GGM Intestinal Bruta LC₅₀ > 200µg/mL
- ▼ GGM Intestinal Digerida LC₅₀ > 200µg/mL



Fonte: Da autora (2023).

Legenda: A, B, C: SCC-9 (carcinoma de células escamosas de língua humana); D, E, F: A549 (adenocarcinoma de células epiteliais de pulmão humano); G, H, I: HCT8 (adenocarcinoma ileocecal colorretal humano); IC₅₀ (concentração dos extratos que inibe a viabilidade celular em 50%); GI₅₀ (concentração dos extratos que inibe o crescimento celular em 50%); e LC₅₀ (concentração dos extratos que resultam em perda de 50% de células). As concentrações são expressas em µg/mL de extratos liofilizados.

Ao observar a Figura 11 e a Tabela 5, fica evidente que o mecanismo de ação da GGM bruta e digerida não foi igual nas três linhagens celulares cancerosas testadas. O crescimento das células SCC-9 e HCT-8 foi inibido tanto pela GGM bruta quanto pela digerida ao exibirem valores de IC₅₀ e IG₅₀ dentro da faixa de concentração testada (IC₅₀ variou de 21,34 a 166,1µg AGE/mL e IG₅₀ variou de 1,97 a 36,8µg AGE/mL). Essas células também apresentaram valores letais (LC₅₀ variou

de 24,72 a 200 μ g AGE/mL). Analisando a GGM, porém considerando a massa da amostra, Granato *et al.* (2022) encontraram valores de IC₅₀, IG₅₀ e LC₅₀ (> 1000 μ g/mL) para a GGM bruta nas linhagens A549, HCT-8, HepG2 e IMR90.

No presente estudo, as células A549 foram as mais resistentes à ação dos extratos (IC₅₀ variou de 100,6 a > 200 μ gAGE/mL; IG₅₀ variou de 71,06 a 155,6 μ gAGE/mL) e não apresentaram valores letais (LC₅₀ > 200 μ gAGE/mL). Este achado indica que concentrações mais altas são necessárias para inibir a proliferação de metade dessas células cancerosas, apontando baixa inibição do crescimento e relativa segurança da GGM em baixas concentrações já que atividade citotóxica não foi identificada nas concentrações testadas. Resultado semelhante foi encontrado por Ferreira-Santos *et al.* (2020) na investigação de extratos aquosos de casca de *Pinus pinaster* onde a viabilidade celular da mesma linhagem celular não foi constatada até a máxima concentração de massa da amostra investigada (IC₅₀ > 1000 μ g/mL).

Já a linhagem SCC-9 foi a mais sensível aos extratos brutos e digeridos de GGM com baixos valores estimados de IC₅₀ (21,34 a 123,2 μ gAGE/mL) e IG₅₀ (1,97 a 23,85 μ gAGE/mL) e valores letais abaixo das demais linhagens (LC₅₀ variou de 24,72 a 148,1 μ gAGE/mL).

De fato, a presença de maior conteúdo fenólico é o possível motivo pelo qual o efeito antiproliferativo celular foi constatado. A GGM não digerida contém uma maior quantidade de compostos fenólicos totais que a GGM digerida, o que refletiu na ação citotóxica e no efeito antiproliferativo das células cancerosas, com a diminuição dos valores de IC₅₀, IG₅₀ e LC₅₀. Como os valores totais de catequinas e epicatequinas foram menores na fase intestinal, onde se encontram os maiores valores de IC₅₀, IG₅₀ e LC₅₀ da GGM digerida, a presença de outros compostos fenólicos presentes na GGM, mas não investigados neste estudo, provavelmente contribuíram para o efeito antiproliferativo encontrado nessas linhagens celulares cancerosas.

6.4.2 Geração de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs)

O ensaio de atividade antioxidante intracelular foi utilizado na detecção de produtos oxidativos da GGM nas três linhagens celulares cancerosas expostas aos tratamentos. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzida foi acessada por meio de fluorescência celular com a utilização da sonda diacetildiclorofluoresceína (DCFH-DA), um dos métodos mais utilizados para a

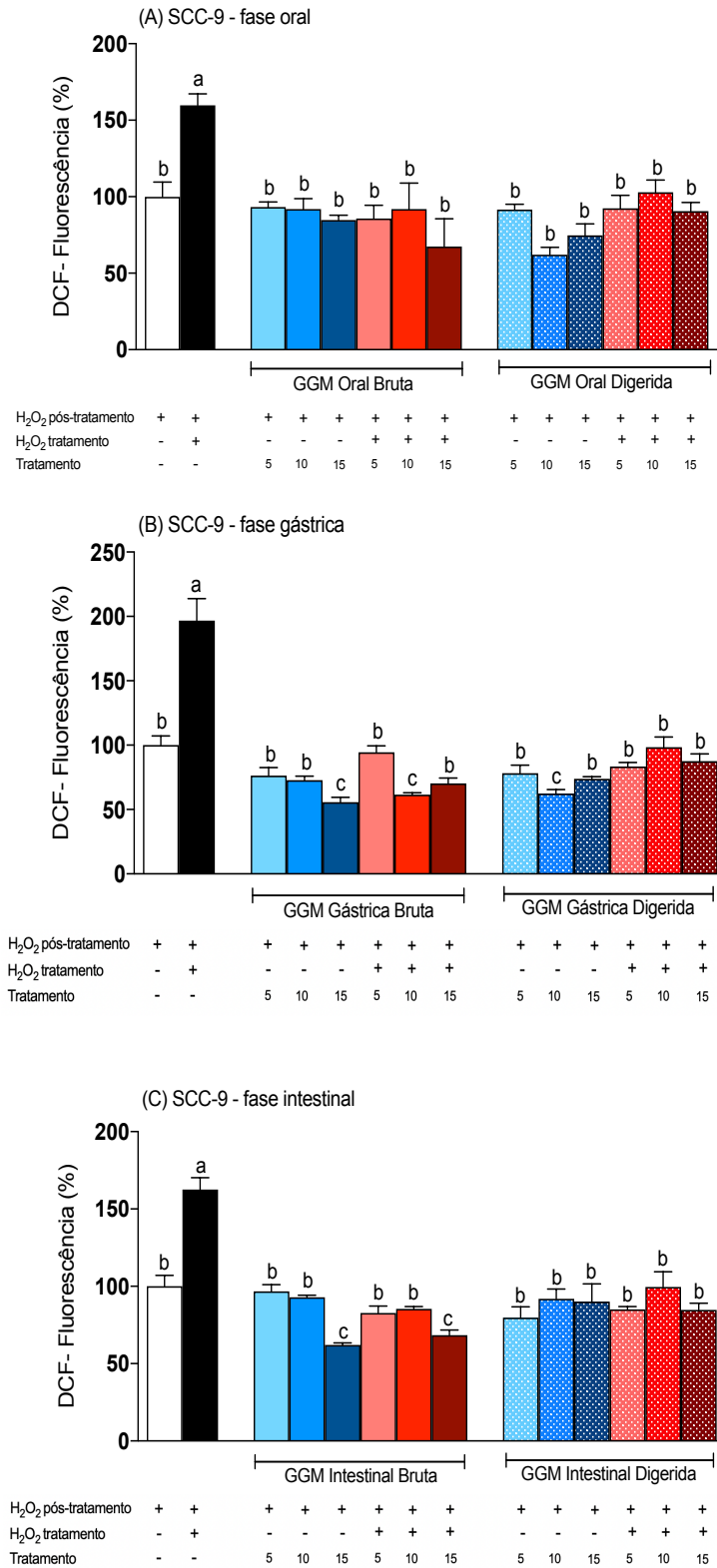
medição direta de produtos oxidativos intracelulares. O DCFH-DA é uma sonda fluorogênica permeável à célula e que penetra livremente na membrana celular sendo desacetilada pelas esterasas intracelulares gerando diclorodihidrofluoresceína (DCFH) que não é fluorescente. O DCFH é oxidado e se transforma em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que é altamente fluorescente quando na presença de radicais livres. Desta forma, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ser aferida pela quantidade de fluorescência emitida em situações basais e oxidantes (DO CARMO; GRANATO; AZEVEDO, 2021).

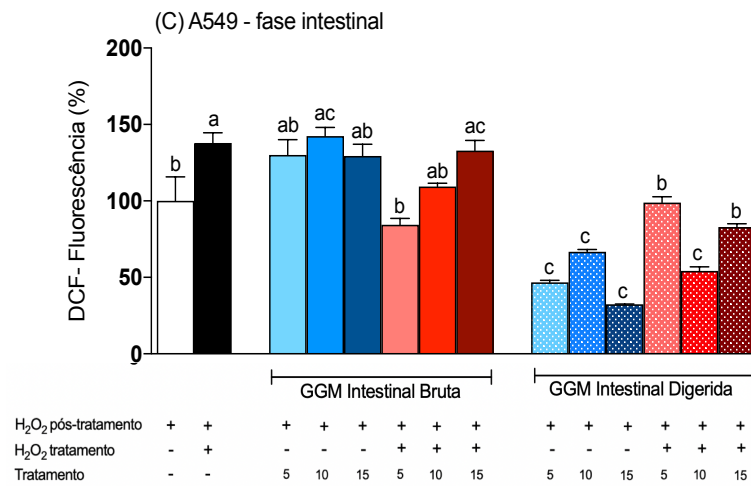
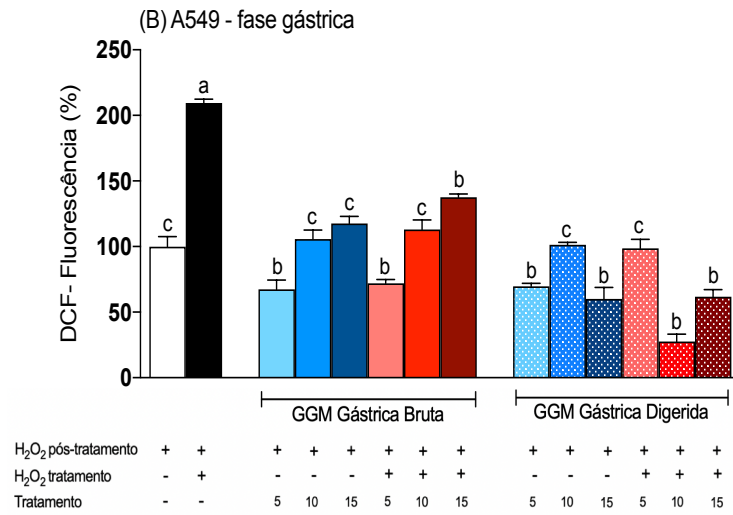
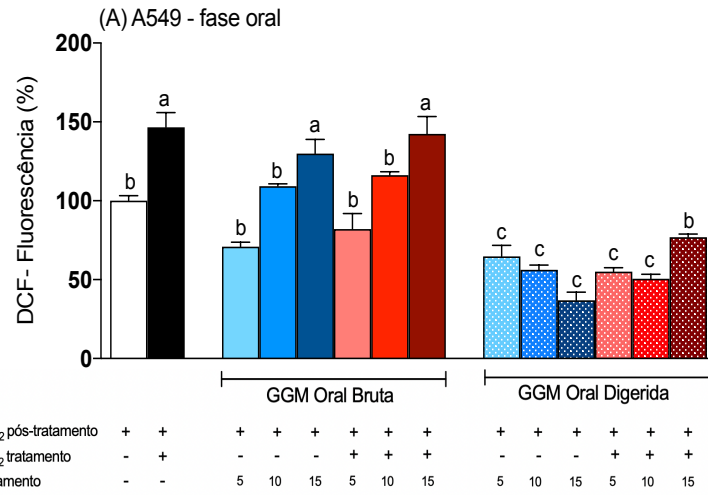
As ROS são moléculas pró-oxidantes quimicamente ativas, geradas pela redução incompleta do oxigênio e estão envolvidas em uma variedade de processos celulares fisiológicos e patológicos, incluindo danos ao DNA que contribuem para a carcinogênese (SREEVALSAN; SAFE, 2013). Células cancerosas costumam apresentar taxa aumentada de geração de EROS em comparação às células normais com o propósito de hiperativar vias que promovem proliferação celular, sobrevivência e adaptação metabólica (DO CARMO; GRANATO; AZEVEDO, 2021).

