

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Isabela Brito Reis

Características sociodemográficas, nutricionais e aspectos da diversidade bacteriana na microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares

Juiz de Fora
2022

Isabela Brito Reis

Características sociodemográficas, nutricionais e aspectos da diversidade bacteriana na microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Saúde. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis, Isabela Brito.

Características sociodemográficas, nutricionais e aspectos da diversidade bacteriana na microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares / Isabela Brito Reis. -- 2022. 119 f.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadora: Vânia Lúcia da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2022.

1. Microbiologia. 2. Microbiota intestinal. 3. Hábitos alimentares. 4. Nutrientes. I. Diniz, Cláudio Galuppo, orient. II. da Silva, Vânia Lúcia, coorient. III. Título.

Isabela Brito Reis

Características sociodemográficas, nutricionais e aspectos da diversidade bacteriana na microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares

Dissertação
apresentada Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em 23 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Vania Lúcia da Silva - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Carolina dos Santos Fernandes da Silva

Universidade Presidente Antônio Carlos

Juiz de Fora, 06/09/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Galuppo Diniz, Professor(a)**, em 23/09/2022, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti, Professor(a)**, em 23/09/2022, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Brito Reis, Servidor(a)**, em 23/09/2022, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vania Lucia da Silva, Chefe de Departamento**, em 23/09/2022, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina dos Santos Fernandes da Silva, Usuário Externo**, em 28/09/2022, às 10:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0938185** e o código CRC **5E8C6D60**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem incansáveis incentivadores e não terem medido esforços para me ajudar a chegar onde cheguei.

Ao Daniel, por ser meu companheiro diário e meu principal apoio, e por nunca me deixar desistir, me mostrando o quanto sou capaz de vencer meus desafios, mesmo nos momentos em que eu mesma não acreditava nisso.

Aos meus amigos de sempre, meus suportes, presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, professor Cláudio, e à minha coorientadora, professora Vânia, por todos os ensinamentos e por sempre estarem presentes e dispostos a ajudar.

À Melina, sempre prestativa, por não se cansar de correr atrás de voluntários e pela avaliação do consumo alimentar dos mesmos.

Às minhas amigas de trabalho, Suzane, pela parceria no projeto e no enfrentamento das dificuldades que foram aparecendo no caminho, e Thelma, por ouvir meus lamúrios e ser minha companhia de todas as manhãs.

Aos professores Vanessa, Ari e Alessandra por todo conhecimento compartilhado e por toda ajuda nos momentos (e experimentos) mais difíceis.

À Professora Julliane e à Thaís que, mesmo distantes, se dispuseram a me auxiliar sempre que necessário.

A toda equipe do Laboratório de Diagnóstico de COVID-19, que, durante os tempos mais obscuros da pandemia, me proporcionaram momentos leves e descontraídos no trabalho.

Por fim, à minha cachorrinha Jujuba, que foi minha companheira presencial durante o longo período de isolamento social, estando (literalmente) do meu lado enquanto escrevia tudo isso.

RESUMO

A microbiota intestinal humana (MIH) apresenta grande densidade e diversidade de microrganismos, desempenhando importantes funções, como fornecimento de energia, de nutrientes e modulação imunológica, sendo que seu desequilíbrio pode estar relacionado a diversas patologias. Um dos fatores que mais influenciam na formação da MIH são os hábitos alimentares, que poderiam ser utilizados de forma a modular a relação entre hospedeiro e MIH, abrindo caminho para possíveis intervenções terapêuticas, a fim de prevenir e controlar doenças. O presente estudo teve como objetivo avaliar a estrutura de comunidades bacterianas em indivíduos saudáveis com diferentes hábitos alimentares e correlacionar com suas características nutricionais. Voluntários vegetarianos estritos (n=19), ovolactovegetarianos (n=20) e onívoros (n=19) foram submetidos à avaliação antropométrica e de consumo alimentar, além da coleta de amostras fecais, que foram analisadas através de cultivo em meios de cultura seletivos e de quantificação relativa por PCR em tempo real. As culturas com crescimento viável de bactérias foram submetidas à contagem de UFC e avaliação de morfotipos. Na análise quantitativa por PCR em tempo real, foram avaliados os grupos bacterianos Firmicutes, Bacteroidetes, γ -Proteobacteria e *Lactobacillus*. A dieta de indivíduos vegetarianos estritos exibiu maior consumo de carboidratos e fibras e menor consumo de proteínas e lipídeos. O alto consumo de proteínas de origem animal e de lipídeos pode estar relacionado ao aumento da abundância de bactérias Gram negativas potencialmente patogênicas na MIH. Do ponto de vista qualitativo, não foi possível um agrupamento por similaridade desses voluntários, o que sugere que os diferentes hábitos alimentares, numa visão geral, não seriam suficientes para gerar diferenças qualitativas na composição da MIH. Entretanto, houve a formação de um *core* bacteriano compartilhado entre os grupos, que poderia estar relacionado ao consumo de vegetais *in natura* ou minimamente processados. Portanto, diferenças nos consumos de macronutrientes, bem como nos tipos e formas dos alimentos ingeridos, exercem grande responsabilidade sobre a abundância dos microrganismos na MIH.

Palavras-chave: microbiota intestinal; onívoro; ovolactovegetariano; vegetariano estrito; nutrientes; hábitos alimentares.

ABSTRACT

The human gut microbiota (MIH) has a high density and diversity of microorganisms, performing important functions, such as energy and nutrient supply and immune modulation, and its imbalance is related to several pathologies. MIH regulation is closely related to eating habits, which could be used to modulate the relationship between host and MIH, representing a possible path for therapeutic interventions to prevent and control diseases. Therefore, the present study aimed to evaluate the structure of bacterial communities in healthy individuals with different eating habits and to correlate with their nutritional characteristics. Strict vegetarian volunteers (n=19), lacto-ovo-vegetarians (n=20) and omnivores (n=19) were submitted to nutritional and anthropometric assessment and fecal samples were collected and analyzed by cultivation in selective culture media and real-time PCR. Cultures with viable bacterial growth were submitted to CFU counting and morphotype evaluation. In the real-time PCR analysis, the Firmicutes, Bacteroidetes, γ -Proteobacteria and Lactobacillus bacterial groups were evaluated. The diet of strict vegetarians exhibited higher consumption of carbohydrates and fiber and lower consumption of proteins and lipids. The high consumption of animal-derived proteins and lipids seems to be related to the increased abundance of potentially pathogenic Gram-negative bacteria in MIH. A qualitative grouping by similarity of these volunteers was not possible, which suggests that the different eating habits, in general, would not be enough to cause qualitative differences in the composition of the MIH. However, a bacterial core in common to the three groups was formed, which could be related to the consumption of fresh or minimally processed vegetables. Therefore, different macronutrient intake, as well as types and forms of food consumption, play a major role in microorganisms abundance in MIH.

Keywords: intestinal microbiota; omnivorous; lacto-ovo-vegetarians; strict vegetarians; nutrients; eating habits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema da degradação de macronutrientes e bioconversão de gordura e fitoquímicos pela MIH. Abreviaturas: BCFAs – ácidos graxos de cadeia ramificada; AGCCs – ácidos graxos de cadeia curta..... 25
- Figura 2 - Fluxograma do delineamento experimental utilizado para o estudo estrutura de comunidades bacterianas intestinais em indivíduos com diferentes hábitos alimentares..... 31
- Figura 3 - Ingestão média de calorias e macronutrientes dos grupos VG, VT e ON. As letras a, b e c indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A – ingestão média de calorias; B – ingestão média de carboidratos; C – ingestão média de fibras totais; D – ingestão média de proteínas; E – ingestão média de lipídeos..... 40
- Figura 4 - Distribuição de contagens absolutas de unidades formadoras de colônias (Log UFC/mL) em meios de cultura seletivos e em BHI. As letras a, b e c indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). AHM = ágar hipertônico manitol, BEA = Ágar bile-esculina com azida, EMB = Ágar eosina azul de metileno, BHI = Ágar brain-heart-infusion..... 42
- Figura 5 - Ocorrência absoluta de morfotipos de bactérias Gram positivas (A) e Gram negativas (B) da MIH de indivíduos dos grupos VT, VG e ON. Coloração verde indica morfotipos não detectados nos grupos de voluntários; coloração mais próxima de vermelho indica maior número de ocorrências de morfotipos e coloração mais próxima da cor amarela indica menor número de ocorrências do morfotipo nos grupos avaliados..... 44
- Figura 6 - Diagrama de Venn representativo de morfotipos exclusivos e compartilhados entre os grupos avaliados..... 45
- Figura 7 - Ocorrência absoluta de morfotipos do *core* bacteriano da MIH de indivíduos dos grupos VT, VG e ON. Coloração mais

	próxima de vermelho indica maior frequência absoluta do morfofoto e, coloração mais próxima de verde indica menor frequência absoluta.....	45
Figura 8 -	Gráfico representando a abundância relativa de morfotipos do <i>core</i> bacteriano da MIH de indivíduos dos grupos VT, VG e ON.....	46
Figura 9 -	Dendrograma mostrando agrupamento de similaridade das amostras de acordo com a presença/ausência de morfotipos. Foi utilizado o coeficiente de Dice de similaridade e o método UPGMA (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>).....	47
Figura 10 -	Média da quantificação relativa pelo método de Pfaffl de grupos bacterianos em amostras fecais por PCR em tempo real. As letras a, b e c indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A – média da quantificação relativa de Firmicutes; B – média da quantificação relativa de Bacteroidetes; C – média da quantificação relativa de γ -Proteobacteria; ingestão média de fibras totais; D – média da quantificação relativa de <i>Lactobacillus</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos bacterianos pesquisados, sequência dos primers utilizados, referências e condições utilizadas nas reações de PCR em tempo real.....	36
Tabela 2 - Características sociodemográficas e antropométricas dos participantes.....	38
Tabela 3 - Ingestão média de calorias e macronutrientes dos grupos VG, VT e ON.....	39
Tabela 4 - Distribuição quantitativa dos microrganismos em culturas seletivas.....	41
Tabela 5 - Média da quantificação relativa pelo método de Pfaffl de grupos bacterianos em amostras fecais por PCR em tempo real.....	48

LISTA DE SIGLAS

AB	Ácidos biliares
ABV	Associação Brasileira de Veganismo
AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta
AHM	Ágar hipertônico manitol
ANOVA	Análise de Variância
AR	Artrite reumatóide
BCFAs	Ácidos graxos de cadeia ramificada
BEA	Ágar bile esculina com azida
BHI	Ágar <i>brain-heart-infusion</i>
BUT	Butiril coenzima A:acetato coenzima Atransferase
CCR	Câncer colorretal
CEMIC	Centro de Estudos em Microbiologia
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
EMB	Ágar eosina azul de metileno
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
HDAH	Histona desacetilase
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-22	Interleucina 22
IMC	Índice de massa corporal
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MIH	Microbiota intestinal humana
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Onívoros

pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QQFA	Questionário quantitativo de frequência alimentar
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SBV	Sociedade Brasileira de Vegetarianismo
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TBE	Tris borato EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UFC	Unidades formadoras de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>
VG	Vegetarianos estritos
VT	Ovolactovegetarianos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	15
2.1.1	Funções da microbiota intestinal humana.....	17
2.1.2	Microbiota intestinal humana e sua relação com doenças.....	19
2.2	HÁBITOS ALIMENTARES.....	23
2.2.1	Hábitos alimentares, consumo de macronutrientes e microbiota intestinal humana.....	24
2.3	METAGENÔMICA E CULTURÔMICA NA ANÁLISE DA ESTRUTURA DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
4.2	SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS E COLETA DE AMOSTRAS E DE DADOS ANTROPOMÉTRICOS.....	31
4.3	ANÁLISE CULTURÔMICA DE AMOSTRAS FECALIS.....	33
4.4	ANÁLISE METAGENÔMICA DE AMOSTRAS FECALIS.....	34
4.4.1	Extração de DNA das amostras fecais.....	34
4.4.2	PCR em tempo real quantitativo.....	34
4.5	Análise estatística.....	37
5	RESULTADOS.....	38
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
8	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO A.....	70
	ANEXO B.....	74
	ANEXO C.....	76
	ANEXO D.....	84
	ANEXO E.....	90

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal humana (MIH) apresenta grande densidade e diversidade de microrganismos, os quais desempenham uma importante relação de simbiose com seu hospedeiro. São vários os fatores que influenciam na formação da MIH, como idade gestacional, forma de parto, amamentação e fatores genéticos. A MIH desempenha importantes funções, como digestão de alimentos, modulação do sistema imune, proteção contra patógenos e metabolismo de fármacos.

A MIH tem sido alvo de muitos estudos, que têm auxiliado a elucidar sua relação com diversas doenças, como obesidade, diabetes tipo 2, doenças autoimunes, cânceres, dentre outras. Em geral, determinados grupos de microrganismos têm exibido estreita relação com essas doenças, como, por exemplo, o enriquecimento de bactérias Gram negativas do filo Proteobacteria, que apresentam elementos estruturais pró-inflamatórios, e reduzidos níveis de bactérias produtoras de butirato, sendo que algumas espécies poderiam ser utilizadas como marcadoras de atividade, recorrência ou gravidade de algumas doenças.

As dietas vegetarianas e a dieta onívora são hábitos alimentares de reconhecimento mundial. No ovolactovegetarianismo, não há consumo de carnes e peixes, mas pode haver consumo de ovos, leite e derivados; no vegetarianismo estrito, além da ausência do consumo de carnes e peixes, excluem-se crustáceos, insetos, laticínios, ovos e mel; e no onivorismo, não há restrições. Nesse contexto, os hábitos alimentares exercem um importante fator de modulação da MIH, devido aos diferentes padrões de ingestão de macro e micronutrientes, que enriquecem grupos de bactérias que possuem mais afinidade com cada um.

Portanto, considerando os hábitos alimentares como um fator facilmente modificável, que poderia contribuir para modular as interações entre MIH e hospedeiro e, assim, abrir caminho para possíveis intervenções terapêuticas utilizando padrões alimentares, os quais atuem na prevenção e no controle de importantes doenças crônicas, neste estudo, pretende-se avaliar a estrutura de comunidades bacterianas intestinais em indivíduos que seguem as dietas onívora, ovolactovegetariana e vegetariana estrita, através de técnicas de cultivo de bactérias e de metagenômica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota intestinal humana

O trato gastrointestinal humano representa um dos ambientes microbianos mais densos já relatados, com uma grande quantidade de microrganismos, que incluem bactérias, fungos, vírus, protozoários e arqueias. A microbiota intestinal humana (MIH) apresenta grande diversidade de microrganismos, demonstra resiliência e estabilidade no que se refere à sua estrutura, sendo capaz de retornar ao seu estágio inicial após intervenções de curto prazo, além de desempenhar uma importante relação de simbiose com seu hospedeiro (RINNINELLA et al., 2019; THURSBY e JUGE, 2017). Um estudo de Sender, Fuchs e Milo (2016) estimou que a proporção do número de células humanas e células bacterianas esteja próxima de 1,3:1, sugerindo que nosso organismo apresenta em sua microbiota um número de bactérias pouco maior do que seu próprio número de células.

A formação da MIH, como sugerido por Collado e colaboradores (2016), tem início ainda na fase pré-natal. Nesse estudo, observou-se que havia características compartilhadas pela microbiota da placenta, do líquido amniótico – compostas por uma baixa variedade de microrganismos, com predomínio de bactérias do filo Proteobacteria – e do mecônio, sugerindo transferência de microrganismos entre mãe e feto antes mesmo do nascimento.

A idade gestacional, a forma de parto e a amamentação são fatores que também influenciam na formação da MIH. Milani e colaboradores (2017) reuniram estudos que mostraram que a microbiota intestinal comensal (composta em maior parte pelos gêneros *Bifidobacterium* e *Prevotella*) de bebês prematuros se estabelece mais lentamente do que aquela de bebês nascidos após 37 semanas de gestação. Isso acontece porque bebês prematuros tendem a necessitar de intervenções médicas, com longos períodos de internação e uso de antimicrobianos, além de suporte ventilatório. Assim, a microbiota intestinal de bebês prematuros é composta majoritariamente por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Enterococcus* e por outras bactérias potencialmente patogênicas.

Com relação à forma de parto, a microbiota intestinal de bebês nascidos por parto normal mostra-se semelhante à microbiota vaginal materna, composta principalmente por microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Prevotella*. Já o

ambiente intestinal de bebês nascidos por cesariana tem maior tendência a ser colonizado por microrganismos da pele da mãe, da equipe médica e do ambiente hospitalar, como *Staphylococcus*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium* (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010; MILANI et al., 2017).