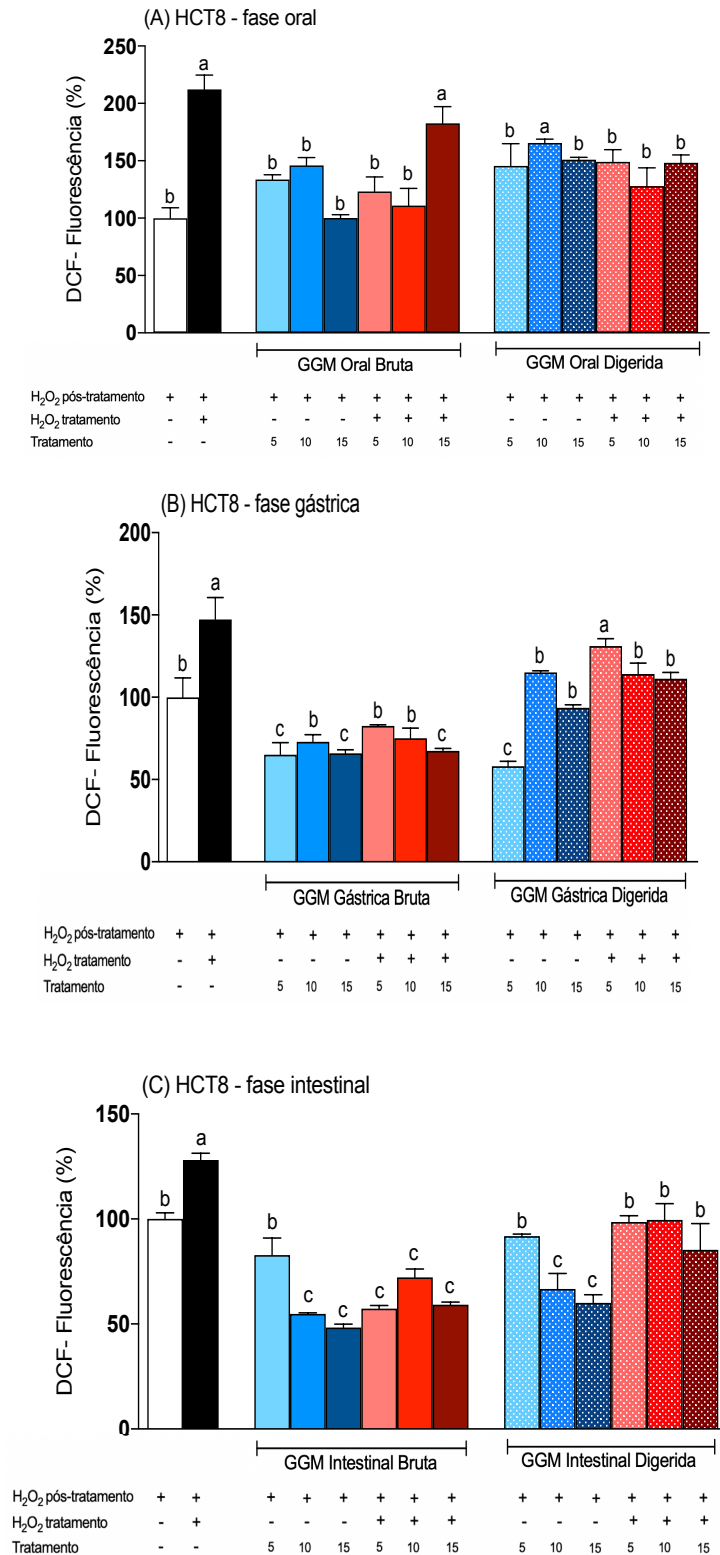
Neste estudo, observou-se que os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular induzidos pela adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (controle positivo) foram superiores ao grupo de geração espontânea (controle negativo) servindo como parâmetro positivo na avaliação da proteção contra as EROs (FIGURA 12).

A GGM apresentou, em geral, um efeito protetor antioxidante nas três linhagens cancerosas avaliadas não induzindo a formação de EROs e também protegendo quando na presença de H_2O_2 . Destacam-se as fases gástrica e intestinal para todas as linhagens onde a GGM, tanto não digerida quanto digerida, reduziu as espécies reativas de oxigênio a níveis mais baixos que os basais em várias concentrações. A digestão causou interferência apenas na fase intestinal para a linhagem A549 ao diminuir as EROs em comparação à GGM não digerida. Resultados similares foram encontrados por Granato *et al.* (2022) em uma linhagem de células não cancerosas (IMR90) em concentrações entre 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ onde o extrato de GGM foi capaz de restabelecer os níveis de ROS na mesma magnitude da geração espontânea. Em contraste aos resultados encontrados pelo presente trabalho, nas linhagens cancerosas A549 e HCT-8, foi encontrado pelos citados autores um efeito pró-oxidante da GGM, possivelmente justificado pela menor concentração de compostos fenólicos que podem atuar tanto como agentes pró-oxidantes como antioxidantes dependendo de diversos fatores, como sua concentração.

Figura 12 - Efeito dos extratos brutos e digeridos de GGM nas linhagens celulares SCC-9, A549 e HCT-8 frente às EROs.







Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: A: fase oral nas linhagens SCC-9, A549, HCT-8; B: fase gástrica nas linhagens SCC-9, A549, HCT-8; C: fase intestinal nas linhagens SCC-9, A549, HCT-8. H₂O₂: peróxido de hidrogênio. DCF: diclorofluoresceína. GGM: galactoglucomanana. Tratamentos testados nas concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes em relação aos controles negativo e H₂O₂ ($p < 0,05$).

Os resultados deste trabalho apontam a GGM como uma matriz complexa que desempenha um papel importante na proteção celular cancerosa quanto aos efeitos potencialmente nocivos da geração de espécies reativas de oxigênio. A digestão gastrointestinal não afetou o potencial da GGM nessa ação protetora. Assim, a quantidade de compostos fenólicos não explica esse efeito celular uma vez que o perfil químico antioxidante diminuído nos extratos de GGM não digerida, não corresponde à atividade antioxidante celular constatada. É possível entender que a excepcional diversidade química não rastreável na GGM possa ser considerada como “*dark matter of nutrition*” (BARABÁSI; MENICHETTI; LOSCALZO, 2020).

6.5 EXPERIMENTO *IN VIVO*

6.5.1 Parâmetros nutricionais e metabólicos dos animais

Para a obtenção dos parâmetros nutricionais e metabólicos dos animais, como apresentado na Tabela 6, foram avaliados: o ganho de massa corporal, a ingestão alimentar e calórica e o consumo de água durante todo o experimento. Não houve mortes relacionadas aos cuidados dispensados aos ratos em nenhum grupo experimental antes da finalização deste estudo, ou seja, no total de 6 semanas.

A média de peso dos animais no início do experimento foi de $93,36 \pm 16,92$ g e eles atingiram um peso entre 244,34 e 294,94 g ao final do experimento, apontando um ganho de peso médio diário de $4,90 \pm 0,42$ g/rato. Observou-se que o uso do EDTA e do DMH não afetou o ganho de peso dos animais, os ratos apresentaram ganho de massa corpórea durante todo o experimento, justificado exclusivamente pela ingestão alimentar já que a GGM quando administrada sem associação ao DMH, também promoveu ganho de massa corpórea garantindo a segurança calórica desta matriz alimentar. Resultados semelhantes foram encontrados por Konkol *et al.* (2017) que administraram a GGM por via oral em um modelo animal experimental induzido à inflamação prostática crônica, onde também não foi detectada alteração no peso corporal dos ratos.

Considerando que os níveis de consumo calórico foram a soma das calorias fornecidas pela ração e pela GGM e que não houve diferenças entre o grupo controle e os de tratamento, a quantidade de calorias presentes na GGM não afetou esse indicador. Os parâmetros nutricionais apontam que a GGM e o DMH não interferiram

na fome, na ingestão alimentar e na ingestão calórica dos ratos. A ingestão de água também foi semelhante em todos os grupos, revelando que mesmo a GGM sendo uma fibra, ela não estimulou um consumo maior de água pelos animais.

Tabela 6 - Efeito das dietas no ganho de massa, na ingestão alimentar e no consumo de água.

Grupo/ Tratamento	Massa inicial (g/rato)	Massa final (g/rato)	Ganho de massa (g/rato)	Consumo alimentar		Consumo de Água (mL/rato)
				(g/dia)	(Kcal/dia)	
EDTA	93 ± 18.70 ^{n.s.}	285.83 ± 27.64 ^{ab}	192.8 ± 24.59 ^{ab}	19.85 ± 1.16 ^{n.s.}	95.90 ± 11.2 ^{n.s.}	456.83 ± 29.7 ^{n.s.}
EDTA + 400 GGM	94.5 ± 15.22 ^{n.s.}	289.83 ± 17.03 ^{ab}	195.3 ± 8.62 ^{ab}	20.83 ± 0.05 ^{n.s.}	100.85 ± 0.48 ^{n.s.}	511.67 ± 21.21 ^{n.s.}
DMH	94.33 ± 15.73 ^{n.s.}	267.67 ± 9.22 ^{bd}	173.3 ± 24.59 ^{bd}	18.68 ± 0.66 ^{n.s.}	90.22 ± 6.45 ^{n.s.}	498.67 ± 13.43 ^{n.s.}
DMH + 50 GGM	90.17 ± 19.28 ^{n.s.}	246.67 ± 17.96 ^{cd}	156.5 ± 9.65 ^{cd}	17.85 ± 0.57 ^{n.s.}	86.24 ± 5.52 ^{n.s.}	425.75 ± 23.45 ^{n.s.}
DMH + 200 GGM	93.67 ± 17.93 ^{n.s.}	267.83 ± 19.23 ^{bd}	174.16 ± 12.79 ^{bd}	19.69 ± 0.21 ^{n.s.}	95.23 ± 2.05 ^{n.s.}	465.17 ± 51.15 ^{n.s.}
DMH + 400 GGM	94.5 ± 21.55 ^{n.s.}	260.0 ± 33.04 ^{bd}	165.5 ± 14.16 ^{bd}	19.46 ± 1.25 ^{n.s.}	94.24 ± 12.14 ^{n.s.}	424 ± 58.45 ^{n.s.}

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: GGM: extrato rico em galactoglucomanana; DMH: 1,2-dimetil-hidrazina; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético. Todos os valores são média ± desvio padrão. Valores com letras diferentes em uma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). n.s.: não significativo.

Os resultados da taxa de eficiência proteica (PER) foram semelhantes em todos os grupos conforme pode ser observado na Tabela 7, com os valores encontrados na faixa entre 1,5 - 4,0 como proposto por Chapman; Castillo; Campbell (1959). Isto indica que a GGM e o DMH não interferiram na eficiência proteica. Os demais parâmetros nutricionais e metabólicos (BMG, SGR, MGR, FER) de todos os grupos também foram semelhantes aos do grupo controle, confirmando a eficiência proteica da ração comercial e da GGM.