Adicionalmente à forma de parto, a alimentação dada aos bebês é uma das principais formas de modulação da MIH. Em geral, crianças amamentadas com leite materno apresentam maiores índices de bactérias do filo Actinobacteria – consideradas bactérias protetoras – enquanto que a microbiota intestinal de crianças alimentadas com fórmulas é composta por grande quantidade de bactérias do grupo γ -Proteobacteria, que estão associadas a processos inflamatórios (O’SULLIVAN, FARVER e SMILOWITZ, 2015). A diversidade da MIH aumenta à medida que começam a ser introduzidas comidas sólidas na alimentação das crianças, que fornece maior variedade de nutrientes. Outros fatores como composição familiar, localização geográfica e fatores genéticos auxiliam na modulação da MIH durante o crescimento (MILANI et al., 2017). Assim, em torno do primeiro ao segundo ano de vida, a MIH inicia sua transição, que resulta na colonização estável na idade adulta, daí a importância dos hábitos alimentares adotados desde mais jovens. Em torno dos 3 aos 4 anos de idade, a MIH apresenta redução dos níveis de filos como Proteobacteria e Actinobacteria e aumento da abundância de Firmicutes e Bacteroidetes, que se tornam os filos dominantes, assim como na idade adulta. (GUO et al., 2020; VOREADES, KOZIL e WEIR, 2014; XIONG et al., 2022).

De um modo geral, em indivíduos adultos, a composição da MIH segue um padrão com relação aos filos que a compõem. Cerca de 90% dos microrganismos da MIH pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, e o restante divide-se, em sua maioria, entre os filos Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia. Pode-se destacar alguns gêneros que se sobressaem em cada filo, como por exemplo, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, do filo Firmicutes; *Bacteroides* e *Prevotella*, do filo Bacteroidetes; *Bifidobacterium*, do filo Actinobacteria; *Akkermansia*, do filo Verrucomicrobia; e a família *Enterobacteriaceae*, do filo Proteobacteria (RINNINELLA et al., 2019).

Alguns autores sugerem estratificar a MIH baseando-se em padrões reprodutíveis de variações, agrupados no que ficou denominado de enterotipos. Os enterotipos estão associados a dietas de longo prazo, apresentam composições estáveis e são identificáveis pela variação nos níveis dos principais gêneros que os

compõem. Existem três enterotipos já identificados: enterotipo 1, com predominância de bactérias do gênero *Bacteroides*; enterotipo 2, com predominância do gênero *Prevotella*; e enterotipo 3, com predominância do gênero *Ruminococcus*. Nesse sentido, o enterotipo 1 tem sido associado a dietas ricas em proteína animal e gorduras saturadas, enquanto que o enterotipo 2, a dietas ricas em vegetais e carboidratos (ARUMUGAM et al., 2011; COSTEA et al., 2017; WU et al., 2011).

Acredita-se que a estratificação da MIH represente grande potencial clínico. A classificação em enterotipos poderia ser utilizada no diagnóstico e também no prognóstico de doenças, além de servir como um indicador de susceptibilidade de desenvolvimento de certas condições clínicas e também como auxiliar na orientação e no acompanhamento de tratamentos de algumas patologias (ARUMUGAM et al., 2011; COSTEA et al., 2017).

2.1.1 Funções da microbiota intestinal humana

Muitas são as funções desempenhadas pela MIH e, dentre elas, pode-se destacar a sua contribuição no processo de digestão de alimentos, no qual os microrganismos que a compõem auxiliam na extração, síntese e absorção de diversos nutrientes e metabólitos, dentre os quais se destacam vitaminas, lipídeos, proteínas, carboidratos, ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (RINNINELLA et al., 2019).

Além disso, a MIH exerce função de modulação do sistema imune inato e adaptativo, como relatado em vários estudos reunidos por Brestoff e Artis (2013), através dos metabólitos dependentes e não dependentes de dieta, como por exemplo, os AGCCs e os lipopolissacarídeos (LPS), que podem regular as células imunológicas direta ou indiretamente.

Os AGCCs, que incluem acetato, butirato e propionato, são os principais produtos metabólicos da fermentação de fibras por bactérias anaeróbias no intestino, e são importantes contribuintes na função da MIH de modulação do sistema imune. Os AGCCs atuam na regulação de leucócitos e células endoteliais, se ligando a receptores acoplados à proteína G (GPCRs), entre eles a GPR43, expressa em leucócitos, e alteração da expressão gênica de células epiteliais intestinais, através da inativação da histona desacetilase (HDAH). Assim, os AGCCs atuam na regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de

necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 6 (IL-6), através da ativação de leucócitos, inibindo-os. Além disso, essas moléculas podem induzir a apoptose em linfócitos, macrófagos e neutrófilos (BRESTOFF e ARTIS, 2013).

Em geral, em condições homeostáticas do intestino, os AGCCs, principalmente o butirato, promovem um ambiente intestinal inóspito aos patógenos, com redução de pH e redução de oxigenação, além de inibirem a produção de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos, o que os confere uma ação anti-inflamatória. Em condições de desequilíbrio da MIH, fatores de virulência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* estimulam a migração de neutrófilos, em um processo pró-inflamatório no qual há redução de bactérias produtoras de AGCCs no intestino (VINOLO et al., 2011; YOO et al., 2020).

O LPS é um componente da parede celular de bactérias Gram negativas, que também possui papel importante na modulação do sistema imune. A integridade do epitélio intestinal é um dos fatores que mais influenciam na absorção de LPS. Alterações nessa integridade, como por exemplo, aquelas causadas pelo aumento de bactérias Gram negativas patogênicas na MIH, que degradam o muco intestinal, têm como consequência o aumento do influxo desses fragmentos bacterianos pró-inflamatórios (LPS) para a corrente sanguínea, fenômeno denominado de endotoxemia. O LPS, por sua vez, interage com receptores da membrana de neutrófilos e macrófagos, tendo como consequência a intensa produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (MOREIRA et al., 2012; PALSSON-MCDERMOTT e O'NEILL, 2004)

A MIH também tem um papel importante na proteção contra microrganismos potencialmente patogênicos, questão levantada com a observação do desenvolvimento de infecções entéricas após uso de antimicrobianos. A MIH é capaz de promover a proteção contra patógenos através da saturação dos possíveis locais de colonização, manutenção da integridade do epitélio intestinal, produção de bacteriocinas, promoção do aumento da resposta imunológica e realização de uma série de processos de competição contra os patógenos, como por exemplo, aumento da expressão de IL-22 por linfócitos T, metabolismo de nutrientes e alteração de pH. Portanto, em condições em que a MIH sofre alterações em sua composição, como redução de microrganismos residentes por uso de antimicrobianos, há diminuição dos processos de competição, alteração da barreira epitelial, bem como alterações

na defesa imunológica, permitindo a proliferação de microrganismos patogênicos (BRESTOFF e ARTIS, 2013, KHOSRAVI e MAZMANIAN, 2013).

A MIH também apresenta participação fundamental no metabolismo de fármacos através de secreção direta de enzimas e competição de metabólitos bacterianos por receptores ou transportadores, afetando a biodisponibilidade, a eficácia e a toxicidade dos fármacos. Além de fatores genéticos, ambientais e fisiológicos do hospedeiro, a MIH é apontada também como um dos fatores que influenciam na variação interindividual da eficácia de medicamentos. O conhecimento sobre as vias microbianas, enzimas, metabólitos e mecanismos ainda é limitado, e apenas uma pequena quantidade de drogas foi avaliada quanto à sua interação com a MIH. Portanto, mais estudos sobre a atuação da MIH no metabolismo de fármacos são necessários, para futuramente, gerenciar os melhores resultados de eficiência e menor toxicidade de medicamentos utilizando-se a medicina personalizada, baseada nas características individuais das pessoas (COLOTTI e RINALDI, 2020; LI, HE e JIA, 2015).

2.1.2 Microbiota intestinal humana e sua relação com doenças

A composição da MIH e sua relação com saúde e doença tem sido alvo de inúmeros estudos, sendo alguns deles ainda contraditórios, levando-se em consideração as diferentes metodologias, bem como as diferentes amostragens utilizadas. Entretanto, existem atualmente alguns consensos, considerando-se achados relevantes similares em diferentes populações (JANSSENS et al., 2018).

Nesse contexto, é importante destacar alguns mecanismos bem descritos que são valiosos no que se refere à relação entre MIH e saúde. Um desses mecanismos inclui o papel da MIH na produção de AGCCs, a partir da fermentação anaeróbia de fibras e outros carboidratos, que são metabólitos de grande importância para a fisiologia do hospedeiro. Os AGCCs apresentam ação sobre a motilidade do intestino, pH do ambiente intestinal e manutenção da barreira epitelial, além de servirem como uma fonte de energia para o hospedeiro. O butirato, em especial, que possui ação imunomoduladora e anti-inflamatória, é considerado elemento “protetor” contra várias doenças, como câncer, diabetes, obesidade e doenças inflamatórias intestinais (DII). Gêneros e espécies importantes na produção de butirato incluem *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia*

faecis, *Faecalibacterium prausnitzii*, dentre outros (BAXTER et al., 2019; CHASSARD e LACROIX, 2013; TOMOVA et al., 2019).

Além disso, distúrbios na composição e na funcionalidade da MIH podem alterar a integridade da barreira intestinal, causando endotoxemia, e, conseqüentemente, uma inflamação crônica de baixo grau, intimamente associada a doenças metabólicas, como obesidade e resistência à insulina. As bactérias associadas a esse processo são, em sua maioria, pertencentes ao filo Proteobacteria (PATTERSON et al., 2016).

A obesidade tem sido constantemente associada a distúrbios na composição da MIH. Muitos estudos da MIH de indivíduos obesos mostraram uma relação Firmicutes:Bacteroidetes aumentada em relação a indivíduos eutróficos (LEY et al., 2005; STOJANOV, BERLEC & ŠTRUKELJ, 2020). Entretanto, outros estudos trouxeram resultados discordantes, uma vez que não foram encontradas diferenças na relação Firmicutes:Bacteroidetes entre indivíduos obesos e eutróficos (DUNCAN et al., 2008; PATIL et al., 2012). Essas discrepâncias poderiam ser explicadas pelas diferentes metodologias e amostragens dos estudos, além de fatores conflitantes, como idade, prática de exercícios físicos, conteúdo energético e composição da dieta, entre outros. Portanto, a relação entre os filos Firmicutes, Bacteroidetes e obesidade não está totalmente esclarecida, sendo necessários mais estudos, principalmente, de populações mais restritas, considerando os costumes e hábitos de diferentes comunidades (AMABEBE, et al., 2020; MAGNE et al., 2020). Apesar disso, a MIH de pessoas obesas tem sido continuamente associada à redução da diversidade de microrganismos (COTILLARD et al., 2013; LECHATELIER et al., 2013; TURNBAUGH et al., 2009), além de apresentar diminuição da abundância de bactérias dos gêneros *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Clostridium* e *Faecalibacterium*, e aumento de bactérias que possuem elementos estruturais pró-inflamatórios que integram a família *Enterobacteriaceae*, quando comparada à MIH de indivíduos eutróficos (CROVESY, MASTERSON e ROSADO, 2020; LEE, SEARS e MARUTHUR, 2019; SERINO, 2018).

A relação da MIH com diabetes tipo 2 também está ligada às bactérias que apresentam elementos estruturais pró-inflamatórios e aos níveis plasmáticos elevados de endotoxinas, em sua maioria pertencentes ao filo Proteobacteria, quando comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, bactérias produtoras de

butirato, como *R. intestinalis* e *F. prausnitzii*, se encontram em quantidades reduzidas na MIH de diabéticos tipo 2, o que evidencia a importância dos efeitos imunometabólicos dos AGCCs (TILG e MOSCHEN, 2014).

As doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo doença de Crohn (DC), têm sido largamente estudadas, e já foram documentadas diferenças na composição da MIH de indivíduos com DII em comparação a indivíduos saudáveis. Estudos mostraram que desequilíbrios na composição da MIH intestinal levam a uma resposta imune adaptativa anormal, e, conseqüentemente, ao aumento da inflamação na DII. Dentre as diferenças na composição da MIH de indivíduos com DII, pode-se citar como exemplo, níveis de abundância reduzidos, em amostras de fezes, da espécie *F. prausnitzii*. Essa bactéria, pertencente ao filo Firmicutes, é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e poderia ser utilizada como marcadora confiável do estágio da DII e também como marcadora de recorrência da DC. Em amostras de biópsia da mucosa intestinal, foi encontrado enriquecimento de bactérias que apresentam elementos estruturais pró-inflamatórios do filo Proteobacteria, especialmente *Escherichia coli*, em pacientes com DC, quando comparadas às amostras de pacientes saudáveis (BAUMGART et al., 2007; GEVERS et al., 2015; NI et al., 2017; NISHIDA et al., 2018; REHMAN et al., 2015; SHI et al., 2017).

Outras doenças autoimunes vêm sendo também relacionadas à composição da MIH. Pacientes com artrite reumatoide (AR), quando comparados a indivíduos saudáveis, em geral, apresentam níveis de abundância reduzidos da espécie *F. prausnitzii*, o que poderia ser um contribuinte para o desenvolvimento do quadro inflamatório (PICCHIANTI-DIAMANTI et al., 2018). Liu e colaboradores (2016), utilizando camundongos, sugeriram uma forte relação entre abundância de bactérias do gênero *Lactobacillus* e a susceptibilidade ao desenvolvimento de AR, bem como associação positiva entre o desenvolvimento da doença e o aumento de bactérias das famílias *Bacteroidaceae* e *Lachnospiraceae*. O aumento do número de bactérias do gênero *Lactobacillus*, principalmente a espécie *L. salivarius*, também mostrou estreita relação com a atividade da AR em estudos com humanos. Porém, algumas espécies desse gênero, como os probióticos *L. casei* e *L. delbrueckii*, demonstraram aliviar os sintomas da AR em modelos experimentais, sugerindo que diferentes espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam ações diferentes na AR (PICCHIANTI-DIAMANTI et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Alguns grupos de bactérias também

foram associados ao lúpus eritematoso sistêmico (LES), como a diminuição da relação Firmicutes:Bacteroidetes e enriquecimento de alguns gêneros, como *Rhodococcus*, *Klebsiella*, *Prevotella* e *Eubacterium*, dentre outros, que poderiam ser utilizados na distinção entre pacientes com LES e pacientes saudáveis (HE et al., 2016; HEVIA et al., 2014).

Diversos tipos de câncer têm sido relacionados a grupos específicos de bactérias da MIH. Alguns estudos já associaram o câncer colorretal (CCR) à bactéria *Fusobacterium nucleatum*, que é capaz de gerar um microambiente pró-inflamatório para desenvolvimento do CCR, e também à alta abundância de *E. coli* invasiva, que pode estar associada à malignidade do CCR. Já bactérias das famílias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Lactobacillaceae* foram encontradas em menores quantidades em tecidos tumorais. Além disso, maiores níveis de Proteobacteria e de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico e baixa abundância de *F. prausnitzii* foram encontrados em pacientes com CCR, em comparação a pacientes saudáveis (GAO et al., 2017; ZHU et al., 2013).

Outros estudos mostraram a relação da composição da MIH com outros tipos de câncer. Estudos preliminares revelaram a ação benéfica de *Akkermansia muciniphila* em imunoterapias anticâncer. Níveis aumentados dessa bactéria parecem estar associados a uma melhor resposta de pacientes à terapia anti-PD-1, geralmente utilizada em casos de melanoma metastático (CANI, 2018). Em pacientes com câncer de próstata, foram relatadas maior abundância de *Bacteroides massiliensis* e menor abundância de *F. prausnitzii* e *Eubacterium rectale*, em relação a pacientes saudáveis (DING e XUE., 2019).

Pesquisas recentes também têm apontado associações entre a MIH e a COVID-19, infecção de caráter multi-sistêmico, capaz de promover comprometimento pulmonar, tendo sido declarada pela OMS como uma pandemia em março de 2020. O intestino também pode atuar como reservatório de seu agente etiológico, o vírus SARS-CoV-2, detectado em amostras fecais, o que pode ser explicado pela expressão de receptores ACE2 no intestino (DHAR e MOHANTY, 2020). Estudos preliminares mostraram alterações significativas na MIH de pacientes com COVID-19, como enriquecimento de microrganismos potencialmente patogênicos. Bactérias benéficas importantes, como as das espécies *F. prausnitzii* e *E. rectale* e aquelas gênero *Bifidobacterium*, apresentaram menor abundância em indivíduos com COVID-19, e permaneceram em níveis menores até 30 dias após a

cura. A redução da abundância da bactéria *F. prausnitzii* mostrou relação com a gravidade da doença. Portanto, esses estudos sugerem que a MIH pode estar envolvida com quadros graves da doença, além de poder apresentar contribuição em situações de sintomas persistentes após a cura da COVID-19 (YEOH et al., 2021; ZUO et al., 2020).

A MIH também tem sido relacionada a outras doenças, como a Doença de Parkinson, na qual foi observada redução da abundância de bactérias que pertencem à família *Lachnospiraceae* e aumento de espécies da família *Enterobacteriaceae* (VASCELLARI et al., 2021); pessoas com Transtorno do Espectro Autista, nas quais foi observado um aumento de bactérias do filo Proteobacteria, dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium* e *Roseburia*, e redução de *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Faecalibacterium* (BUNDGAARD-NIELSEN et al., 2020); e também à depressão, na qual a administração de probióticos, como a combinação de *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longun*, foi capaz de induzir melhoras em pacientes com transtorno depressivo maior (DING et al., 2019).

2.2 Hábitos alimentares

As dietas vegetarianas e a dieta onívora são hábitos alimentares de reconhecimento mundial. A Sociedade Brasileira de Vegetarianismo (SBV, 2021) define o vegetarianismo como um hábito alimentar no qual não há consumo de produtos de origem animal. Existem algumas variações do vegetarianismo reconhecidas pela SBV, como o ovolactovegetarianismo, em que não há consumo de carnes, mas pode haver consumo de ovos, leite e derivados; e o vegetarianismo estrito, no qual não há consumo de carnes, incluindo peixes, crustáceos e insetos, de laticínios, ovos e mel. Os motivos que levam indivíduos a optarem por uma dieta vegetariana, segundo a SBV, incluem saúde, ética em relação ao sofrimento animal e conservação do meio ambiente, dentre outros.

Segundo a definição da *The Vegan Society* (2021) e da Associação Brasileira de Veganismo (ABV), o veganismo é um estilo de vida pautado na exclusão total do consumo de produtos de origem animal, sejam eles alimentícios, de vestuário, produtos de beleza ou higiene pessoal, a fim de excluir toda forma de exploração e crueldade contra os animais. Os veganos seguem a dieta vegetariana estrita e, além disso, excluem de sua lista de consumo produtos de empresas que realizam testes

em animais ou que patrocinam eventos de exploração animal, como, por exemplo, rodeios e circos.

Por definição, indivíduos onívoros são aqueles que se alimentam tanto de alimentos de origem vegetal quanto de origem animal, numa dieta sem restrições (DICIO, 2018). Apesar de ser uma dieta que provê maior variedade de fontes de nutrientes, o onivorismo tem sido relacionado a obesidade e maiores riscos de desenvolvimento de diversas doenças (FRANCO-DE-MORAES et al., 2017; HUANG et al., 2012; WANG et al., 2015).

Nesse contexto, o interesse pelas dietas vegetarianas vem crescendo nos últimos anos. Isso porque dietas vegetarianas estão relacionadas a menores níveis de colesterol sanguíneo, menor mortalidade por doenças cardiovasculares, menor incidência de câncer, menor chance de desenvolvimento de resistência à insulina e de processos inflamatórios e menores índices de estresse e ansiedade (BEEZHOLD et al., 2014; FRANCO-DE-MORAES et al., 2017; HUANG et al., 2012; WANG et al., 2015). Além disso, recentemente, Kim e colaboradores (2021) demonstraram, em um estudo envolvendo seis diferentes países, que dietas vegetarianas estariam relacionadas a menores probabilidades de desenvolvimento de quadros moderados a graves de COVID-19, podendo, portanto, serem consideradas uma forma de proteção contra a doença em sua forma severa.

2.2.1 Hábitos alimentares, consumo de macronutrientes e microbiota intestinal humana

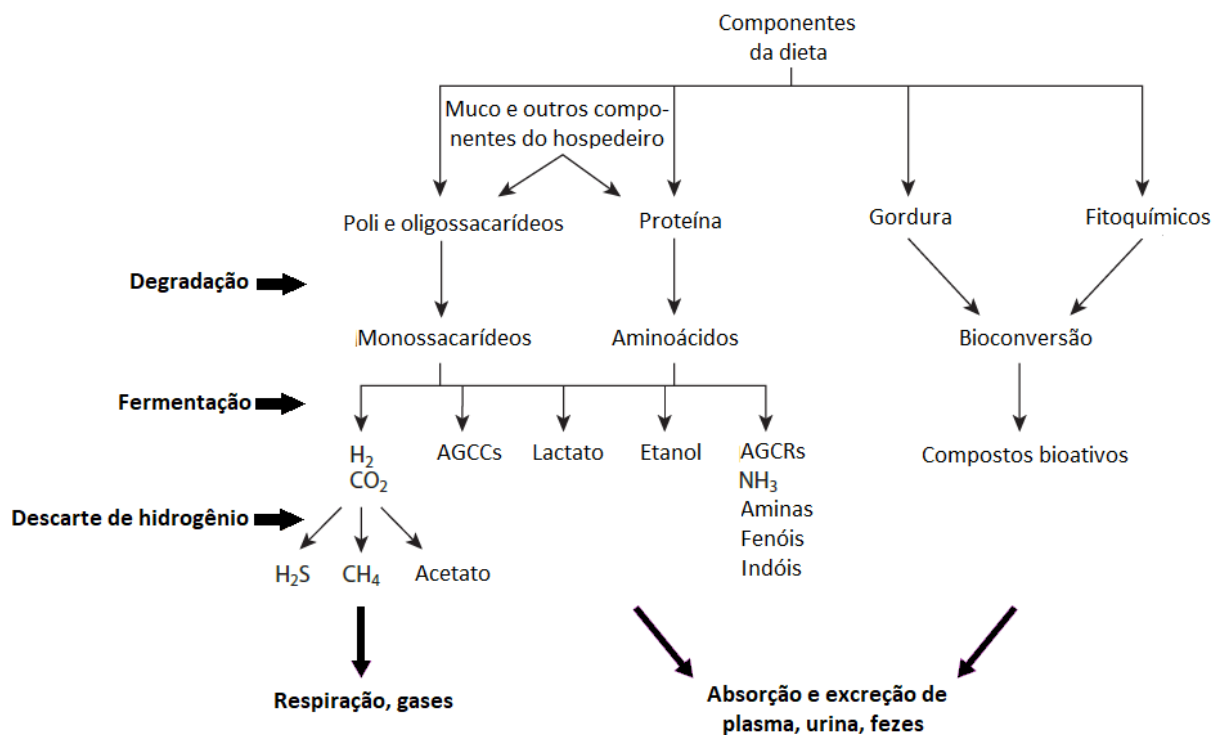
Os hábitos alimentares são importantes contribuintes na modulação da MIH, estando associados a mudanças na composição e função microbiana intestinal (DE ANGELIS et al., 2020; SHEFLIN et al., 2017; TOMOVA et al., 2019). Porém, mudanças repentinas nos hábitos alimentares não levam a alterações significativas na composição da MIH. Isso ocorre devido à característica de resiliência da MIH, que tende a retornar a seu estado inicial após intervenções de curta duração. Devido a essa estabilidade apresentada pela microbiota intestinal, somente dietas de longa duração são capazes de realizar mudanças significativas e duradouras na sua composição (ZHANG et al., 2018).

As dietas vegetarianas estritas, ovolactovegetarianas e onívoras têm sido alvo de diversos estudos relacionados à MIH, que demonstraram significativas diferenças

na estrutura de suas respectivas microbiotas. A principal forma de modulação da MIH pelos hábitos alimentares se dá a partir dos diferentes substratos fornecidos pelos alimentos, como fibras, carboidratos, proteínas, entre outros, que proporcionam a vantagem de seleção de grupos de microrganismos que apresentam afinidade por esses substratos (SHEFLIN et al., 2017).

O metabolismo de macronutrientes oriundos da dieta ocorre em três etapas: degradação primária, fermentação e descarte de hidrogênio, como representado na Figura 1 (SALONEN e DE VOS, 2014).

Figura 1. Esquema da degradação de macronutrientes e bioconversão de gordura e fitoquímicos pela MIH. Abreviaturas: BCFAs – ácidos graxos de cadeia ramificada; AGCCs – ácidos graxos de cadeia curta.



Fonte: SALONEN e DE VOS, 2014.

Os principais gêneros de bactérias envolvidas na degradação primária de macronutrientes incluem *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*. As bactérias envolvidas na etapa de fermentação são, em sua maioria, pertencentes às famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, e também aos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Akkermansia*. E, por fim, três grupos principais de bactérias estão

envolvidos no descarte de hidrogênio: as acetogênicas (gênero *Blautia*), as metanogênicas (arqueias, principalmente as da espécie *Methanobrevibacter smithii*) e as redutoras de sulfato (gênero *Desulfovibrio*) (SALONEN e DE VOS, 2014).

Os carboidratos complexos não digeríveis pelos seres humanos, que incluem as fibras alimentares, são a principal fonte de energia para muitas bactérias da MIH. A modulação da composição da MIH a partir do consumo de fibras tem sido assunto de grande interesse, devido aos diversos benefícios relatados desses macronutrientes (SALONEN e DE VOS, 2014; SHEFLIN et al., 2017). Uma pesquisa conduzida por Desai e colaboradores (2016), utilizando camundongos gnotobióticos (são aqueles criados livres de microrganismos, que podem ser colonizados com grupos conhecidos e em quantidades controladas por pesquisadores), elucidou a relação entre consumo de fibras, MIH e barreira intestinal, e como isso contribui para a relação saúde-doença do hospedeiro. Nesse estudo, foi observado que, em uma dieta pobre em consumo de fibras, os microrganismos da MIH utilizam glicoproteínas do muco intestinal produzidas pelo hospedeiro como fontes de nutrientes, o que leva à erosão da barreira mucosa intestinal, possibilitando maior acesso de microrganismos potencialmente patogênicos ao epitélio intestinal, como *Citrobacter rodentium*, que pode levar a quadros de colite. É importante destacar que linhagens de *E. coli* potencialmente patogênicas para seres humanos apresentam o mesmo mecanismo de patogênese de *C. rodentium*, portanto, a susceptibilidade a doenças induzida por dietas relatadas nesse estudo poderia ser estendida a humanos.

Uma dieta rica em fibras leva a um trânsito intestinal mais acelerado e reduz o pH luminal, devido à produção de AGCCs, características desvantajosas para microrganismos de crescimento mais lento ou daqueles que se desenvolvem em pH mais alto. O pH fecal é um fator de grande importância para a MIH, sendo em média 6,3 em indivíduos vegetarianos estritos, 6,6 em vegetarianos e 6,9 em onívoros. O pH fecal mais baixo mostrou relação inversa, por exemplo, com enriquecimento de bactérias potencialmente patogênicas da família *Enterobacteriaceae*, que se encontra aumentada em indivíduos que seguem uma dieta onívora em comparação a indivíduos vegetarianos estritos. O consumo aumentado de fibras e carboidratos por vegetarianos estritos, em comparação aos onívoros, também tem sido associado ao enriquecimento do gênero *Prevotella* e à redução de *Bacteroides*, gênero de bactérias geralmente associadas ao consumo de proteína e gorduras animais (DE

FILIPPO et al., 2010; SALONEN e DE VOS, 2014; WU et al., 2011; ZIMMER et al., 2012).

O processo de metabolismo de proteínas também resulta em alterações de pH fecal, tornando-o mais elevado em indivíduos com dietas ricas em proteínas, devido à produção de metabólitos alcalinos por bactérias proteolíticas. Em geral, indivíduos com alimentação rica em proteína animal apresentam aumento de microrganismos bile-tolerantes, como bactérias dos gêneros *Bacteroides* e da classe *Clostridia*, e redução de bactérias produtoras de butirato. Já o consumo de uma dieta rica em proteínas vegetais está associado ao aumento da produção de AGCCs, aumento de bactérias benéficas dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e redução de *Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens*, espécies potencialmente patogênicas (TOMOVA et al., 2019; ZIMMER et al., 2012).

As dietas ricas em gorduras, em geral, reduzem a diversidade da MIH e também a sua quantidade total (BEGLEY, GAHAN e HILL, 2005; SALONEN e DE VOS, 2014). Estudos recentes, publicados por Tomova e colaboradores (2019), indicaram que a qualidade de gorduras ingeridas exerce grande importância sobre a composição da MIH. As dietas vegetarianas, em geral, são compostas por gorduras mono e poli-insaturadas em sua maioria, o que favorece o enriquecimento de Bacteroidetes, bactérias do ácido lático, do gênero *Bifidobacterium* e da espécie *Akkermansia muciniphila*. Entretanto, dietas com alto consumo de componentes de fonte animal, em geral dietas onívoras ocidentais, são ricas em gorduras saturadas e estão relacionadas à redução dos gêneros *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Lactobacillus*, por exemplo.

Nesse contexto, considerando-se a influência dos hábitos alimentares na composição e diversidade da MIH e por serem um fator facilmente modificável, alguns tipos de dietas, incluindo dietas personalizadas, poderiam contribuir para modular de forma benéfica as interações entre MIH e hospedeiro, sendo um possível caminho para intervenções terapêuticas que atuem na prevenção e no controle de importantes doenças crônicas (COSTEA et al., 2017; DE FILLIPIS et al., 2015; SEKIROV et al., 2010; WU et al., 2011).

2.3 Metagenômica e culturômica na análise da estrutura da microbiota humana

A MIH apresenta uma complexa estrutura, com uma grande variedade de microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis. Os primeiros estudos da microbiota utilizavam diferentes técnicas de cultivo de material fecal e caracterização de grupos bacterianos por coloração de Gram e diversos outros testes bioquímicos (GOSSLING e SLACK, 1974; HUGON et al., 2013; VAN HOUTE e GIBBONS, 1966). Mais tarde, as técnicas moleculares revolucionaram o estudo da MIH, permitindo uma extensa análise da diversidade de microrganismos, principalmente daqueles chamados não-cultiváveis. Porém, cada técnica apresenta vieses e desvantagens, sendo necessária, muitas vezes, a utilização dessas técnicas de forma complementar (HUGON et al., 2013; PEREIRA e CUNHA, 2020).

A metagenômica possibilitou uma série de novos estudos sobre a composição da microbiota, sendo aparentemente capaz de substituir as técnicas dependentes de cultivo (LAGIER et al, 2015). Essa abordagem utiliza extração de material genético diretamente de espécimes clínicos, com posterior sequenciamento e análise do gene rRNA 16S através de técnicas moleculares, o que permite uma análise rápida e extensa da composição da MIH (AMRANE, RAOULT e LAGIER, 2018; MACCAFERRI, BIAGI e BRIGIDI, 2011).

Porém, a metagenômica apresenta alguns vieses importantes a serem considerados. Destaca-se, nesse contexto, a etapa de extração de DNA como determinante, porque diferentes protocolos de extração levam a diferentes distribuições taxonômicas bacterianas finais. É de suma importância considerar também o que se chama de viés da profundidade, que consiste na incapacidade de detecção de microrganismos em concentrações muito baixas em ambientes ricos e complexos, tais como a MIH (AMRANE, RAOULT e LAGIER, 2018; ANGELAKIS et al, 2016; LAGIER et al, 2012; MACCAFERRI, BIAGI e BRIGIDI, 2011; MAILHE et al, 2018).

Para suprir as limitações encontradas na metagenômica, as técnicas dependentes de cultivo retornaram ao cenário dos estudos da MIH. A culturômica é uma técnica inicialmente desenvolvida para identificação de novas espécies bacterianas da MIH, que foi estendida para análise em outros sítios de microbiota, como vaginal e urinária. Essa abordagem começou a ser utilizada no estudo da MIH em 2012, e se baseia na utilização de diversos métodos dependentes de cultivo dos

espécimes clínicos, que, devido às inúmeras condições de crescimento, permitem o crescimento seletivo de grupos de bactérias, através do uso de inibidores de crescimento, e também de bactérias fastidiosas. Após o isolamento das colônias cultivadas, para identificação de espécies, utilizam-se, então, técnicas de alto rendimento, como espectrometria de massa MALDI-TOF. Portanto, com o aprimoramento da culturômica, houve maior interesse em utilizá-la nos estudos de microbiota, pois tornou-se possível o isolamento de espécies antes consideradas não-cultiváveis, e ainda possibilitou o isolamento de novas espécies bacterianas, aumentando, assim, o número de microrganismos associados à saúde humana (LAGIER et al, 2012; LAGIER et al., 2016; LAGIER et al., 2018; MAILHE et al., 2018; PEREIRA e CUNHA, 2020; PFLEIDERER et al., 2013).

Portanto, considerando as limitações das técnicas envolvidas nos estudos da composição da MIH, e considerando também estudos que mostraram a baixa porcentagem de microrganismos detectados concomitantemente em ambas as técnicas, pode-se considerar a culturômica e a metagenômica como abordagens complementares e necessárias nos estudos relacionados à microbiota (LAGIER et al., 2015; DUBOURG et al., 2013; DUBOURG et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar características sociodemográficas, nutricionais e aspectos da diversidade bacteriana da microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares (vegetarianos estritos, ovolactovegetarianos e onívoros) e comparar o perfil sociodemográfico e nutricional com a diversidade bacteriana representativa da microbiota intestinal de acordo com os diferentes perfis alimentares.