Juntos, esses resultados demonstram que as três dosagens de GGM fornecidas por gavagem e a indução de câncer com o DMH não causaram alterações nutricionais prejudiciais ao bem estar dos animais experimentais. As variáveis nutricionais e o desempenho zootécnico são úteis como indicadores sensíveis da saúde e bem-estar geral do animal, além de revelar o comportamento nutricional dos ratos nas condições experimentais empregadas neste estudo (DO CARMO *et al.*, 2021) e apresentar a segurança de ingestão da GGM em modelos animais *in vivo*.

Tabela 7 - Parâmetros metabólicos dos animais após o experimento.

Grupo/ Tratamento	BMG (%)	SGR (% por dia)	MGR (g kg ^{0.8} dia ⁻¹)	FER	PER
EDTA	214.92 ± 49.48 ^{n.s.}	2.91 ± 0.39 ^{n.s.}	0.20 ± 0.07 ^{n.s.}	0.08 ± 0.01 ^{n.s.}	2.22 ± 0.29 ^{n.s.}
EDTA + 400 GGM	211.56 ± 38.31 ^{n.s.}	2.89 ± 0.28 ^{n.s.}	0.19 ± 0.05 ^{n.s.}	0.08 ± 0.00 ^{n.s.}	2.17 ± 0.10 ^{n.s.}
DMH	191.64 ± 57.21 ^{n.s.}	2.70 ± 0.47 ^{n.s.}	0.17 ± 0.07 ^{n.s.}	0.08 ± 0.01 ^{n.s.}	2.22 ± 0.31 ^{n.s.}
DMH + 50 GGM	182.93 ± 55.15 ^{n.s.}	2.63 ± 0.42 ^{n.s.}	0.18 ± 0.10 ^{n.s.}	0.08 ± 0.00 ^{n.s.}	2.10 ± 0.13 ^{n.s.}
DMH + 200 GGM	192.88 ± 46.99 ^{n.s.}	2.73 ± 0.36 ^{n.s.}	0.18 ± 0.07 ^{n.s.}	0.07 ± 0.01 ^{n.s.}	2.02 ± 0.15 ^{n.s.}
DMH + 400 GGM	184.26 ± 51.24 ^{n.s.}	2.65 ± 0.37 ^{n.s.}	0.18 ± 0.10 ^{n.s.}	0.07 ± 0.01 ^{n.s.}	1.93 ± 0.17 ^{n.s.}

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: BMG, ganho de massa corporal; SGR, taxa de crescimento específica; MGR, taxa de crescimento metabólico; FER, taxa de eficiência alimentar; PER, taxa de eficiência proteica; GGM: extrato rico em galactoglucomanana; DMH: 1,2-dimetil-hidrazina; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético, veículo para DMH. Todos os valores são média ± desvio padrão. n.s. não é significativo.

6.5.2 Focos de criptas aberrantes (FCA) e focos depletados de mucina (FDM) nos cólons

Focos de criptas aberrantes (FCA) foram primeiramente descritos por Bird, em 1987, em cólons de camundongos tratados com carcinógenos. Essas alterações histológicas surgem durante o desenvolvimento inicial de uma neoplasia colorretal devido a alterações na divisão e proliferação celular epitelial do cólon (CLAPPER; CHANG; COOPER, 2020) podendo ser determinadas por suas características morfológicas, biológicas e genéticas. Esta transformação do epitélio colônico normal em focos criptográficos aberrantes é utilizada como um biomarcador apropriado para avaliar fatores predisponentes e preditivos nos estágios iniciais da carcinogênese do cólon em modelos animais experimentais (BIRD, 1995).

As criptas são um grupo heterogêneo de lesões que apresentam características morfológicas visíveis, aumentadas, com revestimento epitelial espessado, elevação da mucosa e são densamente coradas (BIRD, 1987). Apresentam aberturas luminiais irregulares, são maiores em tamanho do que as criptas normais e a multiplicidade de criptas (número de criptas por foco) é um achado fortemente comum.

No presente estudo, os grupos que receberam apenas o veículo EDTA (controle negativo) e EDTA+400GGM (controle GGM) não apresentaram alterações

compatíveis com a carcinogênese no cólon, ou seja, não contaram com a presença de FCA (FIGURA 13A). Esse resultado promove um importante parâmetro de segurança para a administração da GGM na maior dosagem (400mg/Kg), sugerindo a ausência de fator pró-carcinogênico associado ao desenvolvimento de focos de criptas aberrantes clássicas até essa dosagem. Já os grupos que receberam o carcinógeno (DMH) apresentaram FCA (FIGURA 13B) indicando que a indução de carcinogênese no cólon foi seguramente instalada, como já esperado e constatado pela literatura (AMADEU *et al.*, 2023; DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2023). O DMH administrado por via subcutânea é liberado lentamente na circulação e, em seguida, atinge o fígado onde ocorre predominantemente a sua hidroxilação e se forma o agente alquilante íon metil diazônio, que gera um íon carbono reativo capaz de alquilar macromoléculas (DNA, RNA ou proteína) por processo enzimático e não enzimático no cólon. A alquilação dos átomos de oxigênio presentes nas bases nitrogenadas torna possível o emparelhamento incorreto do DNA, o que tem sido sugerido como crítico na mutagênese e na carcinogênese colorretal (VENKATACHALAM *et al.*, 2020).

A GGM, associada ao DMH, agiu com efeito protetor contra a indução de câncer colorretal, com redução de hiperplasia em todo o cólon e especialmente no cólon distal, na máxima dosagem administrada (400 mg/kg) (FIGURA 13C). Observa-se que nesta concentração, o número total de FCA em comparação ao grupo controle positivo DMH foi para 34,9%, reforçando a capacidade carcinógena do DMH ao estimular a formação clássica de criptas aberrantes e da GGM em diminuir esse efeito pré-neoplásico.

Ainda que os FCA possam surgir tanto no cólon proximal quanto no distal, eles são observados principalmente no cólon distal de animais e humanos coincidindo com a distribuição geográfica do CCR (ALRAWI *et al.*, 2006; DREW *et al.*, 2014; QUINTANILLA *et al.*, 2019) como foi confirmado pelo presente estudo. O posicionamento regional das lesões sob condições patológicas é de extrema importância ao se considerar uma abordagem terapêutica quimiopreventiva (MOULAHOUA *et al.*, 2018).

Segundo Prado-Silva *et al.* (2014) e Renehan *et al.* (2001), os FCAs crescem por um fenômeno chamado fissão de cripta, e assim, a multiplicidade de criptas (número de criptas por foco) é mais preditiva de transformação maligna que o número de focos. Desta forma, existe a hipótese de que muitos FCAs regredem e somente

focos maiores de criptas aberrantes progridem para o câncer (DO CARMO *et al.*, 2021). Foi encontrado um maior número de criptas $\leq 2/\text{foco}$, em comparação ao número de criptas $\geq 3/\text{foco}$, em todos os grupos avaliados nesse estudo, o que possivelmente pode ser explicado pelo curto tempo de duração do experimento após a carcinogênese induzida com DMH (RODRIGUES *et al.*, 2002) (FIGURA 13D). Porém, a multiplicidade de criptas já apresentou redução a partir da dose mínima de GGM administrada (50 mg/kg), sugerindo que a GGM pode ser responsável por atenuar o início e a progressão de lesões neoplásicas no cólon.

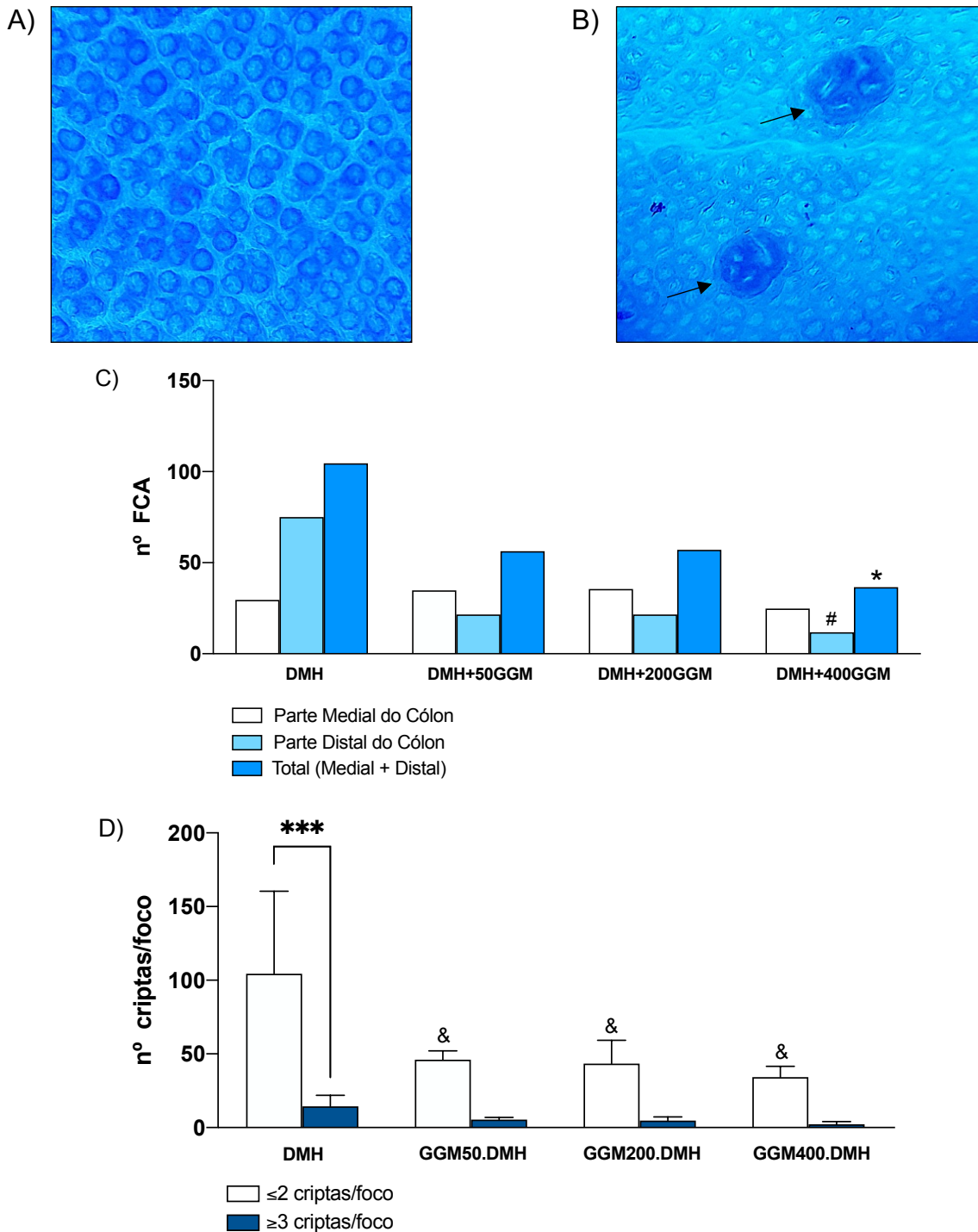
Esses achados podem ser explicados pela ação de compostos fenólicos e de carboidratos da GGM revelando suas atividades biológicas em maiores concentrações. Resultados semelhantes foram encontrados por um cereal nativo de Taiwan, *Chenopodium formosanum* (djulis), rico em fibra alimentar insolúvel, principalmente celulose, e fenólicos totais assim como a GGM e que reduziu o número total de FCA em ratos. Altas doses de djulis apresentaram fortes efeitos inibitórios e também produziu uma redução significativa no número de pequenas criptas aberrantes (LEE *et al.*, 2019).

Os focos depletados de mucina (FDM) são caracterizados pela produção inexistente ou escassa de mucinas secretadas pelas células caliciformes de cólons que revelam características similares àquelas observadas em tumores colônicos, sendo uma característica comum da displasia grave (PERSE; CERAR, 2011; SØDRING; GUNNES; PAULSEN, 2016). Pode-se observar que GGM conseguiu diminuir a quantidade de FCA em sua dosagem máxima e mesmo assim, não instalou uma diferença entre os grupos investigados neste experimento quanto aos FDM, ou seja, a GGM não interferiu na escassa produção de mucinas nas células epiteliais de todos os grupos tratados. Curiosamente, a análise microestrutural do cólon revelou menor distribuição de mucinas nos grupos que receberam DMH em comparação aos animais saudáveis.

É possível considerar a GGM como uma matriz potencialmente eficaz na prevenção da carcinogênese no cólon no estágio inicial do desenvolvimento de FCA. Principalmente pelos teores de compostos fenólicos que demonstram potencial efeito antiproliferativo em células cancerosas humanas pela ação inibitória e letal do crescimento celular *in vitro*, além de ação apoptótica (KIM; MOLLAH; KIM, 2012) e também na regulação das principais vias envolvidas na origem dessa neoplasia (WANG *et al.*, 2020).

Existem poucos estudos presentes na literatura que investiguem o potencial de compostos fenólicos provenientes de cascas de árvore sobre o início e progressão do câncer de cólon em modelo animal. Assim, este é o primeiro estudo a descrever os efeitos de um extrato rico em galactoglucomana proveniente de serragem de abeto da Noruega na carcinogênese colorretal.

Figura 13 - Efeito dos extratos de GGM nos FCA nos cólons.



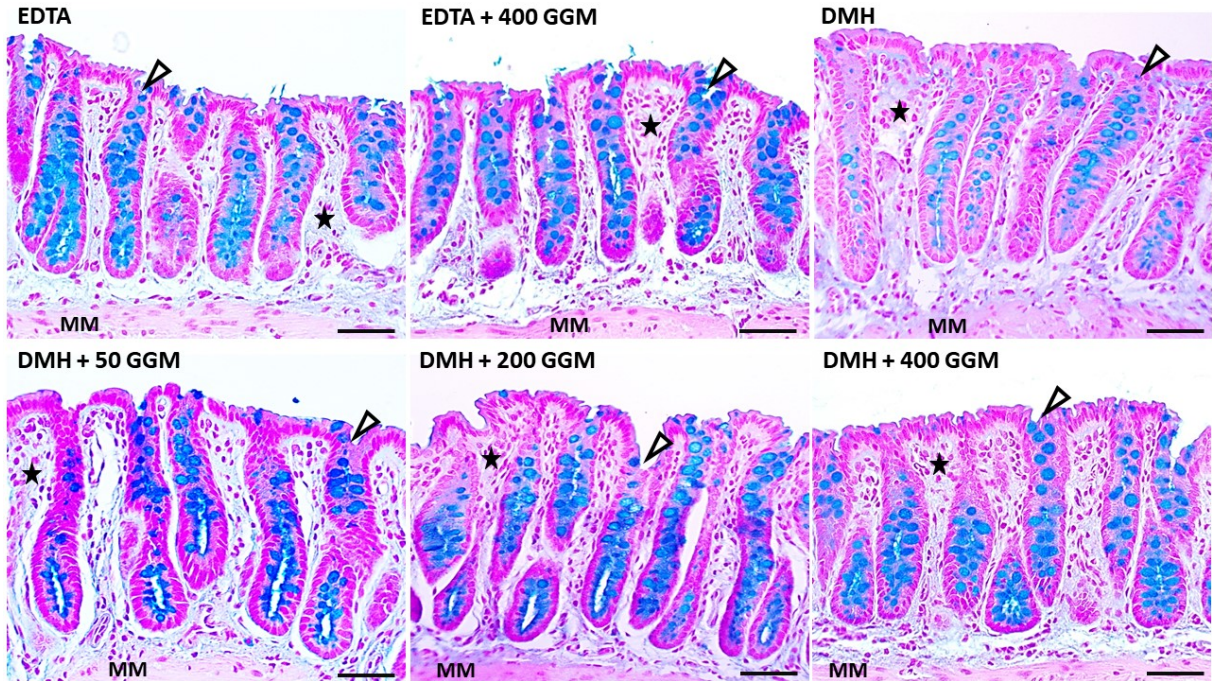
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: (A) vista topográfica microscópica de uma área com criptas colônias inalteradas; (B) Dois FCA-azul de metileno corados clássicos, com quatro criptas aberrantes cada um (seta); (C) número de FCA presentes no segmento medial, distal e o total de FCA do cólon inteiro; (D) número de criptas presentes por foco. DMH = 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40mg/kg p.c.), GGM = extrato de galactoglucomanana; 50, 200 e 400 indicam a quantidade de gavagem (mg/kg p.c.). Diferentes sinais sobrescritos em cada coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo # relacionado ao DMH distal, * relacionado ao DMH total, *** relacionado ao DMH ≥ 3 criptas e & relacionado DMH ≤ 2 criptas.

6.5.3 Histomorfometria do cólon

Conforme mostrado na Figura 14, a partir de uma análise morfológica geral do ceco, a análise histopatológica dos cortes longitudinais revelou criptas intestinais bem definidas circundadas por lâmina própria com celularidade moderada na mucosa intestinal de todos os grupos. Observou-se leve espessamento da mucosa intestinal em todos os grupos expostos ao DMH. Espessamento epitelial caracterizado principalmente por enterócitos com perfil nuclear alongado foi observado no grupo que recebeu apenas DMH (controle DMH) e no grupo que recebeu o DMH e a menor dosagem de GGM (DMH+50GGM). Depleção de mucina também foi observada nestes dois grupos. Além disso, foi identificado nesses dois grupos e no grupo DMH+200GGM um aumento da profundidade das criptas sugerindo que a maior dose de GGM testada (400mg/kg) confere alguma proteção contra a remodelação patológica desta parte do cólon e induzida por DMH. Entretanto, evidências morfológicas de infiltrado inflamatório não foram detectadas em todos os grupos investigados. Esta ausência contrasta com efeito pró-inflamatório geralmente promovido pelo DMH que age no remodelamento patológico do cólon (REHMAN *et al.*, 2018).

Figura 14 - Imagens microscópicas do cólon de animais tratados com dimetilhidrazina (DMH) e diferentes concentrações de galactoglucomanana (GGM).

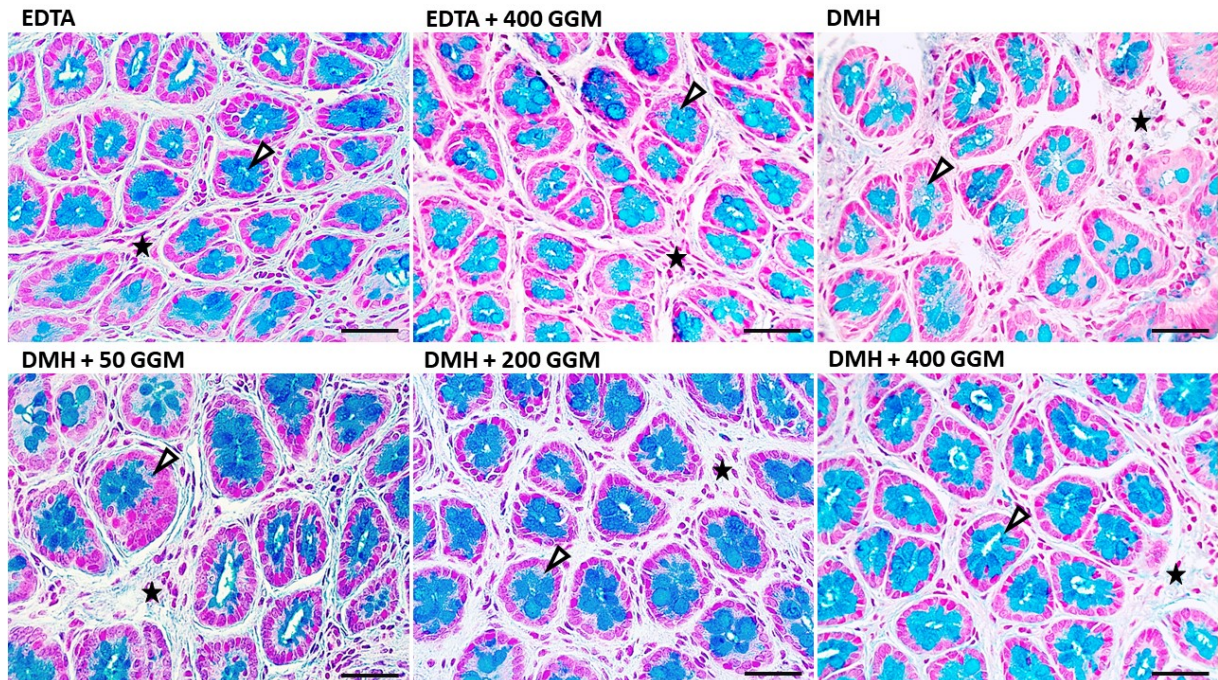


Fonte: Da autora (2023).

Legenda: Cortes longitudinais, microscopia de campo claro, coloração *Alcian Blue* e *Fast Red*, barra de escala = 40 μ m. Pontas de seta: criptas intestinais. Estrela: lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo). MM = Muscular da mucosa. Os núcleos das células estão corados em vermelho e as mucinas em azul. Grupos de animais tratados com: EDTA = EDTA; EDTA + 400 GGM = EDTA e 400 mg/kg GGM; DMH = DMH; DMH + 50 GGM = DMH e 50 mg/kg GGM; DMH + 200 GGM = DMH e 200 mg/kg GGM; DMH + 400 GGM = DMH e 400 mg/kg GGM.

A observação microscópica de cortes transversais (FIGURA 15) revelou um elevado número de criptas com lúmen estreito e pequenos perfis intercalados por uma área estreita de tecido conjuntivo nos grupos EDTA e EDTA+400GGM. O perfil transversal das criptas intestinais mostrou hipertrofia variável em todos os grupos expostos ao DMH. Além da hipertrofia, foi observada menor distribuição de criptas com lúmen dilatado e expansão do tecido conjuntivo nos grupos DMH e DMH+50GGM.

Figura 15 - Imagens microscópicas indicando a distribuição de mucinas e criptas intestinais de animais tratados com dimetilhidrazina (DMH) e diferentes concentrações de galactoglucomanana – GGM.