3.2 Objetivos específicos

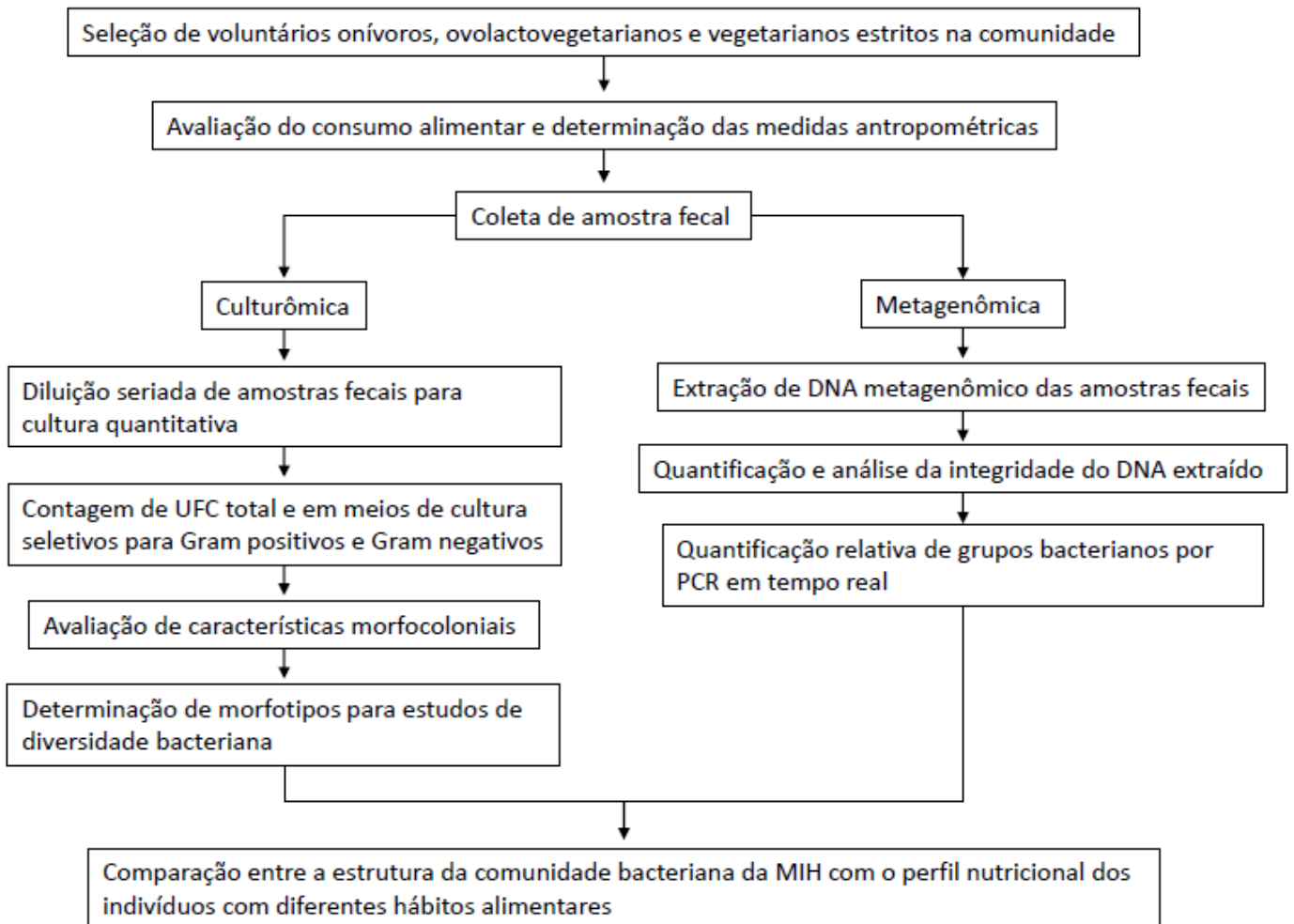
- Determinar características sociodemográficas, antropométricas e avaliação do consumo alimentar de indivíduos com diferentes hábitos alimentares: vegetarianismo estrito, ovolactovegetarianismo e onivorismo;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente a diversidade bacteriana na microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares, através de cultura de amostra fecal em meio de cultura rico e em meios de cultura seletivos;
- Determinar a quantificação relativa, utilizando a técnica de PCR em tempo real, dos grupos bacterianos Firmicutes, Bacteroidetes, γ -Proteobacteria e *Lactobacillus*;
- Comparar a estrutura da comunidade bacteriana com o perfil nutricional entre os indivíduos com diferentes hábitos alimentares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental ocorreu conforme o fluxograma (Figura 2) abaixo:

Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental utilizado para o estudo estrutura de comunidades bacterianas intestinais em indivíduos com diferentes hábitos alimentares.



4.2 Seleção de voluntários, coleta de amostras e dados antropométricos

Este foi um estudo do tipo transversal, descritivo e observacional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de

Juiz de Fora, sob parecer número 2.046.122 (ANEXO A). Para realização deste estudo, foram recrutados, entre o período de abril de 2018 a dezembro de 2019, na comunidade de Juiz de Fora – MG, voluntários onívoros (ON), ovolactovegetarianos (VT) e vegetarianos estritos (VG). Para seleção dos voluntários, foram considerados os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 60 anos, índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 24,9 kg/m², adesão de dieta onívora, ovolactovegetariana ou vegetariana estrita por pelo menos 1 ano, sem histórico de hospitalização recente ou uso de antimicrobianos nos últimos 3 meses, não ser gestante ou lactante, e ausência de doenças crônicas, como diabetes, asma, hipertensão, neoplasias malignas, artrite reumatóide, irritação/inflamação intestinal, dentre outras. Os voluntários foram informados dos riscos e dos objetivos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B).

Portanto, considerando os critérios de inclusão acima descritos, foram selecionados para este estudo 19 indivíduos onívoros, 20 ovolactovegetarianos e 19 vegetarianos estritos, totalizando 58 voluntários, que prosseguiram para avaliações antropométricas e nutricionais, além da coleta de espécime fecal.

Os participantes do estudo foram, então, submetidos à avaliação antropométrica, na qual foram aferidos peso e altura. A avaliação foi realizada por uma acadêmica do curso de Nutrição, treinada para a realização dessas funções. Para aferição de peso, foi utilizada uma balança digital portátil calibrada (G-Tech Glass 10 150 kg), colocando o indivíduo em posição central, ereto, usando o mínimo de roupas possível, descalço e com os pés juntos. Com o voluntário na mesma posição e olhando para o horizonte, utilizando um estadiômetro vertical acoplado à balança, foi também aferida a altura dos participantes. A partir dessas medidas, foi calculado o IMC dos voluntários, seguindo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2000). A fim de reduzir possíveis variações, a tomada de medidas foi realizada pela mesma acadêmica do curso de Nutrição, utilizando sempre o mesmo equipamento para todos os participantes do estudo.

A avaliação da ingestão regular alimentar dos participantes deste estudo foi realizada utilizando-se um Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFA), validado por Cardoso e Stocco (2000), adaptado (ANEXO C). Para cada item do QQFA, os voluntários informavam a frequência média de consumo diária, semanal e mensal e tamanho das porções ingeridas habitualmente relativas aos últimos 6 meses. Para auxiliar os participantes a estimar o tamanho das porções dos

alimentos, foi utilizado um álbum fotográfico elaborado por Sales, Costa e Silva (2004) contendo imagens de diferentes porções dos alimentos do QQFA. A partir dos dados obtidos pelo QQFA, foi possível calcular a ingestão média diária de macronutrientes e consumo calórico médio dos participantes de cada grupo avaliado. Para esse cálculo, foi utilizada como base a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), a fim de se obter a composição calórica e de macronutrientes de cada item alimentar apresentado no QQFA.

Para coleta de amostra de fezes, foram fornecidos recipientes coletores universais estéreis para os participantes do estudo. A coleta foi realizada por demanda espontânea dos voluntários e, em seguida, as amostras foram enviadas ao Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, acondicionadas em uma caixa contendo gelo, dentro de um período máximo de duas horas, para processamento.

4.3 Análise culturômica de amostras fecais

Para a realização de análise microbiológica por técnica culturômica, após recebimento e identificação das amostras, uma alíquota de 1,0 g de fezes foi pesada e diluída em 9,0 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, obtendo-se uma diluição inicial de 10^{-1} g/mL. A partir da diluição inicial, foram realizadas diluições seriadas em solução fisiológica estéril, obtendo-se as diluições de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} até uma diluição final de 10^{-5} g/mL. De cada diluição, uma alíquota de 100 μ L foi inoculada pela técnica de *spread plate* em cada um dos quatro meios de cultura utilizados neste estudo: Ágar hipertônico manitol (AHM) (HiMedia Laboratories, Índia), seletivo para bactérias Gram positivas sugestivas do gênero *Staphylococcus*; Ágar bile esculina com azida (BEA) (HiMedia Laboratories, Índia), seletivo para bactérias Gram positivas sugestivas dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*; Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (HiMedia Laboratories, Índia), seletivo para bactérias Gram negativas sugestivas da família *Enterobacteriaceae*; e, por fim, Ágar *Brain-Heart-Infusion* (BHI) (HiMedia Laboratories, Índia), que é um meio de cultura não-seletivo rico em nutrientes. As placas foram posteriormente incubadas a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC). De cada meio de cultura

utilizado, a diluição que apresentou crescimento viável, entre 25 a 250 unidades formadoras de colônias, foi selecionada para realização de contagem e caracterização de morfotipos. A caracterização de morfotipos foi realizada avaliando-se as características macromorfológicas das colônias, de acordo com o proposto por Neder (1992): tamanho, forma, elevação, borda, brilho, cor e aspecto. Além disso, foram avaliadas também as características morfotintoriais de cada morfotipo, utilizando-se a técnica de coloração de Gram. Cada morfotipo isolado foi, então, identificado pela letra M seguido de número sequencial e, posteriormente, criopreservado em meio de cultura caldo BHI acrescido de glicerol a 20%.

4.4 Análise metagenômica de amostras fecais

4.4.1 Extração de DNA das amostras fecais

Para extração de DNA metagenômico, foi utilizado kit comercial *QIAamp™Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi eluído em volume de 50µL e mantido em freezer -20°C para estudos posteriores. Foi determinado, então, a quantificação e a pureza do DNA metagenômico utilizando-se *Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit*, via *Qubit® Fluorometer 2.0*. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris-HCl-Borato-EDTA). O gel foi corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido).

4.4.2 PCR em tempo real quantitativo

Para caracterização da MIH dos indivíduos desse estudo, foram utilizados *primers* de grupos bacterianos, descritos na Tabela 1, com seus respectivos controles positivos, para realização de PCR em tempo real quantitativo.

O volume final de cada reação foi de 20 µL. Para os grupos bacterianos Universal, Firmicutes, γ-Proteobacteria e *Lactobacillus*, a reação foi composta por 10 µL de *SYBR Green Master Mix* (Qiagen, Alemanha), 0,8 µL de cada *primer* na concentração de 0,5 µmol/L, 1 µL de DNA molde (20ng/µL) e H₂O ultrapura *qsp*; e para o grupo Bacteroidetes, foi adicionada solução de MgCl₂ 1,0 mM à reação, para

obtenção de melhores resultados. A amplificação e detecção foram realizadas em máquina *QuantStudio™3 Real-time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA). As condições de reação utilizadas para cada *primer* estão descritas na Tabela 1. Os valores de Ct e as configurações de base foram determinados automaticamente. A concentração de cada grupo bacteriano foi calculada a partir de quantificação relativa, utilizando-se o método de Pfaffl (STEVENSON e WEIMER, 2007), sendo usado um conjunto de *primers* Universal, que amplificou todas as espécies bacterianas, como referência para o cálculo.

Tabela 1. Grupos bacterianos pesquisados, sequência dos *primers* utilizados, referências e condições utilizadas nas reações de PCR em tempo real.

Grupo	Sequência	Controle Positivo	Referência	Condições da reação de PCR em tempo real
Universal	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Guo et al. (2008)	5' 95°C (5" 95°C, 30" 65°C) x 40
Firmicutes	F: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA R: AGCTGACGACAACCATGCAC	<i>Enterococcus faecalis</i>	Guo et al. (2008)	5' 95°C (5" 95°C, 30" 64°C) x 40
Bacteroidetes	F: GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT R: AGCTGACGACAACCATGCAG	<i>Bacteroides fragilis</i>	Guo et al. (2008)	5' 95°C (5" 95°C, 30" 63°C) x 40
γ-Proteobacteria	F: CIAGTGTAGAGGTGAAATT R: CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	De Gregoris et al. (2011)	5' 95°C (5" 95°C, 30" 63°C) x 40
<i>Lactobacillus</i>	F: GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC R: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC	<i>Lactobacillus sp.</i>	Cani et al. (2008)	5' 95°C (5" 95°C, 30" 65°C) x 40

4.5 Análise estatística

Neste estudo, foram calculadas a média e desvio-padrão para variáveis contínuas e distribuição percentual para variáveis categóricas. Para fins de comparação entre os grupos avaliados, foi realizado Teste t de *Student* entre os dados antropométricos, de consumo de macronutrientes e calorias obtidos no QQFA, e de PCR em tempo real; e análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para comparação entre os grupos dos dados obtidos nas contagens de UFC nos meios de cultura seletivos e não-seletivos. Para isso, foram utilizadas as ferramentas Microsoft Excel 2016 MSO (16.0.13127.20402), PAST 4.03 e GraphPad Prism 9.1.2.226, e valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

Os dados obtidos neste estudo sobre as características sociodemográficas e antropométricas dos participantes recrutados estão apresentados na Tabela 2. Os voluntários dos três grupos alimentares selecionados apresentaram idade média de 28,66 (\pm 7,76) anos, sendo 25,9% do sexo masculino e 74,1% do sexo feminino. O IMC médio dos participantes foi de 21,91 kg/m², não diferindo estatisticamente entre os grupos.

Tabela 2. Características sociodemográficas e antropométricas dos participantes.

Características	Grupos de participantes			Todos os grupos (n = 58)	
	VG (n = 19)	VT (n = 20)	ON (n = 19)		
Sexo (% masculino/feminino)	42,1/57,9	20,0/80,0	15,8/84,2	25,9/74,1	
Idade (DP)	25,9 (6,2)	31,6 (9,7)	28,4 (6,0)	28,66 (7,76)	
Grupos étnicos (%)	Branços	89,5	78,9	52,6	72,5
	Pardos*	10,5	10,6	31,6	18,9
	Pretos	-	10,5	10,5	6,9
	Amarelos	-	-	5,3	1,7
Média do IMC (DP)	22,12 (1,72)	22,13 (1,95)	21,46 (1,96)	21,91 (1,86)	

*A etnia Pardo é usada no Brasil para se referir a pessoas de ancestralidade étnica mista e representa uma diversidade de origens étnicas. ON = onívoros, VT = ovolactovegetarianos, VG = vegetarianos estritos, DP = Desvio Padrão.

Os dados de ingestão média diária de calorias e de macronutrientes pelos participantes estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 3. Com relação ao consumo médio diário de calorias, os grupos analisados não diferiram significativamente entre si. Porém, quando se analisaram os consumos de macronutrientes, houve diferenças importantes entre os grupos com hábitos alimentares distintos. O consumo médio diário de carboidratos se mostrou maior no grupo VG, em relação aos indivíduos dos grupos VT e ON, enquanto que o consumo médio diário de proteínas diferiu estatisticamente entre os três grupos, sendo maior no grupo ON, intermediário em VT, e menor no grupo VG. Já o consumo médio diário de lipídios foi maior nos grupos ON e VT, quando

comparados ao grupo VG. A ingestão média diária de fibras totais foi diferente estatisticamente entre os três grupos avaliados, sendo que os grupos de vegetarianos apresentaram maior consumo quando comparados aos voluntários da dieta onívora, destacando o elevado consumo de fibras totais pelo grupo VG.

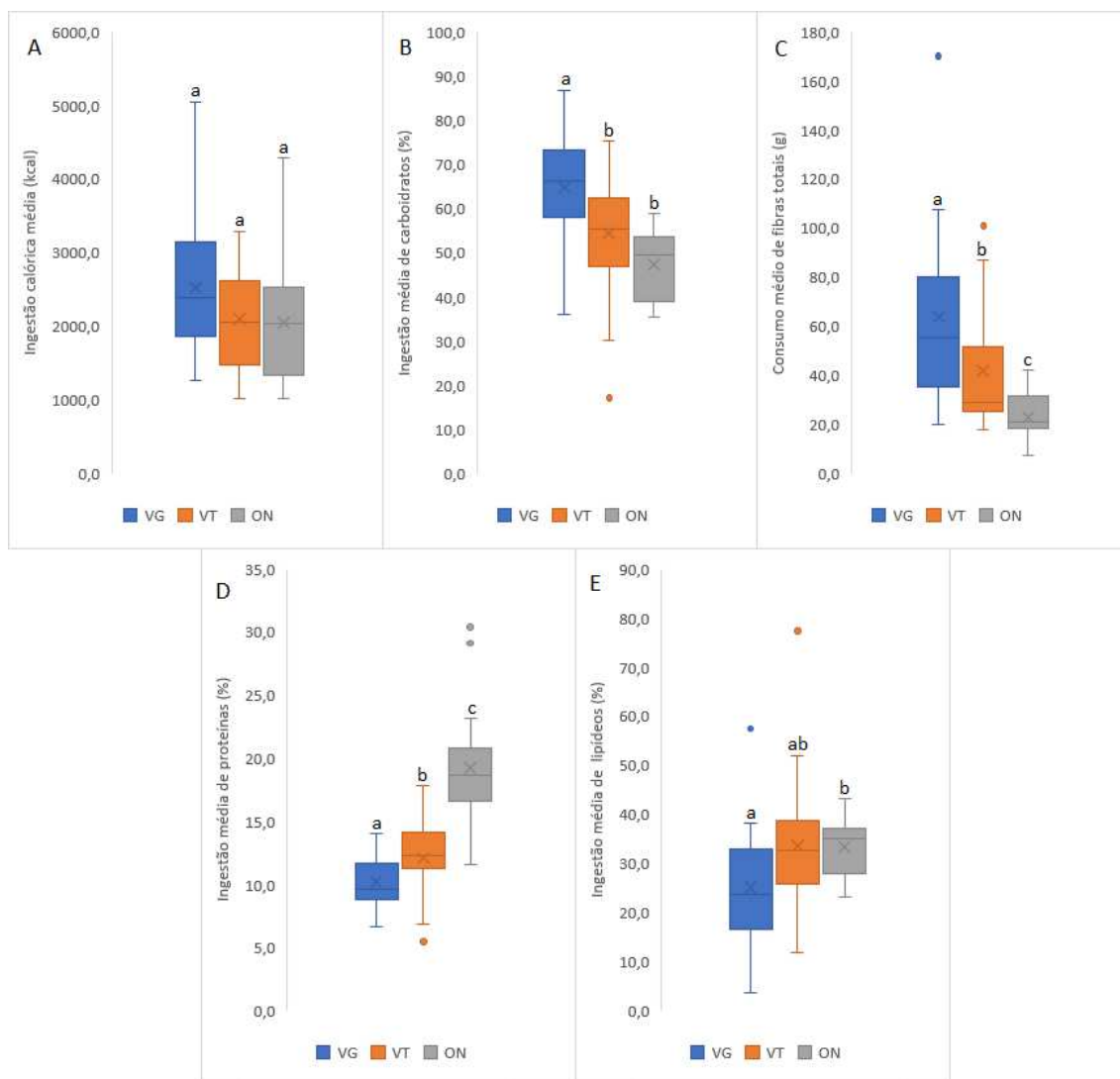
Tabela 3. Ingestão média de calorias e macronutrientes dos grupos VG, VT e ON.

	Ingestão média (DP)			<i>p</i> <0,05*
	VG	VT	ON	
Calorias (kcal)	2522,74 (955,18)	2092,37 (738,86)	2049,28 (836,12)	-
Carboidratos (%)	64,73 (11,34)	54,26 (13,95)	47,39 (7,35)	b, c
Fibras (g)	63,78 (35,79)	41,98 (25,12)	23,01 (9,04)	a, b, c
Proteínas (%)	10,17 (1,91)	12,10 (3,16)	19,22 (4,80)	a, b, c
Lipídios (%)	25,10 (12,11)	33,64 (14,41)	33,39 (6,07)	c

*Análise estatística significativa: a- comparação entre os valores dos voluntários ON e VT; b- comparação entre valores de voluntários VT e VG; c- comparação entre os valores de voluntários ON e VG.

Figura 3. Ingestão média de calorias e macronutrientes dos grupos VG, VT e ON. As letras a, b e c indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

A – ingestão média de calorias; B – ingestão média de carboidratos; C – ingestão média de fibras totais; D – ingestão média de proteínas; E – ingestão média de lipídeos.



A análise culturômica das amostras dos participantes com diferentes hábitos alimentares possibilitou uma visão geral a respeito de alguns grupos bacterianos cultiváveis presentes na MIH. A Tabela 4 exibe os resultados das contagens de UFC nos três meios de cultura seletivos e no meio de cultura não-seletivo (BHI), utilizados neste estudo. Foi observado que, quando se avaliaram as médias das contagens de UFC nos meios de cultura AHM e BHI, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados. Porém, no meio de cultura BEA, o grupo de voluntários que seguiam a dieta vegetariana estrita

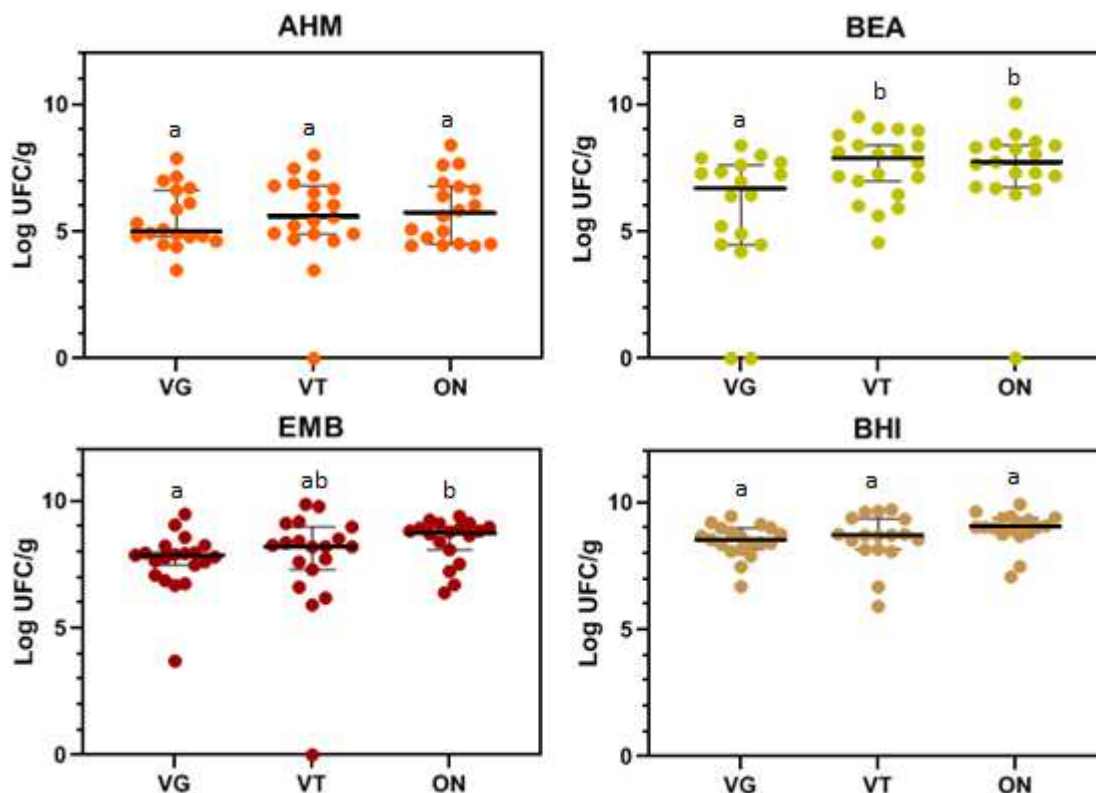
mostrou uma contagem média de UFC de microrganismos Gram positivos significativamente menor, quando comparado aos outros dois grupos avaliados neste estudo. Em relação ao meio de cultura EMB, o grupo VG também apresentou uma contagem média de UFC de microrganismos Gram negativos estatisticamente menor quando comparado ao grupo ON. Essas diferenças ficaram mais proeminentes quando se observa a Figura 4, que aponta a distribuição das contagens de UFC nos meios de cultura utilizados.

Tabela 4. Distribuição quantitativa dos microrganismos em culturas seletivas. AHM = ágar hipertônico manitol, BEA = Ágar bile-esculina com azida, EMB = Ágar eosina azul de metileno, BHI = Ágar *Brain-Heart-infusion*.

Meio de cultura	Contagem média de unidades formadoras de colônias (Log UFC/mL)			<i>p</i> <0,05*
	VG	VT	ON	
AHM	5,39	5,90	5,83	-
BEA	6,05	7,64	7,79	b, c
BEM	7,54	8,27	8,42	c
BHI	8,45	8,62	8,95	-

*Análise estatística significativa: a- comparação entre os valores dos voluntários ON e VT; b- comparação entre valores de voluntários VT e VG; c- comparação entre os valores de voluntários ON e VG.

Figura 4. Distribuição de contagens absolutas de unidades formadoras de colônias (Log UFC/mL) em meios de cultura seletivos e em BHI. As letras a, b e c indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). AHM = ágar hipertônico manitol, BEA = Ágar bile-esculina com azida, EMB = Ágar eosina azul de metileno, BHI = Ágar *Brain-Heart-infusion*.



Na análise de morfotipos cultivados, foi isolado um total de 109 morfotipos (ANEXO D), sendo 38 morfotipos oriundos do meio de cultura AHM, 25 morfotipos do meio BEA e 46 morfotipos do meio EMB. Quanto ao número de morfotipos por grupo avaliado, obtiveram-se 67 morfotipos diferentes presentes no grupo VG, 75 presentes no grupo VT e 60 no grupo ON.

A avaliação da distribuição dos morfotipos por grupo sugere que há uma diferença na composição geral da MIH em função de diferentes hábitos alimentares, quando se avaliam os microrganismos cultiváveis. Na Figura 5, é possível observar as diferentes ocorrências quantitativas dos morfotipos avaliados entre os três grupos de participantes. Observa-se que há morfotipos que não foram detectados em determinados grupos de voluntários (em verde), e outros morfotipos, compartilhados ou não, exibem contagens diferentes entre

os grupos nos quais foram identificados, sendo que, quanto mais próximo da coloração vermelha, maior o número de ocorrências e, quanto mais próximo da cor amarela, menor o número de ocorrências do morfotipo.

A Figura 6 demonstra o agrupamento qualitativo dos morfotipos isolados nos grupos de voluntários deste estudo. Um grupo composto por 30 morfotipos compartilhados foi observado nas amostras fecais destes indivíduos, sugerindo que há um grupo de microrganismos cultiváveis que confere um nível de semelhança entre os diferentes hábitos alimentares avaliados. Embora seja possível estabelecer um *core* bacteriano cultivável comum na MIH dos participantes com diferentes hábitos alimentares estudados, quantitativamente esses morfotipos se apresentam diferentes entre os grupos. A Figura 7 representa a abundância relativa dos morfotipos do *core* bacteriano da MIH de indivíduos dos grupos VG, VT e ON, sendo possível observar que muitos dos morfotipos comuns nos três grupos aparecem com maior ou menor frequência nos diferentes tipos de dietas, sendo que, quanto maior a frequência, mais próxima de vermelho é a coloração e, quanto menor, mais próximo de verde. As diferenças quantitativas na ocorrência de morfotipos do *core* bacteriano ficam ainda mais visíveis quando se observa a Figura 8, que exibe um gráfico do tipo radar, no qual foi observado que, quanto mais ocorrências, maior o pico que aponta para determinado morfotipo.

Figura 6. Diagrama de Venn representativo de morfotipos exclusivos e compartilhados entre os grupos avaliados.

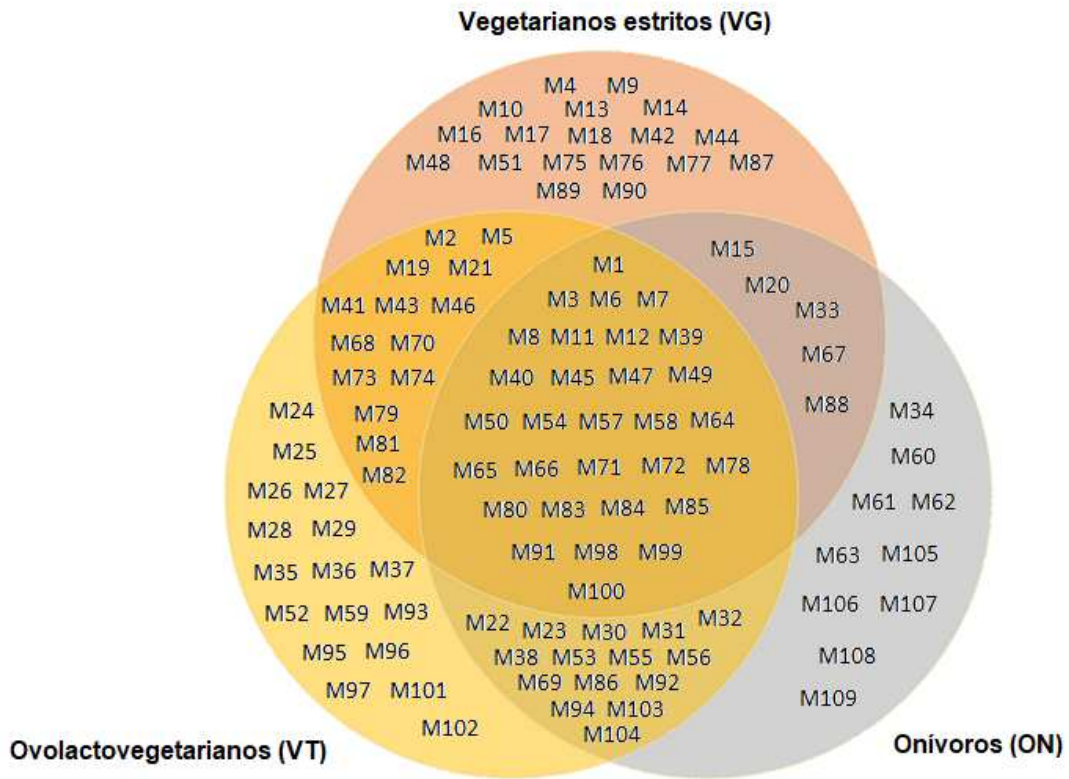


Figura 7. Ocorrência absoluta de morfotipos do *core* bacteriano da MIH de indivíduos dos grupos VT, VG e ON. Coloração mais próxima de vermelho indica maior frequência absoluta do morfotipo e, coloração mais próxima de verde indica menor frequência absoluta.