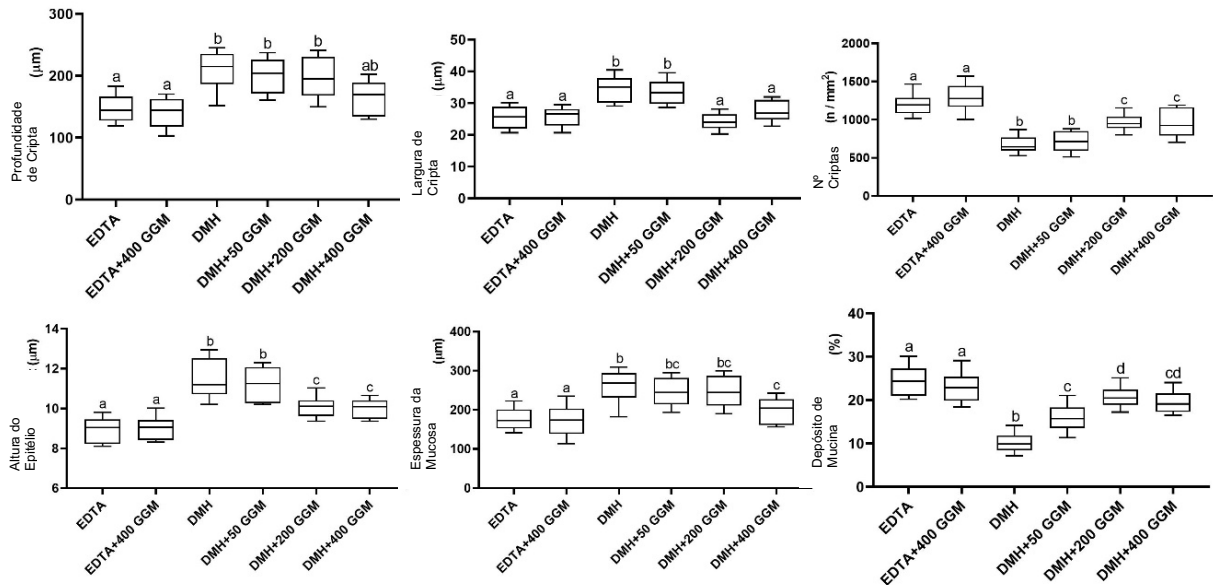
Fonte: Da autora (2023).

Legenda: Secções transversais, microscopia de campo claro, coloração *Alcian Blue* e *Fast Red*, barra de escala = 40 μ m. Pontas de seta: criptas intestinais. Estrela: lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo). Os núcleos das células estão corados em vermelho e as mucinas em azul. Grupos de animais tratados com: EDTA = EDTA; EDTA + 400 GGM = EDTA e 400 mg/kg GGM; DMH = DMH; DMH + 50 GGM = DMH e 50 mg/kg GGM; DMH + 200 GGM = DMH e 200 mg/kg GGM; DMH + 400 GGM = DMH e 400 mg/kg GGM.

Conforme mostrado na Figura 16, a análise microestrutural quantitativa reforçou os achados histopatológicos, indicando um aumento acentuado na altura do epitélio de revestimento, profundidade e largura das criptas nos grupos DMH e DMH+50GGM em comparação aos grupos controle (não expostos ao DMH). O número de criptas e a distribuição de mucina foram reduzidos em todos os grupos expostos ao DMH em comparação com os animais não tratados com DMH. A espessura da mucosa e a profundidade das criptas foram maiores em todos os grupos expostos ao DMH, exceto DMH+400GGM, em comparação aos animais não tratados com DMH. A depleção de mucina foi atenuada, o número de criptas foi maior e a altura do epitélio foi reduzida nos grupos DMH+200GGM e DMH+400GGM em comparação ao grupo DMH revelando o efeito benéfico da GGM, em maiores dosagens, em atenuar os mecanismos pré-neoplásicos compatíveis com os estágios iniciais da

carcinogênese colorretal compatível com o que foi encontrado na análise topográfica geral do cólon.

Figura 16 - Microestrutura do cólon dos animais tratados com EDTA, DMH, GGM e diferentes concentrações GGM associada ao DMH.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Os resultados são expressos como mediana e intervalo interquartil. Grupos de animais tratados com: EDTA = EDTA; EDTA + 400 GGM = EDTA e 400 mg/kg GGM; DMH = DMH; DMH + 50 GGM = DMH e 50 mg/kg GGM; DMH + 200 GGM = DMH e 200 mg/kg GGM; DMH + 400 GGM = DMH e 400 mg/kg GGM. a,b,c,d Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos (valor de $p < 0,05$).

6.5.4 Efeitos da GGM no microbioma fecal

A microbiota intestinal é uma comunidade complexa e dinâmica de microrganismos que habitam o trato digestivo e que vivem em simbiose com o hospedeiro. Dentre as suas muitas funções estão a produção de enzimas, vitaminas e hormônios que auxiliam na proteção imune e adaptativa. Quando ocorre um desequilíbrio entre a microbiota intestinal benéfica e a oportunista, instala-se a disbiose que está associada a vários distúrbios gastrointestinais, com destaque para os processos inflamatórios intestinais e para o mais agressivo deles, o câncer colorretal (CCR) (QUAGLIO *et al.*, 2022; SANKAR *et al.*, 2015). O papel da disbiose ainda não está totalmente esclarecido na carcinogênese colorretal, mas é fato que a microbiota intestinal se comporta como um reservatório de biomarcadores seguros para o diagnóstico precoce do CCR e a sua interação com a mucosa colônica pode

também contribuir para o entendimento da tumorigênese no cólon (OLOVO *et al.*, 2021).

Investigar a potencialidade das relações bacterianas na microbiota em doenças intestinais malignas é de vital importância. E para compreender melhor este processo, foi investigada a ação da GGM e do DMH na microbiota dos animais conforme pode ser observado na Figura 17. O grupo DMH e o grupo GGM (EDTA+400GGM) diminuíram a abundância de bactérias totais em comparação aos animais saudáveis (grupo EDTA). Curiosamente, DMH e GGM associados na maior dosagem de GGM (400 mg/kg) apresentou comportamento diferente aumentando a abundância bacteriana e igualando-se aos animais saudáveis. A ativação do pró-carcinógeno DMH ocorre, principalmente no fígado, onde DMH é convertido em metilazoximetanol que por sua vez é conjugado ao ácido glucurônico e secretado pelo ducto biliar, chegando ao intestino. Mas é no intestino que grupos específicos de bactérias que apresentam atividade β -glucuronidase, como por exemplo as do gênero *Bacteroides*, que são gram-negativas, e outras podem hidrolisar o complexo previamente formado no fígado com a consequente liberação de azoximetano, um composto ativo carcinogênico capaz de ativar a carcinogênese do cólon e explicar a interação do microbioma intestinal (DUARTE *et al.*, 2020). Estas variações podem ser justificadas por alterações dinâmicas pelas quais passam o microbioma intestinal em uma junção de fatores genéticos, epigenéticos e locais (RACKERBY *et al.*, 2020). A GGM inclusive foi utilizada como fonte de carboidrato para bactérias probióticas (POLARI *et al.*, 2012).

A composição de bactérias anaeróbicas em um ambiente intestinal saudável se faz pela presença de dois filos principais que representam a imensa maioria da população de bactérias totais do microbioma intestinal: os *Firmicutes* e os *Bacteroidetes* (STOJANOV; BERLEC; ŠTRUKELJ, 2020). A relação entre esses dois filos de bactérias (F/B) é indicativa de equilíbrio em uma microbiota intestinal normal (TABELA 8) (SANKAR *et al.*, 2015). Aqui, constatou-se que o pró-carcinógeno diminuiu a abundância dos dois filos em comparação aos animais saudáveis. Quanto à GGM, pode-se afirmar que quando na dosagem de 400mg/kg, modulou a microbiota intestinal mantendo *Bacteroidetes* e diminuindo a abundância de *Firmicutes* desregulando a relação entre eles e promovendo disbiose. A análise da relação F/B confirma este dado, já que a GGM a diminuiu ao ponto de levá-la a parâmetros negativos ($-55,93 \pm 19,22$). A manutenção da abundância de *Bacteroidetes* pela GGM

pode ser compreendida pelo fato de os genomas dessas bactérias codificarem um grande número de enzimas ativas indutíveis em carboidratos que permitem o uso de glicanos dietéticos e da mucosa do hospedeiro (EL KAOUTARI *et al.*, 2013). Igualmente, os níveis de *Bacteroidetes* aumentaram com a ingestão de fibra da dieta em humanos (SIMÕES *et al.*, 2013).

A diminuição da relação F/B caracteriza doença inflamatória intestinal e se apresenta geralmente com a diminuição de *Firmicutes* e a abundância de *Bacteroidetes* como apontado por trabalhos anteriores (GOPHNA *et al.*, 2006; WALKER *et al.*, 2011). Porém, os achados histopatológicos desse estudo confirmam que não há a presença de infiltrado inflamatório em nenhum dos grupos investigados.

Por outro lado, a GGM parece potencialmente benéfica para a microbiota intestinal somente na sua menor dosagem (50 mg/kg) (F/B = 79,46 ± 27,71), pois mantém uma relação mais equilibrada entre a abundância de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Estudo recente aponta que a galactoglucomanana pode ser capaz de modificar a composição da microbiota intestinal positivamente e aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes, exercendo efeitos desejáveis tanto na doença inflamatória intestinal quanto no câncer colorretal (CABAN; LEWANDOWSKA, 2023).

Tabela 8 - Relação de *Firmicutes/Bacteroidetes* comparado ao grupo controle EDTA.

Grupos	DMH %	GGM %	DMH + 50 GGM %	DMH + 200 GGM %	DMH + 400 GMM %
Relação F/B	70,45 ± 14,74	-55,93 ± 19,22	79,46 ± 27,71	99,90 ± 2,31	318,61 ± 109,97

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: Dados apresentados como a média ± DP das ampliações obtidas no qPCR utilizando o grupo controle (EDTA) como modelo com microbiota eubiótica para comparação.

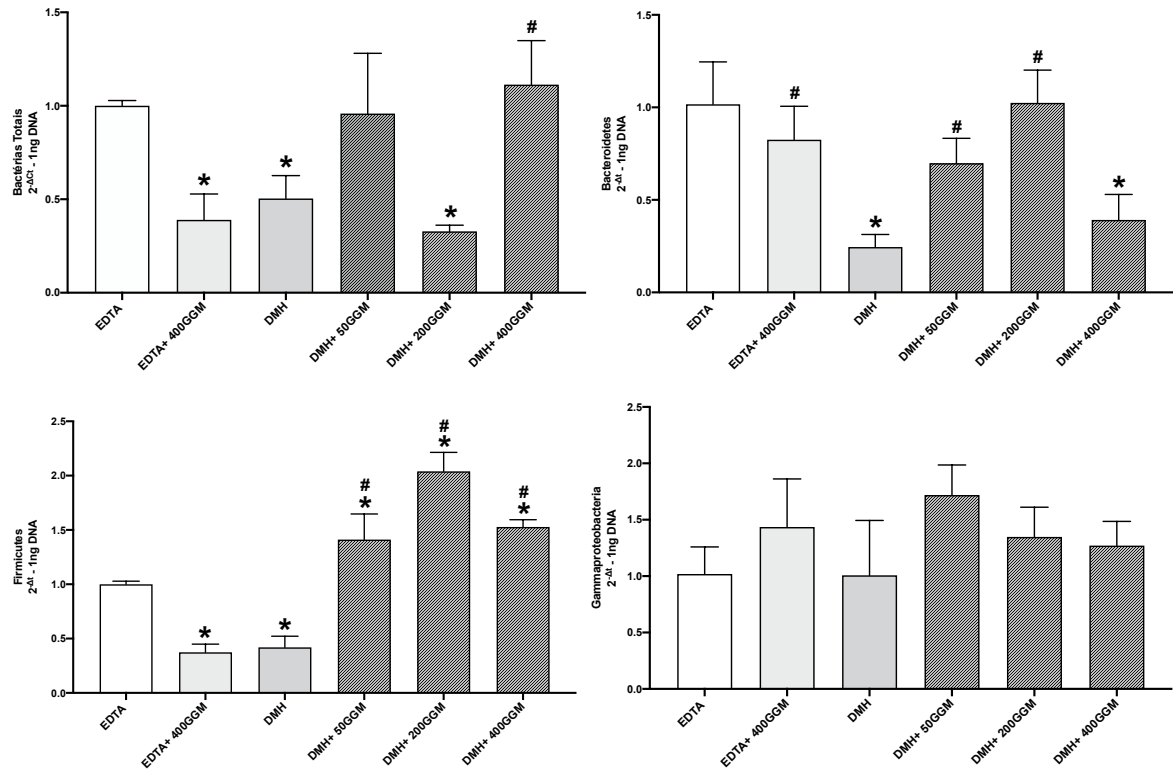
Além disso, nenhum dos tratamentos utilizados neste estudo modulou as *Gammaproteobacterias*, bactérias do filo *Proteobacterias* e consideradas potencialmente patogênicas, cujo aumento seria esperado ao menos no grupo DMH por ser o grupo com maior potencial inflamatório (DO CARMO *et al.*, 2021). A *E. coli*, por exemplo, é uma bactéria patogênica pertencente à classe *Gammaproteobacteria*

que apresenta uma capacidade muito baixa de fermentar hemiceluloses de madeira macia como a GGM (DELOULE *et al.*, 2020).