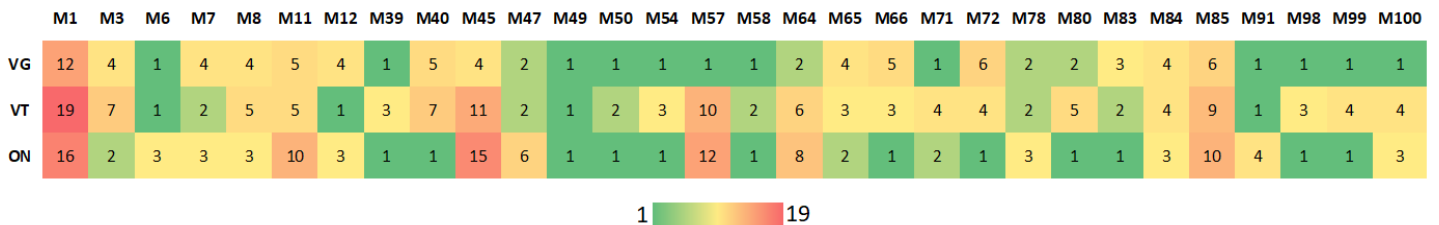
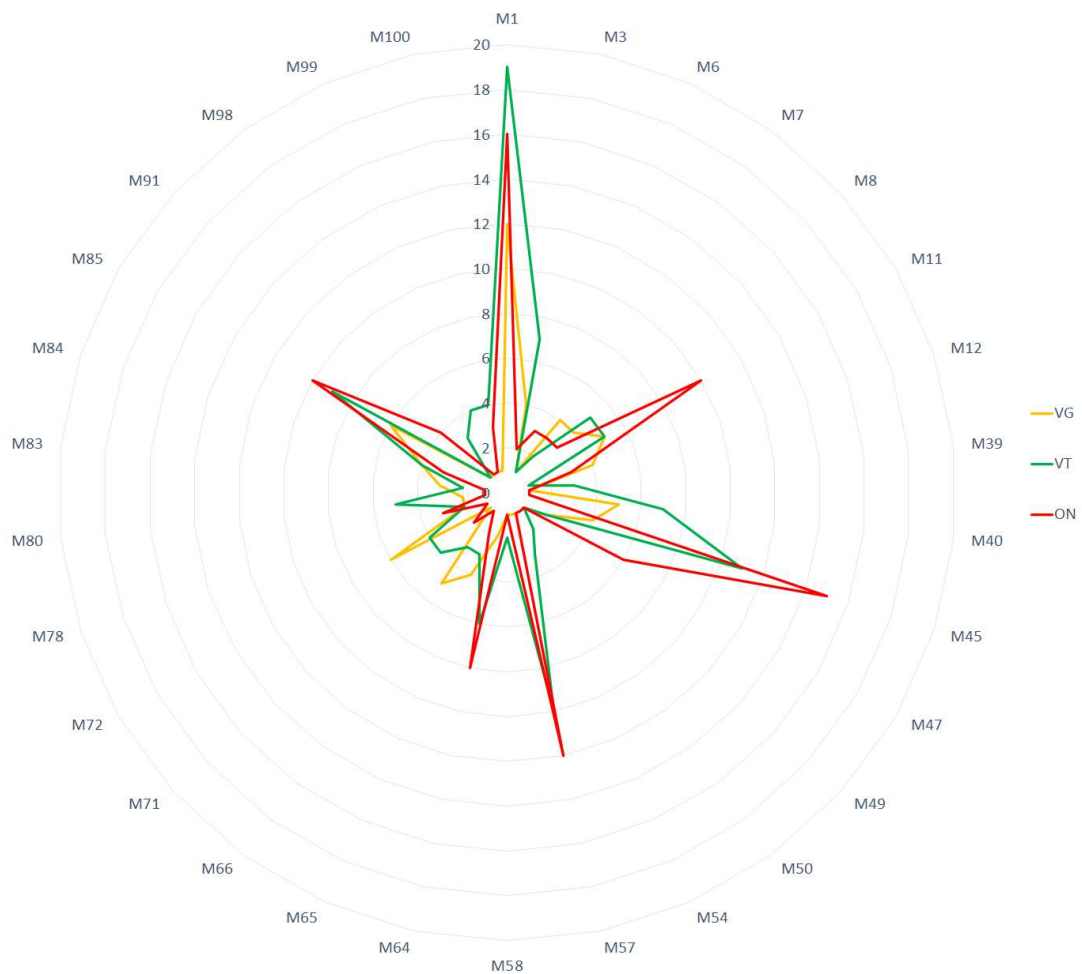
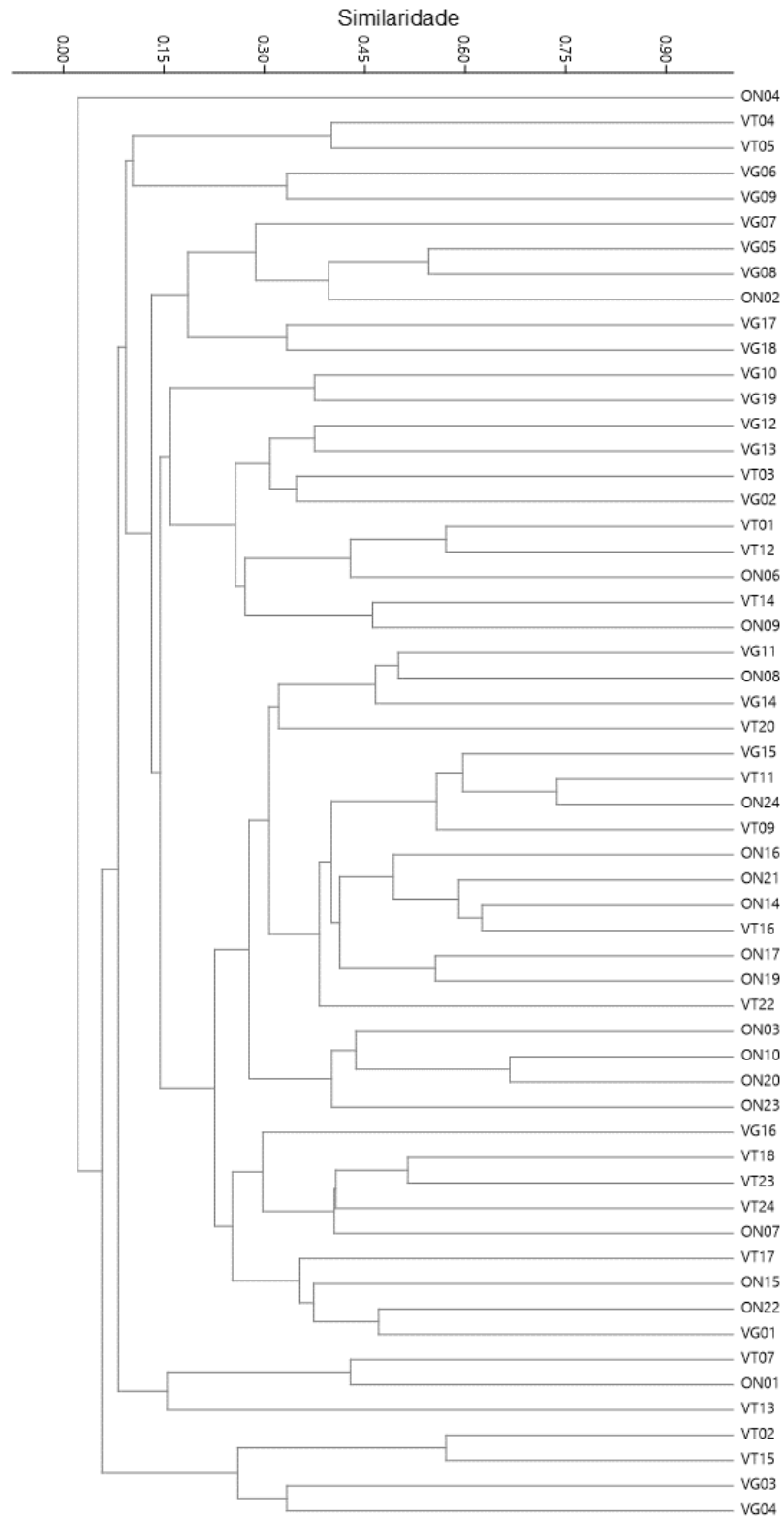


Figura 8. Gráfico representando a abundância relativa de morfotipos do *core* bacteriano da MIH de indivíduos dos grupos VT, VG e ON.



Considerando os dados qualitativos obtidos na caracterização de morfotipos nos três grupos de hábitos alimentares deste estudo, o baixo número de morfotipos compartilhados pelos grupos refletiu em uma distribuição homogênea dos morfotipos entre os grupos VG, VT e ON, como pode ser observado na Figura 9. O dendrograma construído, a partir desses dados, não apresentou agrupamentos evidentes dos participantes, o que caracteriza uma distribuição qualitativa aleatória dos grupos bacterianos cultiváveis entre os diferentes hábitos alimentares avaliados.

Figura 9. Dendrograma mostrando agrupamento de similaridade das amostras de acordo com a presença/ausência de morfotipos. Foi utilizado o coeficiente de Dice de similaridade e o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).



A análise metagenômica dos grupos bacterianos por PCR em tempo real possibilitou a quantificação dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, da classe γ -Proteobacteria, e também do gênero *Lactobacillus* em relação ao grupo Universal, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Média da quantificação relativa pelo método de Pfaffl de grupos bacterianos em amostras fecais por PCR em tempo real.

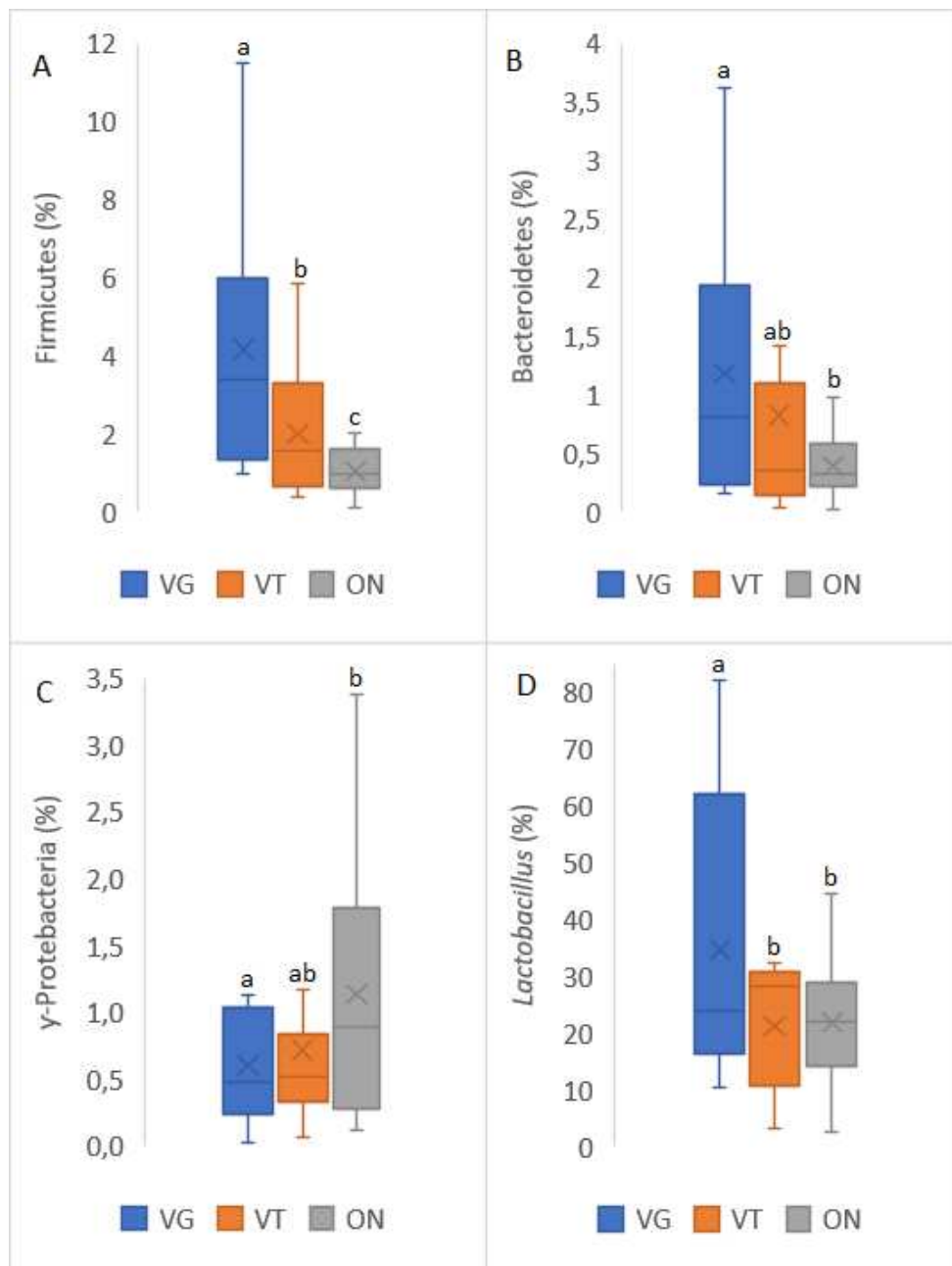
Grupo bacteriano	Média da quantificação relativa por PCR em tempo real (%)			$p < 0,05^*$
	VG	VT	ON	
Firmicutes	4,16	2,00	1,05	a, b, c
Bacteroidetes	1,18	0,82	0,39	c
γ -Proteobacteria	0,60	0,72	1,13	c
<i>Lactobacillus</i>	34,60	21,25	21,70	b, c

*Análise estatística significativa: a- comparação entre os valores dos voluntários ON e VT; b- comparação entre valores de voluntários VT e VG; c- comparação entre os valores de voluntários ON e VG.

A partir de análises dos dados demonstrados na Tabela 5 e nos gráficos da Figura 10, foi possível observar diferenças importantes na análise metagenômica entre os grupos VG, VT e ON com relação à composição da MIH. Observou-se um enriquecimento de bactérias Gram positivas do filo Firmicutes nos grupos de indivíduos vegetarianos, destacando-se o grupo VG, com relação ao grupo ON, sendo que os três grupos avaliados apresentaram diferença significativa entre si. O filo Bacteroidetes, composto por bactérias Gram negativas, exibe maior abundância no grupo VG, um enriquecimento intermediário em VT e menor em ON, sendo que o grupo VG diferiu estatisticamente do grupo ON. Com relação à classe γ -Proteobacteria, de bactérias Gram negativas, os indivíduos onívoros apresentaram maiores quantidades desses microrganismos, que diferiu estatisticamente do grupo VG, o qual exibiu um menor enriquecimento desse grupo. Os ovolactovegetarianos ocuparam uma posição intermediária em relação aos outros dois grupos avaliados, não diferindo estatisticamente dos mesmos. O grupo VG também se destacou quanto ao maior enriquecimento de bactérias Gram positivas do gênero *Lactobacillus*, apresentando diferença estatística significativa quando comparado aos grupos VT e ON. Por fim, a relação Firmicutes:Bacteroidetes do grupo de

indivíduos vegetarianos estritos foi de 3,52, de ovolactovegetarianos foi de 2,43 e de onívoros foi de 2,69.

Figura 10. Média da quantificação relativa pelo método de Pfaffl de grupos bacterianos em amostras fecais por PCR em tempo real. As letras a, b e c indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A – média da quantificação relativa de Firmicutes; B – média da quantificação relativa de Bacteroidetes; C – média da quantificação relativa de γ -Proteobacteria; ingestão média de fibras totais; D – média da quantificação relativa de *Lactobacillus*.



6 DISCUSSÃO

Dentre os mais diversos fatores que influenciam na composição da MIH, os hábitos alimentares são de extrema importância, já que a alimentação é responsável pelo fornecimento de substratos para proliferação de determinados microrganismos na MIH (GRAF et al., 2015).

Neste estudo, os participantes não apresentaram diferenças significativas em suas características antropométricas, sendo todos classificados como eutróficos em relação ao IMC calculado. Por ter sido um estudo realizado em um ambiente acadêmico, a grande maioria dos voluntários apresentou perfil universitário, em geral, de pessoas mais jovens, o que justifica a idade média relativamente baixa. Com relação à etnia, a maioria dos participantes se autodeclarou branca ou parda, não sendo possível determinar alguma influência das etnias nos resultados encontrados.

Foi possível, neste estudo, através da culturômica, obter uma visão geral qualitativa e quantitativa da composição da MIH, pela contagem e pela caracterização de morfotipos de microrganismos isolados nos meios de cultura seletivos. Na contagem geral de UFC, quando se observam as diferenças quantitativas obtidas no cultivo de bactérias Gram negativas em Ágar EMB (sugestivos da família *Enterobacteriaceae*), a culturômica se torna uma ferramenta válida para ser utilizada na avaliação da composição desses microrganismos na MIH, considerando que as mesmas diferenças quantitativas foram observadas quando se utilizou PCR em tempo real para esses microrganismos (classe γ -Proteobacteria, composta em sua maioria por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*).

Na análise de morfotipos, percebeu-se uma menor diversidade de microrganismos na MIH de indivíduos onívoros, que poderia estar relacionada ao baixo suprimento de substratos fermentáveis, aliado ao maior consumo de lipídeos, com consequente aumento na produção de ácidos biliares, os quais possuem propriedades bactericidas (BEGLEY, GAHAN e HILL, 2005; SALONEN e DE VOS, 2014). Ainda do ponto de vista qualitativo, ao se considerarem todos os morfotipos isolados do cultivo de amostras fecais dos participantes deste estudo, não foi possível um agrupamento por similaridade desses voluntários de acordo com a presença dos morfotipos, o que sugere que os diferentes hábitos alimentares, numa

visão geral, não seriam suficientes para gerar diferenças qualitativas na composição da MIH.

Entretanto, os tipos de alimentos e as formas como são consumidos parecem exercer uma importante relação com os morfotipos compartilhados pela MIH dos indivíduos deste estudo. Atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil, através do Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2014), recomenda, como base da alimentação de brasileiros, alimentos predominantemente vegetais, consumidos em sua forma natural ou minimamente processados. Como no Brasil existe uma legislação que dispõe sobre padrões microbiológicos em alimentos (BRASIL, 2019), os hábitos de higienização e a origem dos vegetais *in natura* ou minimamente processados se tornam também fatores associados aos tipos de microrganismos que chegam à MIH. Esses alimentos, então, contribuem como fornecedores de uma extensa variedade de micro e macronutrientes, principalmente as fibras, para a MIH, além de poderem servir como carreadores de microrganismos que chegam à MIH (ABADIAS et al., 2007). Portanto, ao considerarmos os efeitos que os hábitos alimentares exercem na modulação da MIH e que indivíduos vegetarianos estritos não consomem quaisquer alimentos de origem animal, pode-se sugerir que haja uma maior influência de alimentos *in natura* e minimamente processados, em sua grande maioria vegetais, na formação do *core* bacteriano compartilhado entre os diferentes hábitos alimentares analisados neste estudo.