A GGM pode ser considerada um carboidrato fermentável e devido a sua grande massa molar, possivelmente é mais absorvida no intestino grosso (KONKOL *et al.*, 2017) onde justamente a microbiota intestinal apresenta mais alta concentração (ZHU *et al.*, 2013). Certas bactérias do filo *Firmicutes* conseguem produzir mais enzimas responsáveis pela degradação e fermentação de carboidratos (STOJANOV; BERLEC; ŠTRUKELJ, 2020). De forma interessante, a interação GGM e DMH modifica a relação F/B de tal forma que a dose de 400mg/kg, quando sozinha, apresenta uma grande diminuição da relação F/B como visto anteriormente, mas quando associada ao DMH, eleva essa relação em até 318,61% em relação aos animais saudáveis. O aumento na relação F/B geralmente é associado à obesidade em animais experimentais (MYLES *et al.*, 2014), não constatada nos parâmetros nutricionais dos animais deste estudo, mantendo esses achados ainda insipientes.

Desta forma, o microbioma intestinal disbiótico resultante do tratamento com a GGM, potencialmente menos prejudicial na sua menor dosagem, não é compatível com os achados histopatológicos e com a presença de alterações pré-neoplásicas nos cólons dos animais tratados neste estudo em baixas dosagens de GGM como relatado anteriormente.

Figura 17 - Efeito da GGM na modulação da microbiota intestinal.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: EDTA, ácido etilenodiaminotertracético; GGM, galactoglucomanana; DMH, 1,2-dimetilhidrazina. Diferentes sinais sobrescritos em cada coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo * relacionado ao controle EDTA (controle negativo), # relacionado ao DMH (controle positivo)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A GGM da casca de abeto da Noruega revelou-se uma excelente fonte de compostos fenólicos com alta capacidade antioxidante realçando ainda mais a importância do aproveitamento de recursos da indústria florestal considerados descartáveis até o presente momento e obtida com método de extração seguro. O trato gastrointestinal diminuiu esta capacidade antioxidante tornando esses compostos menos bioacessíveis ao final do processo de digestão. No entanto, mesmo com essa diminuição, a GGM revelou um forte poder citotóxico, antiproliferativo e diminuiu os danos provocados pelo estresse oxidativo em células cancerosas humanas, possivelmente pela ação correspondente dos compostos fenólicos presentes nos extratos somados aqueles presentes, mas não investigados neste estudo. Quanto à carcinogênese colorretal, a GGM em sua maior dosagem (400mg/kg) atenuou o surgimento de lesões pré-neoplásicas e de alterações morfológicas no tecido colônico no modelo *in vivo* experimental, inclusive não contribuindo para o surgimento de infiltrado inflamatório que tanto colabora para a gênese do câncer colorretal. E não interferiu também no ganho de massa e no bem estar geral dos animais. No entanto, ela foi responsável por modular a microbiota intestinal causando disbiose quando associada ao DMH, mantendo essa correlação ainda insipiente, porém, com perspectiva de se apresentar potencialmente segura para o microbioma intestinal em menores dosagens fomentando futuras investigações. A GGM não modulou as *Gammaproteobacterias*, consideradas mais patogênicas, apontando uma provável segurança apresentada por esta matriz complexa e abrindo caminhos para a perspectiva potencial do emprego da GGM como uma fibra fermentável atuando na promoção da saúde intestinal.

REFERÊNCIAS

- ALRAWI, S. J. *et al.* Aberrant crypt foci. **Anticancer research**, Athens, v. 26, n. 1A, p. 107-119, Jan./Feb. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16475686/>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- AMADEU, S. O. *et al.* Arthrospira (Spirulina) platensis feeding reduces the early stage of chemically induced rat colon carcinogenesis. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 129, n. 3, p. 395-405, Feb. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35506448/>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- BARABÁSI, A. L.; MENICHETTI, G.; LOSCALZO, J. The unmapped chemical complexity of our diet. **Nature Food**, England, v. 1, n. 1, p. 33-37, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s43016-019-0005-1#citeas>. Acesso em: 30 ago. 2023.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 239, n. 1, p. 70-76, July. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8660627/>. Acesso em: Acesso em: 18 jan. 2022.
- BHATTARAI, M. *et al.* Functionality of spruce galactoglucomannans in oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, United Kingdom, v. 86, p. 154-161, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X17316995>. Acesso em: 28 jul. 2022.
- BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 147-151, Oct. 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3677050/>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 55-71, June. 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7600544/>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food chemistry**, Barking, v. 128, n. 1, p. 14-21, Sep. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25214323/>. Acesso em: 12 jan. 2023.
- BOROVKOVA, V. S. *et al.* Molecular characteristics and antioxidant activity of spruce (Picea abies) hemicelluloses isolated by catalytic oxidative delignification. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 1, p. 266, Jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35011498/>. Acesso em: Acesso em: 18 jan. 2023.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, França, v.

28, n. 1, p. 25-30, Jan. 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 18 jan. 2022.

CABAN, M; LEWANDOWSKA, U. Encapsulation of Polyphenolic Compounds Based on Hemicelluloses to Enhance Treatment of Inflammatory Bowel Diseases and Colorectal Cancer. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 10, p. 4189, May. 2023. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37241929/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

CAI, Y. *et al.* Impact of particle size of pulverized citrus peel tissue on changes in antioxidant properties of digested fluids during simulated in vitro digestion. **Food Science and Human Wellness**, China, v. 9, n. 1, p. 58-63, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453019301673>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CAO, Q. *et al.* Phenolic compounds, bioactivity, and bioaccessibility of ethanol extracts from passion fruit peel based on simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, Barking, v. 356, n. 15, p. 129682, Sep. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33812196/>. Acesso em: 18 jul. 2023.

CHAIT, Y. A. *et al.* Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. **Lwt**, Cambridge, v. 117, p. 108623, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002364381930965X>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CHAPMAN, D. G.; CASTILLO, Raul; CAMPBELL, J. A. Evaluation of protein in foods: 1. A method for the determination of protein efficiency ratios. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 5, p. 679-686, May. 1959. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13651969/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

CHEN, W. *et al.* Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39743, June. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22761885/>. Acesso em: 12 jul. 2023.

CHEN, J. *et al.* Genomic data provide new insights on the demographic history and the extent of recent material transfers in Norway spruce. **Evolutionary Applications**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 1539-1551, Apr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31462913/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CLAPPER, M. L.; CHANG, W. C. L.; COOPER, H.S. Dysplastic aberrant crypt foci: biomarkers of early colorectal neoplasia and response to preventive intervention. **Cancer prevention research**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 229-240, Mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32132117/>. Acesso em: 2 jun. 2022.

COSTEA, T. *et al.* Alleviation of multidrug resistance by flavonoid and non-flavonoid compounds in breast, lung, colorectal and prostate cancer. **International journal of**

molecular sciences, Basel, v. 21, n. 2, p. 401, Jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31936346/>. Acesso em: 4 maio 2023.

CUI, C. *et al.* Pre-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals de novo high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis. **Oncology reports**, Athens, v. 27, n. 5, p. 1365-1370, May. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22294266/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

DAAS, P. J. H.; SCHOLS, H. A.; DE JONGH, H. H. J. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 329, n. 3, p. 609-619, Nov. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11128589/>. Acesso em: 29 jan. 2023.

DELOULE, V. *et al.* Prebiotic role of softwood hemicellulose in healthy mice model. **J Funct Foods**, London, v. 64, p. 103688. Jan. 2020. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619306127>. Acesso em: 4 jul. 2023.

DHARWADKAR, P.; ZAKI, T. A.; MURPHY, C. C. Colorectal cancer in younger adults. **Hematol Oncol Clin North Am.**, Philadelphia, v. 36, n. 3, p. 449-470, June. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35577711/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

DIAS, M. C. *et al.* Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 772-780, Mar. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20026158/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

DINIZ, L. R. L. *et al.* Catechins: therapeutic perspectives in COVID-19-associated acute kidney injury. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 19, p. 1-17, Sep. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8512361/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

DO CARMO, M. A. V. *et al.* Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomicidal properties. **Food Research International**, Ottawa, v. 136, p. 109334, Oct. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32846532/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

DO CARMO, M. A. V. *et al.* Ellagitannins from jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) seeds attenuated inflammation, oxidative stress, aberrant crypt foci, and modulated gut microbiota in rats with 1,2 dimethyl hydrazine-induced colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 154, n. April, p. 1-12, Aug. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34058233/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

DO CARMO, M. A. V. *et al.* Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, Ottawa, v. 125, p. 108551, Nov. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31554128/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

DO CARMO, M. A. V. *et al.* Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 24, p. 26–35, Dec. 2018a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799318300250>. Acesso em: 26 mar. 2023.

DO CARMO, M.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: A cell-based point of view. **Adv Food Nutr Res**, San Diego, v. 98, p. 253-280, Mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34507644/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

DOS SANTOS LIMA, A. *et al.* From waste to the gut: Can blackcurrant press cake be a new functional ingredient? Insights on *in vivo* microbiota modulation, oxidative stress, and inflammation. **Food Res Int**, Ottawa, v. 170, p. 112917, Aug. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35506448/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DREW, D. A. *et al.* HD chromoendoscopy coupled with DNA mass spectrometry profiling identifies somatic mutations in microdissected human proximal aberrant crypt foci. **Mol Cancer Res**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 823-829, June. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651453/>. Acesso em: 26 jun. 2022.

DUARTE, V. da S. *et al.* Chemoprevention of DMH-induced early colon carcinogenesis in male BALB/c mice by administration of lactobacillus paracasei DTA81. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 12, p. 1994, Dec. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33327620/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

EBRAHIMZADEH, S. *et al.* Colorectal cancer treatment using bacteria: focus on molecular mechanisms. **BMC microbiology**, London, v. 21, n. 1, p. 1-12, July. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34281519/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

EBRINGEROVÁ, A. *et al.* Norway spruce galactoglucomannans exhibiting immunomodulating and radical-scavenging activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 42, n. 1, p. 1-5, Jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881047/>. Acesso em: 2 jul. 2022.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. Structure, characterization and use. **Polysaccharide I**, New York, p. 1-67, 2005.