É de suma importância considerar as informações alimentares, baseadas na ingestão real de macronutrientes, dos indivíduos participantes de estudos relacionados à MIH (RAMOS e MARTÍN, 2021). Alguns estudos relataram aumentados níveis de bactérias produtoras de butirato, a partir de quantificação em amostras fecais, do gene envolvido em uma das vias de produção de butirato – o gene butiril coenzima A: acetato coenzima A transferase (BUT) – em indivíduos vegetarianos, quando comparados a onívoros. Esses fatos têm sido estreitamente relacionados ao consumo elevado de carboidratos complexos e fibras por indivíduos que mantêm dietas vegetarianas (HIPPE, et al., 2011; SALONEN e DE VOS, 2014). Entretanto, um estudo conduzido por Kabeerdoss e colaboradores (2012) encontrou o gene BUT em quantidades mais elevadas em amostras fecais de mulheres onívoras quando comparado àquelas vegetarianas. Porém, nesse estudo, não foi considerado que a ingestão de carboidratos complexos e fibras foram menores entre as mulheres vegetarianas, em comparação às onívoras. Em outro estudo, De Filippis

e colaboradores (2016) também encontraram resultados semelhantes quando avaliaram indivíduos adeptos da dieta mediterrânea, que apesar de ser considerada uma dieta onívora, inclui alto consumo de cereais, vegetais, frutas e legumes. Os níveis de AGCCs em indivíduos que aderiram fortemente à dieta mediterrânea também se encontraram elevados.

Nesse contexto, a dieta onívora, principalmente, deve ser avaliada com olhar cauteloso, porque apresenta variações importantes entre seus indivíduos adeptos. Assim, Ramos e Martín, num estudo publicado em 2021, sugeriram ser pertinente avaliar as dietas em dois padrões – padrão ocidental e à base de plantas – para então relacioná-las à MIH. Portanto, as dietas de padrão ocidental seriam representadas em sua grande maioria pela dieta onívora adotada por grande parte dos habitantes dos países ocidentais, que é caracterizada pelo alto consumo de alimentos ultra processados, gorduras saturadas, proteína animal e açúcares e baixa ingestão de fibras e vegetais. Esse padrão de alimentação tem sido constantemente associado ao aumento da abundância de microrganismos bile-tolerantes que geram metabólitos prejudiciais, como ácidos biliares secundários e N-óxido de trimetilamina (TMAO), que vem da conversão de L-carnitina, presente em carnes vermelhas. Altos níveis de TMAO têm sido relacionados com um risco aumentado de aterosclerose e doenças cardiovasculares. Já as dietas a base de plantas, que incluem os vegetarianos e os adeptos da dieta Mediterrânea, têm sido relacionadas ao aumento da abundância de bactérias degradadoras de fibras e à síntese de AGCCs e de derivados de ácidos fenólicos, relacionados à melhoria da saúde em geral (RAMOS e MARTÍN, 2021; SALONEN e DE VOS, 2014). Portanto, a confiança apenas na caracterização geral de hábitos alimentares, sem considerar os consumos médios de macronutrientes em cada grupo, pode ser fator de confusão dentro dos estudos.

Considerando então a importância da determinação de ingestão média de macronutrientes, neste estudo, quando avaliada a ingestão de macronutrientes pelos voluntários, foram observadas diferenças relevantes, que provavelmente estão relacionadas às diferenças encontradas na composição da MIH desses indivíduos. O consumo de proteínas mais baixo em indivíduos que seguem uma dieta vegetariana estrita, quando comparados aos outros tipos de dieta, é um achado comum em diversos estudos, bem como o consumo mais elevado desse macronutriente por indivíduos onívoros. Os indivíduos ovolactovegetarianos ocupam uma posição em geral intermediária entre os outros dois grupos quanto à ingestão de proteínas

(ALLES et al., 2017; BAKALOU DI et al., 2021; SOBIECKI et al., 2016; WALDMANN et al., 2003), assim como observado no presente estudo. Além disso, hábitos alimentares vegetarianos, em geral, apresentam baixa ingestão de ácidos graxos e gorduras saturadas. Um consumo maior de lipídeos, geralmente, está associado a dietas onívoras. Neste estudo, o grupo de vegetarianos estritos apresentou menor ingestão de lipídeos, quando comparado aos grupos de ovolactovegetarianos e onívoros, o que poderia se dar pelo fato de que apenas no grupo VG quaisquer alimentos de origem animal são excluídos, já que estes alimentos, por exemplo ovos e carnes gordas, em geral, apresentam grande aporte de lipídeos em sua composição (LOSASSO et al., 2018; MOREIRA et al., 2012).

Nesse contexto, o elevado consumo de lipídeos e proteínas, associado ao baixo consumo de fibras, principalmente em dietas do tipo ocidental, tem sido relacionado ao aumento de bactérias tolerantes a bile na MIH, que incluem *Bacteroides*, *Clostridia* e membros da família *Enterobacteriaceae*, como linhagens de *E. coli* e *Klebsiella*, entre outras (BEGLEY, GAHAN e HILL, 2005; JAAGURA et al., 2021; KONEMAN et al., 2014; RAMOS e MARTÍN, 2021; TOMOVA et al., 2019). É importante ressaltar que a capacidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* de se desenvolverem em ambientes com concentrações maiores de bile é uma característica utilizada na produção de meios de cultura seletivos, que apresentam sais biliares em sua composição, como por exemplo o Ágar MacConkey, inibindo o crescimento de diversas bactérias Gram positivas (KONEMAN et al., 2014). Além disso, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que apresentam genes codificadores de serinoproteases e enzimas capazes de descarboxilar aminoácidos, podem utilizar proteínas em processos fermentativos, como fonte de carbono e energia. Essa característica também utilizada para identificação, junto a outros meios de cultura, de várias espécies dessa família, além de apresentarem atividade proteolítica como fator de virulência (AMARETTI et al., 2019; HOU et al., 2021; KONEMAN et al., 2014).

Portanto, o maior aporte de proteínas e lipídeos nas dietas dos voluntários dos grupos VT e ON, no presente estudo, poderia estar relacionado às contagens de UFC mais elevadas em meio EMB, bem como maior densidade de bactérias Gram negativas da classe γ -Proteobacteria, composta majoritariamente por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, em relação ao grupo de vegetarianos estritos. A presença em quantidades aumentadas de bactérias da

família *Enterobacteriaceae*, que devido às suas características estruturais estão associadas a atividades pró-inflamatórias na MIH, vem sendo associadas a doenças crônicas. Além disso, bactérias das espécies *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, todas pertencentes à classe γ -Proteobacteria, estão associadas à produção de nitrosaminas, produtos obtidos a partir das aminas formadas pela descarboxilação de aminoácidos, que estão ligadas a ação cancerígena (SCOTT et al., 2013; SUZUKI e MITSUOKA, 1984).

As dietas ricas em lipídeos também têm sido consideradas como um dos fatores responsáveis pelo aumento de LPS na circulação sanguínea. Um dos motivos pode estar relacionado à estrutura molecular dos LPS, que podem ser incorporados às micelas, sendo então absorvidos. Esses macronutrientes também estão associados à redução de níveis de microrganismos considerados benéficos, como, por exemplo, as bactérias do gênero *Bifidobacterium*, que auxiliam na manutenção da estabilidade da barreira intestinal, reduzindo, então, o processo de endotoxemia (GHOSHAL et al., 2009; MOREIRA et al., 2012).

O consumo elevado de proteínas, principalmente de origem animal, também tem sido relacionado ao aumento da abundância de bactérias Gram positivas do gênero *Enterococcus*, enquanto que dietas enriquecidas com fibras tem mostrado efeito contrário sobre esses microrganismos (KOSTOVCIKOVA et al., 2019; SAKKAS et al., 2020), assim como observado neste estudo, quando se avaliou o crescimento de microrganismos em Ágar BEA. Além disso, a maioria das linhagens de *E. faecalis* – espécie mais abundante desse gênero na MIH – e algumas de *E. faecium* são capazes de produzir íons superóxido extracelulares e espécies reativas de oxigênio, que podem danificar o DNA de células do cólon (HUYCKE, ABRAMS e MOORE, 2002; KONEMAN et al., 2014). O gênero *Enterococcus* também foi associado à exacerbação de processos inflamatórios em indivíduos com DII, e em modelos animais que apresentavam colite, cujos efeitos inflamatórios foram intensificados após administração de dietas ricas em proteínas de origem animal (KOSTOVCIKOVA et al., 2019). Considerando então que microrganismos do gênero *Enterococcus* exibem capacidade de crescer em meios de cultura seletivos contendo bile em sua composição, como, por exemplo, Ágar BEA, e que esses microrganismos são frequentemente isolados de material biliar de pacientes com colangite e coledocolítase (BEGLEY, GAHAN e HILL, 2005; FLORES et al., 2005; KONEMAN et al., 2014), pode-se sugerir que haja uma possível correlação entre o

enriquecimento de *Enterococcus* e sua capacidade de tolerar ambientes com maiores concentrações de bile, como acontece em dietas ricas em proteínas de origem animal e lipídeos.

Atualmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos de diversas classes tem sido alvo de intensa preocupação. Microrganismos Gram negativos da família *Enterobacteriaceae* e Gram positivos dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* representam grupos de bactérias de elevada importância clínica a respeito da resistência aos antimicrobianos (HOLMES et al., 2016; WHO, 2014). Nesse sentido, em um estudo recente, Da Silva e colaboradores (2021) avaliaram qualitativamente a presença de genes de resistência a antimicrobianos utilizando as mesmas amostras fecais dos indivíduos do presente estudo. Os resultados mostraram a ampla distribuição desses genes nas amostras analisadas, sem agrupamentos por similaridade, sugerindo que hábitos alimentares diferentes não são suficientemente capazes de promover diferenças na distribuição desses genes, já que os mesmos se encontram disseminados pelo ambiente, chegando à MIH por outras vias, como, por exemplo, a água (DA SILVA et al., 2021; REGINA et al., 2021). Portanto, considerando que, quantitativamente, neste estudo, bactérias Gram positivas sugestivas de *Enterococcus* e a classe γ -Proteobacteria, a qual abriga a família *Enterobacteriaceae*, foram menos abundantes em indivíduos do grupo VG, é possível que a MIH desse grupo de indivíduos seja composta por uma menor densidade de bactérias que apresentem mecanismos de resistência aos antimicrobianos, em comparação aos demais grupos estudados.

O consumo de carboidratos e fibras elevado, em geral, é associado a dietas vegetarianas, podendo-se destacar os vegetarianos estritos como os grandes protagonistas nesse cenário, o que corrobora os achados com relação a esses macronutrientes neste estudo. Em geral, indivíduos vegetarianos estritos mantêm uma dieta mais diversificada, que inclui vegetais, sementes, oleaginosas, leguminosas, e outras fontes de carboidratos (CLARYS et al., 2013; RIZZO et al., 2013). Um consumo mais elevado de carboidratos e fibras por indivíduos vegetarianos tem sido relacionado a menor densidade de microrganismos Gram negativos do filo Proteobacteria na MIH, quando comparados a onívoros. Portanto, a menor contagem de UFC de bactérias Gram negativas, sugestivas da família *Enterobacteriaceae*, e a menor abundância dos microrganismos da classe γ -Proteobacteria, no grupo VG, encontrados neste estudo, apresentam uma relação

inversamente proporcional ao consumo de fibras e carboidratos complexos, muito provavelmente pela redução do pH no ambiente intestinal pela produção de AGCCs, como relatado também por Sakkas e colaboradores (2020), Simpson e Campbell (2015) e Zimmer e colaboradores (2012). É importante lembrar que as dietas ricas em fibras têm sido constantemente associadas ao aumento de microrganismos considerados benéficos na MIH, e redução de bactérias produtoras de endotoxinas, que estão relacionadas a muitas doenças crônicas (DE FILIPPO et al., 2010; SALONEN e DE VOS, 2014; WU et al., 2011).

A digestão de carboidratos complexos necessita da contribuição de variadas enzimas. Estudos têm demonstrado que muitas bactérias Gram positivas pertencentes ao filo Firmicutes e Gram negativas do filo Bacteroidetes apresentam intensa atividade sacarolítica na MIH, exibindo grande quantidade de genes codificadores dessas enzimas em seus genomas, sendo consideradas degradadoras primárias de carboidratos complexos na MIH, junto com o gênero *Bifidobacterium* (KAOUTARI et al., 2013). Esses dois filios, portanto, também exibem alterações em sua abundância de acordo com diferentes tipos de hábitos alimentares. O filo Firmicutes abriga diversos gêneros e espécies de bactérias positivamente associadas ao consumo de fibras e carboidratos complexos e a benefícios à saúde, como por exemplo, produção de AGCCs por *Roseburia*, *Ruminococcus* e *Faecalium prausnitzii*, embora também contenha microrganismos que são associados a dietas tipicamente ocidentalizadas, como os do gênero *Enterococcus* e os da classe Clostridia (KORPELA, 2018). O gênero *Lactobacillus*, também pertencente a esse filo, vem sendo associado a efeitos benéficos na MIH, e tem sido positivamente correlacionado a dietas ricas em vegetais e fibras, e negativamente à alta ingestão de gorduras saturadas. Esse gênero tem exibido estreita relação com a ingestão de carboidratos complexos, como frutoligossacarídeos e galactoligossacarídeos, e de proteínas de origem vegetal, muito presentes em dietas vegetarianas estritas, como demonstrado no presente estudo, sendo considerados importantes microrganismos probióticos da MIH (RAMOS e MARTÍN, 2020).

O enriquecimento de Bacteroidetes em indivíduos vegetarianos, em comparação a onívoros, já foi também observado em outros estudos, como o de Franco-de-Moraes e colaboradores (2017) e o de Losasso e colaboradores (2018), que associaram esse filo a menor consumo de proteína animal. Além disso, um estudo de Do e colaboradores (2018), mostrou que dietas tipicamente

ocidentalizadas também estão associadas à redução da abundância de Bacteroidetes e aumento de Proteobacteria na microbiota intestinal de camundongos. Portanto, o filo Bacteroidetes tem mostrado relação estreita com o consumo de carboidratos e fibras, sendo, na maioria dos casos, relacionado a efeitos benéficos na MIH, embora apresente alguns gêneros e espécies com potencial efeito patogênico e pró-inflamatório, e também possuam LPS em sua parede celular, cujo efeito inflamatório é considerado muito inferior aos de Proteobacteria (AMABEBE et al., 2020; VATANEN et al., 2017).

Nesse contexto, ao serem associados ao maior consumo de carboidratos complexos e à menor ingestão de proteínas de origem animal, os indivíduos que mantêm uma dieta vegetariana estrita tendem a exibir um maior enriquecimento de microrganismos dos filios Firmicutes e Bacteroidetes, quando comparados àqueles que ingerem proteínas de origem animal. No presente estudo, os indivíduos do grupo VT também ocupam uma posição intermediária tanto no consumo de fibras e carboidratos, quanto de proteínas em geral, o que poderia justificar a abundância intermediária desses dois filios, quando comparados aos outros dois grupos de participantes.

O enriquecimento dos filios Firmicutes e Bacteroidetes em vegetarianos estritos reflete em um aumento da relação Firmicutes:Bacteroidetes (em média 1,3x) em relação aos outros dois grupos avaliados neste estudo. A relação Firmicutes:Bacteroidetes aumentada têm sido alvo de diferentes estudos, que relatam associação desse aumento a doenças como obesidade e DII, ou a fatores como idade e consumo de carboidratos complexos (DUNCAN et al., 2008; LEY et al., 2005; MARIAT et al., 2009; PATIL et al., 2012; STOJANOV, BERLEC & ŠTRUKELJ, 2020). No presente estudo, como todos os participantes foram classificados como eutróficos de acordo com o IMC, a relação Firmicutes:Bacteroidetes aumentada em indivíduos do grupo de vegetarianos estritos pode estar relacionada ao maior consumo, por esse grupo de participantes, de carboidratos e fibras, com ação prebiótica sobre a MIH desses indivíduos, já que o aumento da abundância do filo Firmicutes na MIH tem sido associado à sua grande capacidade sacarolítica, se destacando como os principais degradadores de carboidratos complexos na MIH (KAOUTARI et al., 2013; LEITCH et al., 2007).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os hábitos alimentares são fatores de elevada importância no que se refere à modulação da estrutura e composição microbiana no ambiente intestinal humano. As diferenças nos consumos de macronutrientes, bem como nos tipos e formas dos alimentos ingeridos, exercem grande responsabilidade sobre a abundância dos microrganismos na MIH, embora diversos outros fatores também possam influenciar na composição desta microbiota. Por isso, a preocupação em aplicar critérios de inclusão específicos e restritivos, neste estudo, a fim de tentar minimizar o impacto de outros fatores nesse contexto. Além disso, é importante considerar que as informações coletadas via QQFA, neste estudo, dependeram do recordatório alimentar dos participantes, tanto dos tipos de alimentos consumidos, quanto das quantidades aproximadas. Portanto, as informações fornecidas pelos participantes poderiam representar também um possível viés neste estudo.