EL KAOUTARI, A. *et al.* The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 7, p. 497-504, July. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23748339/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

ESCHER, G. B. *et al.* Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 118, p. 439-453, Aug. 2018. Disponível

em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787846/>. Acesso em: Acesso em: 26 jan. 2022.

ESMEETA, A. *et al.* Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 153, p. 113384, Sep. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35820317/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

FERREIRA-SANTOS, P. *et al.* Unravelling the biological potential of pinus pinaster bark extracts. **Antioxidants**, Basel, v. 9, n. 4, p. 1-21, Apr. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7222395/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

FERREIRA, R. S. *et al.* The impact of laboratory chow for rats in the experiments: Chemical and biological evaluation of nine grain-based diet options. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, v. 37, n. 3, p. 275-284, Mar. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29233032/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

FIDELIS, M. *et al.* Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Food Chemistry**, Barking, v. 334, n. 1, p. 127565, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32717686/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

GAO, F. *et al.* Epigallocatechin gallate inhibits human tongue carcinoma cells via HK2-mediated glycolysis. **Oncology reports**, Athens, v. 33, n. 3, p. 1533-1539, Mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25591943/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

GONÇALVES, R. V. *et al.* Trans-fatty acids aggravate anabolic steroid-induced metabolic disturbances and differential gene expression in muscle, pancreas and adipose tissue. **Life Sciences**, Oxford, v. 232, n. June, p. 116603, Sep. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31254587/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

GOPHNA, U. *et al.* Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 44, n. 11, p. 4136-4141, Nov. 2006. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16988016/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

GRANATO, D. *et al.* From the forest to the plate—hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food chemistry**, Barking, v. 381, n. 1, p. 132284, July. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35121317/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

GREEN, R. J. *et al.* Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 51, n. 9, p. 1152-1162, Sep. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17688297/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. *et al.* Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, Caracas, v. 66, n. 2, p. 87-100, June. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29737665/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HARATIFAR, S.; MECKLING, K. A.; CORREDIG, M. Bioefficacy of tea catechins encapsulated in casein micelles tested on a normal mouse cell line (4D/WT) and its cancerous counterpart (D/v-src) before and after in vitro digestion. **Food & Function**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 1160-1166, June. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24686838/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

HARJU, A. M. *et al.* Chemical factors affecting the brown-rot decay resistance of Scots pine heartwood. **Trees**, Berlin, v. 17, p. 263-268, Jan. 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00468-002-0233-z>. Acesso em: 15 jul. 2023.

HAZAFÁ, A. *et al.* The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. **Nutrition and cancer**, Philadelphia, v. 72, n. 3, p. 386-397, July. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31287738/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

HELAL, A. *et al.* In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in coffee-fortified yogurt. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 20, p. 6843, Oct. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296436/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HERRMANN, K. Review on nonessential constituents of vegetables: III. Carrots, celery, parsnips, beets, spinach, lettuce, endives, chicory, rhubarb, and artichokes. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 167, n. 4, p. 262-273, Oct. 1978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/716640/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

HO, T. M. *et al.* Wood hemicelluloses as effective wall materials for spray-dried microcapsulation of polyunsaturated fatty acid-rich oils. **Food Research International**, Ottawa, v. 164, p. 112333, Feb. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36737926/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HU, L.; DU, M.; ZHANG, J. Hemicellulose-based hydrogels present status and application prospects: a brief review. **Open Journal of Forestry**, França, v. 8, n. 1, p. 15-28, Jan. 2018. Disponível em: https://www.scirp.org/pdf/OJF_2017112916095741.pdf. Acesso em: 27 jun. 2023.

JYSKE, T. *et al.* Fate of antioxidative compounds within bark during storage: a case of Norway spruce logs. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 18, p. 4228, Sep. 2020b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32942658/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

JYSKE, T. *et al.* Inspired by nature: Fiber networks functionalized with tannic acid and condensed tannin-rich extracts of Norway spruce bark show antimicrobial

efficacy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 11, p. 1171908, Apr. 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1171908/full>. Acesso em: 12 maio 2023.

JYSKE, T. *et al.* Localization of (+)-catechin in *Picea abies* phloem: Responses to wounding and fungal inoculation. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 12, p. 2952, June. 2020a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32604938/>. Acesso em: 21 jun. 2023.

KALRA, S.; JOOD, S. Biological evaluation of protein quality of barley. **Food Chemistry**, Barking, v. 61, n. 1-2, p. 35-39, Jan. 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814697001453>. Acesso em: 8 jun. 2023.

KETNAWA, S.; SUWANNACHOT, J.; OGAWA, Y. In vitro gastrointestinal digestion of crisphead lettuce: Changes in bioactive compounds and antioxidant potential. **Food Chemistry**, Barking, v. 311, p. 125885, May. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31780224/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, London, v. 16, n. 12, p. 713-732, Dec. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31455888/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

KHALATBARY, A. R.; KHADEMI, E. The green tea polyphenolic catechin epigallocatechin gallate and neuroprotection. **Nutritional neuroscience**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 281-294, Apr. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30043683/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

KHAN, H. *et al.* Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases. **Autoimmunity reviews**, Amsterdam, v. 18, n. 7, p. 647-657, July. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31059841/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols in promotion of human health. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 1, p. 1-16, Dec. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356332/>. Acesso em: Acesso em: 23 jul. 2023.

KILPELÄINEN, P. O. *et al.* Pressurized hot water flow-through extraction system scale up from the laboratory to the pilot scale. **Green Chemistry**, London, v. 16, n. 6, p. 3186-3194, 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/gc/c4gc00274a/unauth>. Acesso em: 26 jan. 2023.

KIM, B. *et al.* Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 473, n. 2, p. 530-536, Apr. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27018382/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

KIM, D.; MOLLAH, M. L.; KIM, K. Induction of apoptosis of SW480 human colon cancer cells by (-)-epicatechin isolated from *Bulnesia sarmienti*. **Anticancer research**, Athens, v. 32, n. 12, p. 5353-5361, Dec. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23225437/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

KIM, J.; LEE, H. K. Potential role of the gut microbiome in colorectal cancer progression. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 12, p. 807648, Jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35069592/>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KLIMO, E. *et al.* **Spruce monocultures in Central Europe: Problems and prospects**. Joensuu, Finland: European Forest Institute, 2000. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Heinrich-Spiecker/publication/285638409_Growth_of_Norway_spruce_Picea_abies_L_Karst_under_changing_environmental_conditions_in_Europe/links/5e5279cb92851c7f7f512e20/Growth-of-Norway-spruce-Picea-abies-L-Karst-under-changing-environmental-conditions-in-Europe.pdf. Acesso em: 12 jan. 2023.

KONKOL, Y. *et al.* Chronic nonbacterial prostate inflammation in a rat model is associated with changes of gut microbiota that can be modified with a galactoglucomannan-rich hemicellulose extract in the diet. **BJU international**, Oxford, v. 123, n. 5, p. 899-908, May. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30256506/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

KONKOL, Y. *et al.* Galactoglucomannan-rich hemicellulose extract from Norway spruce (*Picea abies*) exerts benefeffects on chronic prostatic inflammation and lower urinary tract symptoms in vivo. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 101, p. 222-229, Aug. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28322961/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

KOPUSTINSKIENE, D. M. *et al.* Flavonoids as anticancer agents. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 2, p. 457, Feb. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7071196/>. Acesso em: 11 set. 2023.

KUMAR, V. *et al.* Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 37-46, Feb. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21226769/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

LEE, C. W. *et al.* Djulis (*Chenopodium formosanum*) prevents colon carcinogenesis via regulating antioxidative and apoptotic pathways in rats. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 9, p. 2168, Sep. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31509964/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

LEHTONEN, M. *et al.* Phenolic residues in spruce galactoglucomannans improve stabilization of oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 512, p. 536-547, Feb. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29100158/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

LI, A. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate affects the proliferation, apoptosis, migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma through the hippo-TAZ signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 42, n. 5, p. 2615-2627, Nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30106116/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

LI, S. *et al.* Polyphenols as potential metabolism mechanisms regulators in liver protection and liver cancer prevention. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 56, n. 1, p. e13346, Jan. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36229407/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MÁRMOL, I. *et al.* Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 18, n. 1, p. 197, Jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28106826/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

MARTINEZ POMIER, K.; AHMED, R.; MELACINI, G. Catechins as tools to understand the molecular basis of neurodegeneration. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 16, p. 1-21, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7465241/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after in vitro gastro-intestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, London, v. 49, p. 424-436, Oct. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464618304808>. Acesso em: 18 jul. 2023.

METSÄMUURONEN, S.; SIRÉN, H. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: A review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. **Phytochemistry Reviews**, London, v. 18, p. 623-664, July. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-019-09630-2>. Acesso em: 12 jan. 2023.

MIKKONEN, K. S. *et al.* Environmentally-compatible alkyd paints stabilized by wood hemicelluloses. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 133, n. March, p. 212-220, July. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814697001453>. Acesso em: 4 maio 2023.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, June. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24803111/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MOCHIZUKI, M. *et al.* Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, Amsterdam, v. 1569, n. 1-3, p. 35-44, Jan. 2002. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11853955/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

MONTALBAN-ARQUES, A.; SCHARL, M. Intestinal microbiota and colorectal carcinoma: Implications for pathogenesis, diagnosis, and therapy. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 48, p. 648-655, Oct. 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31631043/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

MORGAN, E. *et al.* Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. **Gut**, London, v. 72, n. 2, p. 338-344, Feb. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36604116/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MOULAHOU, H. *et al.* Aberrant crypt foci are regionally affected by zinc treatment in a 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis model. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 47, p. 21-30, May. 2018.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29544804/>. Acesso em: 26 jan. 2023.

MYLES, I. A. *et al.* Effects of parental omega-3 fatty acid intake on offspring microbiome and immunity. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e87181, Jan. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24489864/>. Acesso em: 26 ago. 2023.

MUSIAL, C.; KUBAN-JANKOWSKA, A.; GORSKA-PONIKOWSKA, M. Beneficial properties of green tea catechins. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 21, n. 5, p. 1744, Mar. 2020. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143309/>. Acesso em: 15 jan. 2023.

NADEEM, M. S. *et al.* Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, Aug. 2020. p. 51-60. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31112753/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

NIEDZWIECKI, A. *et al.* Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, Basel, v. 8, n. 9, p. 1-17, Sep. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037537/>. Acesso em: Acesso em: 26 jul. 2023.

NIEKAMP, P.; KIM, C. H. Microbial Metabolite Dysbiosis and Colorectal Cancer. **Gut and Liver**, Seoul, v. 17, n. 2, p. 190-203, Mar. 2023. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36632785/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

NOVAES, R. D. *et al.* Depletion of enteroendocrine and mucus-secreting cells is associated with colorectal carcinogenesis severity and impaired intestinal motility in rats. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 79, n. 1, p. 3-13, Jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26208280/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

NURZYŃSKA-WIERDAK, R. Phenolic Compounds from New Natural Sources-Plant Genotype and Ontogenetic Variation. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 4, p. 1731, Feb.

2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36838719/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

ODRIOZOLA-SERRANO, I. *et al.* Stability and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Rosehip Extracts during In Vitro Digestion. **Antioxidants**, Basel, v. 12, n. 5, p. 1035, Apr. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33199124/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

OH, J. H. *et al.* Profiling of in vitro bioaccessibility and intestinal uptake of flavonoids after consumption of commonly available green tea types. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 6, p. 1518, Mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33802142/>. Acesso em: 18 jul. 2023.

OLOVO, C. V. *et al.* Faecal microbial biomarkers in early diagnosis of colorectal cancer. **Journal of cellular and molecular medicine**, Bucharest, v. 25, n. 23, p. 10783-10797, Dec. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34750964/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PAN, L. H. *et al.* Preventive effect of a galactoglucomannan (GGM) from *Dendrobium huoshanense* on selenium-induced liver injury and fibrosis in rats. **Experimental and toxicologic pathology**, Jena, v. 64, n. 7-8, p. 899-904, Nov. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21530204/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **BioMed Research International**, Akron, v. 2011, p. 1-14, Dec. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018655/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

PETTERSEN, R. C. The chemical composition of wood. **The chemistry of solid wood**, Oxford, v. 207, p. 57-126, 1984. Disponível em: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Petterson%2C+R.+C.%3A+The+Chemical+Composition+of+Wood.+In+The+Chemistry+of+Solid+Wood%3B+Rowell%2C+R.%2C+Ed.%3B+Advances+in+Chemistry+207%3B+American+Chemical+Society%3A+Washington+DC%2C+1984%3B+Vol.+207%3B+pp.+57-126.+&btnG=. Acesso em: 25 jul. 2023.

PIETARINEN, S. P. *et al.* Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. **Journal of wood science**, Ottawa, v. 52, p. 436-444, Oct. 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10086-005-0780->. Acesso em: 15 jul. 2023.

PINTO, D. *et al.* Metabolomic insights into phenolics-rich chestnut shells extract as a nutraceutical ingredient - A comprehensive evaluation of its impacts on oxidative stress biomarkers by an in-vivo study. **Food Research International**, Ottawa, v. 170, p. 112963, Aug. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37316050/>. Acesso em: 15 ago. 2023

PITKÄNEN, L.; HEINONEN, M.; MIKKONEN, K. S. Safety considerations of plant polysaccharides for food use: A case study on Phenolic-rich softwood

galactoglucomannan extract. **Food and Function**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 1931–1943, Apr. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29589618/>. Acesso em: 2 jul. 2022.

POLARI, L. *et al.* Galactoglucomannan extracted from spruce (*Picea abies*) as a carbohydrate source for probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 44, p. 11037–11043, Nov. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23067113/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

PRADO-SILVA, L. *et al.* Sesame and resistant starch reduce the colon carcinogenesis and oxidative stress in 1, 2-dimethylhydrazine-induced cancer in Wistar rats. **Food research international**, Ottawa, v. 62, p. 609-617, Aug. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914002762>. Acesso em: 26 jan. 2023.

PRINCE, P. D. *et al.* LPS-induced renal inflammation is prevented by (-)-epicatechin in rats. **Redox biology**, Amsterdam, v. 11, p. 342-349, Apr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28039839/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

QUAGLIO, A. E. V. *et al.* Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 28, n. 30, p. 4053-4060, Aug. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914002762>. Acesso em: 28 jul. 2023.

QUINTANILLA, I. *et al.* Rectal aberrant crypt foci in humans are not surrogate markers for colorectal cancer risk. **Clinical and Translational Gastroenterology**, New York, v. 10, n. 6, p. e-00047, June. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31136360/>. Acesso em: 26 jan. 2023.

RACKERBY, B. *et al.* Understanding the effects of dietary components on the gut microbiome and human health. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 29, n. 11, p. 1463-1474, Aug. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33088595/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

REHMAN, M. U. *et al.* Naringenin (4, 5, 7-trihydroxyflavanone) suppresses the development of precancerous lesions via controlling hyperproliferation and inflammation in the colon of Wistar rats. **Environmental toxicology**, New York, v. 33, n. 4, p. 422-435, Apr. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29345053/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

RENEHAN, A. G. *et al.* Early cellular events in colorectal carcinogenesis. **Colorectal disease**, v. 4, n. 2, p. 76-89, Mar. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12780627/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

RODRIGUES, M. A. M. *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological**

Research, Brazil, v. 35, n. 3, p. 351-355, Mar. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11887213/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

ŠAMEC, D. *et al.* The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. **Plants**, Basel, v. 10, n. 1, p. 118, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33430128/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

SANKAR, S. A. *et al.* The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, v. 38, n. 4, p. 276-286, June. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25864640/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SANTOS, J. D. B. *et al.* Food-drug interaction: Anabolic steroids aggravate hepatic lipotoxicity and nonalcoholic fatty liver disease induced by trans fatty acids. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. 116, p. 360-368, June. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29704577/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

SANTOS, J. S. *et al.* Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, Barking, v. 254, p. 348-358, July. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29548463/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SATUE, M. T.; HUANG, S. W.; FRANKEL, E. N. Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached, and deodorized olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 1131-1137, Oct. 1995. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/BF02540978>. Acesso em: 8 jun. 2023.

SEŃCZYK, Ł. *et al.* The effect of in vitro digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. **Food Chemistry**, Barking, v. 344, p. 128581, May. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33199124/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SELMA, M. V.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 57, n. 15, p. 6485-6501, Aug. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19580283/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SEQUETTO, P. L. *et al.* Naringin accelerates the regression of pre-neoplastic lesions and the colorectal structural reorganization in a murine model of chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 64, p. 200-209, Feb. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24296135/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

SEQUETTO, P. L. *et al.* The flavonoid chrysin attenuates colorectal pathological remodeling reducing the number and severity of pre-neoplastic lesions in rats exposed to the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 352, n.

2, p. 327-339, May. 2013. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23468207/>. Acesso em: 26 mar. 2023.

SHABBIR, U. *et al.* Curcumin, quercetin, catechins and metabolic diseases: The role of gut microbiota. **Nutrients**, Basel, v. 13, n. 1, p. 206, Jan. 2021. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33445760/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Phenolic compounds as Nrf2 inhibitors: potential applications in cancer therapy. **Cell Communication and Signaling**, London, v. 21, n. 1, p. 1-18, May. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37127651/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

SHARMA, A.; GOYAL, R.; SHARMA, L. Potential biological efficacy of Pinus plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. **BMC complementary and alternative medicine**, London, v. 16, n. 1, p. 1-11, Jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730770/>. Acesso em: 26 mar. 2022.

SIMOES, C. D. *et al.* Habitual dietary intake is associated with stool microbiota composition in monozygotic twins. **The Journal of nutrition**, Springfield, v. 143, n. 4, p. 417-423, Apr. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23343669/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

SØDRING, M.; GUNNES, G.; PAULSEN, J. E. Detection and characterization of flat aberrant crypt foci (flat ACF) in the novel a/J min/+ mouse. **Anticancer Research**, Athens, v. 36, n. 6, p. 2745-2750, June. 2016. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27272784/>. Acesso em: 26 mar. 2023

SPINELLI, S. *et al.* Bioactive compounds from Norway spruce bark: Comparison among sustainable extraction techniques for potential food applications. **Foods**, Basel, v. 8, n. 11, p. 524, Oct. 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31652830/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SREEVALSAN, S.; SAFE, S. Reactive oxygen species and colorectal cancer. **Current colorectal cancer reports**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 350-357, Dec. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25584043/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

STATISTICS FINLAND (OSF) (2021). Natural resources Institute Finland, forest industries' wood consumption. Helsinki: Natural Resources Institute Finland.

STOJANOV, S.; BERLEC, A.; ŠTRUKELJ, B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 11, p. 1715, Nov. 2020. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33139627/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

STRIŽINCOVÁ, P. *et al.* Spruce bark-a source of polyphenolic compounds: Optimizing the operating conditions of supercritical carbon dioxide extraction. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 22, p. 4049, Nov. 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31717444/>. Acesso em: 26 mar. 2022.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, New York, v. 71, n. 3, p. 209-249, May. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SZWAJKOWSKA-MICHAŁEK, L. *et al.* Phenolic compounds in trees and shrubs of central Europe. **Applied Sciences**, Basel, v. 10, n. 19, p. 1-24, Oct. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/19/6907>. Acesso em: 23 jul. 2023.

TAGLIAZUCCHI, D. *et al.* In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, Italia, v. 120, n. 2, p. 599-606, Sep. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27690020/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

THANIKACHALAM, K.; KHAN, G. Colorectal cancer and nutrition. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 1, p. 164, Jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30646512/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

VÄLIMAA, A. L. *et al.* Enhancement of Norway spruce bark side-streams: Modification of bioactive and protective properties of stilbenoid-rich extracts by UVA-irradiation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 145, p. 112150, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020300662>. Acesso em: 12 jan. 2023.

VALOPPI, F. *et al.* Centrifugal fractionation of softwood extracts improves the biorefinery workflow and yields functional emulsifiers. **Green Chemistry**, London, v. 21, n. 17, p. 4691-4705, Aug. 2019a. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/gc/c9gc02007a>. Acesso em: 20 jan. 2023.

VALOPPI, F. *et al.* Spruce galactoglucomannan-stabilized emulsions as essential fatty acid delivery systems for functionalized drinkable yogurt and oat-based beverage. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 245, p. 1387-1398, Apr. 2019b. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-019-03273-5>. Acesso em: 26 mar. 2022.

VENKATACHALAM, K. *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology research**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 2-18, Mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32440334/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

WANG, Y. *et al.* Epigallocatechin gallate inhibits dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in rats. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 26, n. 17, p. 2064, May. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32536775/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

WEI, H. *et al.* EGCG inhibits growth of tumoral lesions on lip and tongue of K-Ras transgenic mice through the Notch pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 99, p. 108843, Jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34407449/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

WILLFÖR, S. *et al.* Characterisation of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 175-187, May. 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861702002886>. Acesso em: 29 jan. 2023.

WILLFÖR, S. *et al.* Spruce-derived mannans - A potential raw material for hydrocolloids and novel advanced natural materials. **Carbohydr. Polym**, London, v. 72, p. 197-210, May. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861707004146>. Acesso em: 12 jan. 2023.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 3-19, Sep. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12946402/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

WU, F. *et al.* The effect of hemicellulose and lignin on properties of polysaccharides in lentinus edodes and their antioxidant evaluation. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 9, p. 1834, May. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31086063/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

ZHANG, Z. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate inhibits the formation of neutrophil extracellular traps and suppresses the migration and invasion of colon cancer cells by regulating STAT3/CXCL8 pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 478, n. 4, p. 887-898, Apr. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36112238/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ZHAO, H. *et al.* Spruce galactoglucomannan-stabilized emulsions enhance bioaccessibility of bioactive compounds. **Foods**, Basel, v. 9, n. 5, p. 672, May. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32456198/>. Acesso em: 4 maio 2023.

ZHAO, J. *et al.* Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1-12, Apr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962497/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

ZHU, Q. *et al.* The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**, Tokyo, v. 34, n. 3, p. 1285-1300, June. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23397545/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do comitê de Ética Em Uso De Animais – CEUA/UNIFAL-MG.

<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG <small>Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005</small></p> <p>Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG</p>				
<h1>Certificado</h1>				
<p>Certificamos que a proposta intitulada EXTRATO DE HEMICELULOSE RICO EM GALACTOGLUCOMANANA (GGM): AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE, MODULAÇÃO DA MICROBIOTA E DO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO EM RATOS INDUZIDOS À INFLAMAÇÃO, registrada com o nº 0016/2021, sob a responsabilidade de Luciana Azevedo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, com vigência de 05/04/2021 a 17/12/2021, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.</p>				
Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	160	160	0	Biotério central da unifal-mg
<p>Alfenas, 09 de Setembro de 2022</p> <p>Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG</p>				
<p><small>Para verificar autenticidade acesse: http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/ e digite a chave: 6360a332f01f4800251b8f0523c5a8cc</small></p>				