É importante ressaltar que mais análises sobre a composição da MIH dos indivíduos desse estudo devem ser realizadas, a fim de obter mais informações sobre grupos bacterianos que se destacam de acordo com cada hábito alimentar estudado. Outros grupos de microrganismos, como os filos Verrucomicrobia e Actinobacteria, o grupo de arqueias e também alguns gêneros e espécies de bactérias, ainda serão analisados de forma quantitativa via PCR em tempo real, a fim de complementar os resultados já existentes e auxiliar na elucidação das diferenças nas microbiotas intestinais dos indivíduos participantes deste estudo.

8 CONCLUSÕES

- A dieta de indivíduos vegetarianos estritos exibe maior consumo de carboidratos e fibras e menor consumo de proteínas e lipídeos, quando comparada à dieta de ovolactovegetarianos e onívoros, considerando apenas indivíduos eutróficos;
- O consumo de macronutrientes e a MIH de indivíduos que seguem a dieta ovolactovegetariana tendem a se assemelhar muito mais aos de indivíduos onívoros do que àqueles que excluem todos os tipos de alimentos de origem animal de sua dieta;
- Os indivíduos onívoros apresentam, de um modo geral, menor diversidade bacteriana em sua microbiota intestinal, quando comparados aos participantes dos grupos VT e VG;
- Os alimentos vegetais *in natura* ou minimamente processados parecem ser os elementos centrais da dieta na contribuição da formação do *core* bacteriano compartilhado pelos indivíduos que seguem diferentes hábitos alimentares;
- O enriquecimento de bactérias potencialmente patogênicas na MIH, como aquelas pertencentes à classe γ -Proteobacteria e ao gênero *Enterococcus*, parece estar relacionado à ingestão média diária maior de proteínas de origem animal e de lipídeos, enquanto que o maior enriquecimento dos filos Firmicutes e Bacteroidetes e do gênero *Lactobacillus* parece se relacionar à ingestão média diária maior de carboidratos e fibras.

REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M. et al. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1–2, p. 151–158, 2008.
- ALLES, B. et al. Comparison of sociodemographic and nutritional characteristics between self-reported vegetarians, vegans, and meat-eaters from the NutriNet-Santé Study. **Nutrients**, v. 9, n. 1023, p. 1-18, 2017.
- AMABEBE, E. et al. Microbial dysbiosis-induced obesity: Role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1127–1137, 2020.
- AMARETTI, A. et al. Profiling of Protein Degraders in Cultures of Human Gut Microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–13, 2019.
- AMRANE, S.; RAOULT, D.; LAGIER, J. C. Metagenomics, culturomics, and the human gut microbiota. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 5, p. 373–375, 2018.
- ANGELAKIS, E. et al. Glycans affect DNA extraction and induce substantial differences in gut metagenomic studies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–8, 2016.
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VEGANISMO. Veganismo, 2021. O que é o veganismo?. Disponível em: <https://veganismo.org.br/veganismo/>. Acesso em 25 Jun. 2021.
- BAKALOUDI, D. R. et al. Intake and adequacy of the vegan diet. A systematic review of the evidence. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 3503–3521, 2021.
- BAUMGART, M. et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. **ISME Journal**, v. 1, n. 5, p. 403–418, 2007.
- BAXTER, N. T. et al. Dynamics of human gut microbiota and short-chain fatty acids in response to dietary interventions with three fermentable fibers. **mBio**, v. 10, n. 1, 2019.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625–651, 2005.
- BEEZHOLD, B. et al. Vegans report less stress and anxiety than omnivores. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia Alimentar para a População Brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de dezembro de 2019.

BRESTOFF, J.; ARTIS, D. Population genetic tools to dissect innate immunity in humans. **Nat Immunol**, v. 14, n. 7, p. 676–684, 2013.

BUNDGAARD-NIELSEN, C. et al. Gut microbiota profiles of autism spectrum disorder and attention deficit/hyperactivity disorder: A systematic literature review. **Gut Microbes**, v. 11, n. 5, p. 1172–1187, 2020.

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

CANI, P. D. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. **Gut**, v. 67, n. 9, p. 1716–1725, 2018.

CARDOSO, M. A.; STOCCO, P. R. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 107–114, 2000.

CHASSARD, C.; LACROIX, C. Carbohydrates and the human gut microbiota. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 4, p. 453–460, 2013.

CLARYS, P. et al. Dietary pattern analysis: A comparison between matched vegetarian and omnivorous subjects. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, p. 9–14, 2013.

COLLADO, M. C. et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

COLOTTI, G.; RINALDI, T. The central role of gut microbiota in drug metabolism and personalized medicine. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1197–1200, 2020.

COSTEA, P. I. et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 8–16, 2017.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 585–588, 2013.

CROVESY, L.; MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 9, p. 1251–1262, 2020.

DA SILVA, S. F. et al. Influence of human eating habits on antimicrobial resistance phenomenon: Aspects of clinical resistome of gut microbiota in omnivores, ovolactovegetarians, and strict vegetarians. **Antibiotics**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2021.

DE ANGELIS, M. et al. Diet influences the functions of the human intestinal microbiome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

DE FILIPPIS, F. et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1–10, 2016.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.

DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 351–356, 2011.

DESAI, M. S. et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339–1353, 2017.

DHAR, D.; MOHANTY, A. Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications. **Virus Research**, v. 285, p. 198018, 2020.

[ONÍVORO]. In: DICIO, Dicionário Online de Português. Porto: 7Graus, 2018. Disponível em: <https://www.dicio.com.br/onivoro/>. Acesso em: 25/06/2021.

DING, R. et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 3, p. 623–631, 2019.

DO, M. H. et al. High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. **Nutrients**, v. 10, n. 6, 2018.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11971–11975, 2010.

DUBOURG, G. et al. The gut microbiota of a patient with resistant tuberculosis is more comprehensively studied by culturomics than by metagenomics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, p. 637–645, 2013.

DUBOURG, G. et al. Culturomics and pyrosequencing evidence of the reduction in gut microbiota diversity in patients with broad-spectrum antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 2, p. 117–124, 2014.

DUNCAN, S. H. et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **Internacional Journal of Obesity**, p. 1720–1724, 2008.

FLORES, C. et al. Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary hospital. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 18, n. 3, p. 333–336, 2003.

FRANCO-DE-MORAES, A. C. et al. Worse inflammatory profile in omnivores than in vegetarians associates with the gut microbiota composition. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2017.

GAO, R. et al. Gut microbiota and colorectal cancer. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 757–769, 2017.

GEVERS, D. et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 3, p. 382–392, 2015.

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

GOSSLING, J.; SLACK, J. M. Predominant Gram-positive bacteria in human feces: numbers, variety, and persistence. **Infection and immunity**, v. 9, n. 4, p. 719–729, 1974.

GRAF, D. et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, p. 26164, 2015.

GUO, M. et al. Developmental differences in the intestinal microbiota of Chinese 1 year old infants and 4 year old children. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

GUO, X. et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 367–373, 2008.

HE, Z. et al. Alterations of the gut microbiome in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2016.

HEVIA, A. et al. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–10, 2014.

HIPPE, B. et al. Quantification of butyryl CoA:acetateCoA transferase genes reveals different butyrate production capacity in individuals according to diet and age. **FEMS Microbiology Letters**, v. 316, p. 130–135, 2011.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016.

HOU, J. J. et al. The relationship between gut microbiota and proteolytic activity in irritable bowel syndrome. **Microbial Pathogenesis**, v. 157, p. 104995, 2021.

HUANG, T. et al. Cardiovascular disease mortality and cancer incidence in vegetarians: A meta-analysis and systematic review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 233–240, 2012.

HUGON, P. et al. Molecular studies neglect apparently gram-negative populations in the human gut microbiota. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3286–3293, 2013.

HUYCKE, M. M.; ABRAMS, V.; MOORE, D. R. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 3, p. 529–536, 2002.

JAAGURA, M. et al. Low-carbohydrate high-fat weight reduction diet induces changes in human gut microbiota. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2021.

JANSSENS, Y. et al. Disbiome database: Linking the microbiome to disease. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 4–9, 2018.

KABEERDOSS, J. et al. Faecal microbiota composition in vegetarians: Comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 6, p. 953–957, 2012.

KAOUTARI, A. E. et al. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 497–504, 2013.

KHOSRAVI, A.; MAZMANIAN, S. K. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 221–227, 2013.

KIM, H. et al. Plant-based diets, pescatarian diets and COVID-19 severity: A population-based case-control study in six countries. **BMJ Nutrition, Prevention and Health**, v. 4, n. 1, p. 257–266, 2021.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KORPELA, K. Diet, microbiota, and metabolic health: Trade-off between saccharolytic and proteolytic fermentation. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 65–84, 2018.

KOSTOVCIKOVA, K. et al. Diet rich in animal protein promotes pro-inflammatory macrophage response and exacerbates colitis in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–14, 2019.

LAGIER, J. C. et al. Microbial culturomics: Paradigm shift in the human gut microbiome study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 12, p. 1185–1193, 2012.

LAGIER, J. C. et al. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 237–264, 2015.

LAGIER, J. C. et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 16203, 2016.

LAGIER, J. C. et al. Culturing the human microbiota and culturomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 540–550, 2018.

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

LEE, C. J.; SEARS, C. L.; MARUTHUR, N. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1461, n. 1, p. 37–52, 2020.

LEITCH, E. C. M. W. et al. Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 667–679, 2007.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.

LI, H.; HE, J.; JIA, W. The influence of gut microbiota on drug metabolism and toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 31–40, 2016.

LIU, X. et al. Role of the gut microbiome in modulating arthritis progression in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–11, 2016.

LOSASSO, C. et al. Assessing the influence of vegan, vegetarian and omnivore oriented Westernized dietary styles on human gut microbiota: a cross sectional study. **Front. Microbiol.** v. 9, p. 317, 2018.

MACCAFERRI, S.; BIAGI, E.; BRIGIDI, P. Metagenomics: Key to human gut microbiota. **Digestive Diseases**, v. 29, n. 6, p. 525–530, 2011.

MAGNE, F. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.

MAILHE, M. et al. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.

MARIAT, D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–6, 2009.

MILANI, C. et al. The first microbial colonizers of the human gut: Composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1–67, 2017.

MOREIRA, A. P. B. et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801–809, 2012.

NEDER, R.N. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo, Nobel, 1992.

NI, J. et al. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573–584, 2017.

NISHIDA, A. et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

O'SULLIVAN, A.; FARVER, M.; SMILOWITZ, J. T. The Influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 8, p. 1–9, 2015.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153–162, 2004.

PATTERSON, E. E. et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1087, p. 286–300, 2016.

PATIL, D. et al. Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 4, p. 647–657, 2012.

PEREIRA, A. C.; CUNHA, M. V. An effective culturomics approach to study the gut microbiota of mammals. **Research in Microbiology**, v. 171, n. 8, p. 290–300, 2020.

PFLEIDERER, A. et al. Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1471–1481, 2013.

PICCHIANTI-DIAMANTI, A. et al. Analysis of gut microbiota in rheumatoid arthritis patients: Disease-related dysbiosis and modifications induced by etanercept. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018.

RAMOS, S.; MARTÍN, M. A. Impact of diet on gut microbiota. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 83–90, 2021.

REGINA, A. L. A. et al. A watershed impacted by anthropogenic activities: Microbial community alterations and reservoir of antimicrobial resistance genes. **Science of The Total Environment**, v. 793, p. 148552, 2021.

REHMAN, A. et al. Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 238–248, 2016. SERINO

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

RIZZO, N. S. et al. Nutrient profiles of vegetarian and nonvegetarian dietary patterns. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 113, n. 12, p. 1610–1619, 2013.

SAKKAS, H. et al. Nutritional status and the influence of the vegan diet on the gut microbiota and human health. **Medicina**, v. 56, n. 88, p. 1–15, 2020.

SALES, R. L.; COSTA, N. M. B.; SILVA, M. M. S. Avaliando o consumo alimentar por fotos. Universidade Federal de Viçosa, p. 1-40, 2004.

SALONEN, A.; DE VOS, W. M. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 239–262, 2014.

SCOTT, K. P. et al. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 52–60, 2013.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS Biology**, v. 14, n. 8, p. 1–21, 2016.

SERINO, M. Molecular paths linking metabolic diseases, gut microbiota dysbiosis and Enterobacteria infections. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 5, p. 581–590, 2018.

SHEFLIN, A. M. et al. Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 113–129, 2017.

SHI, N. et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. **Military Medical Research**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2017.

SIMPSON, H. L.; CAMPBELL, B. J. Dietary fibre-microbiota interactions. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 2, p. 158–179, 2015.

SOBIECKI, J. G. et al. High compliance with dietary recommendations in a cohort of meat eaters, fish eaters, vegetarians, and vegans: Results from the European prospective investigation into Cancer and Nutrition-Oxford study. **Nutrition Research**, v. 36, n. 5, p. 464–477, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE VEGETARIANISMO. SBV, 2021. Vegetarianismo. Disponível em: <https://www.svb.org.br/vegetarianismo1/o-que-e>. Acesso em 25 Jun. 2021.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 2007.

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**, v. 8, n. 11, p. 1–16, 2020.

SUZUKI, K.; MITSUOKA, T. N-nitrosamine formation by intestinal bacteria. **IARC Scientific Publications**, v. 57, p. 275–281, 1984.

THE VEGAN SOCIETY. Vegan Society, 2021. Definition of veganism. Disponível em: <https://www.vegansociety.com/go-vegan/definition-veganism>. Acesso em 25 Jun. 2021.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Microbiota and diabetes: An evolving relationship. **Gut**, v. 63, n. 9, p. 1513–1521, 2014.

TOMOVA, A. et al. The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. 47, 2019.

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

VAN HOUTE, J.; GIBBONS, R. J. Studies of the cultivable flora of normal human feces. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 32, n. 1, p. 212–222, 1966.

VASCELLARI, S. et al. Clinical phenotypes of Parkinson's disease associate with distinct gut microbiota and metabolome enterotypes. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2021.

VATANEN, T. et al. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 842–853, 2017.

VINOLO, M. A. R. et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858–876, 2011.

VOREADES, N.; KOZIL, A.; WEIR, T. L. Diet and the development of the human intestinal microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 494, p. 1–9, 2014.

WALDMANN, A. et al. Dietary intakes and lifestyle factors of a vegan population in Germany: Results from the German vegan study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 947–955, 2003.

WANG, F. et al. Effects of vegetarian diets on blood lipids: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 10, 2015.

WANG, J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55–60, 2012.

WHO, World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014.

WHO, World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. (WHO Technical Report Series n. 894). Geneva, Switzerland: WHO, 2000.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–109, 2011.

XIONG, J. et al. Development of gut microbiota along with its metabolites of preschool children. **BMC Pediatrics**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2022.

YEOH, Y. K. et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. **Gut**, v. 70, n. 4, p. 698–706, 2021.

YOO, J. Y. et al. Gut microbiota and immune system interactions. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1–22, 2020.

ZHANG, C. et al. Impact of a 3-months vegetarian diet on the gut microbiota and immune repertoire. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 908, p. 1–13, 2018.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 895–905, 2015.

ZHU, Q. et al. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 34, n. 3, p. 1285–1300, 2013.

ZIMMER, J. et al. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 53–60, 2012.

ZUO, T. et al. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. **Gastroenterology**, v. 159, n. 3, p. 944–955., 2020.



ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação entre dieta e microbiota: diversidade microbiana intestinal em indivíduos com diferentes hábitos alimentares

Pesquisador: Cláudio Galuppo Diniz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65841617.5.0000.5147

Instituição Proponente: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.046.122

Apresentação do Projeto:

Este será um estudo transversal onde serão convidados adultos saudáveis não obesos com diferentes hábitos alimentares baseados em diferentes tipos de dieta (veganismo, vegetarianismo, ovo-lacto-vegetarianismo e onivorismo). Os participantes serão recrutados na comunidade de Juiz de Fora, MG, após contato prévio com grupos de interesse e afinidade, utilizando-se as redes sociais. Apresentação do projeto esta clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar características sócio-demográficas, antropométricas, nutricionais e a diversidade bacteriana, seu perfil funcional e metabólico na microbiota intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares (veganismo, vegetarianismo, ovo-lacto-vegetarianismo e onivorismo). O Objetivo da pesquisa está bem delineado, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo é classificado como de risco mínimo, isto é, o procedimento não acarretará riscos para

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br



os participantes, maiores do que aqueles aos quais eles estariam expostos na sua rotina do dia-a-dia. Eventuais desconfortos físicos ou emocionais serão minimizados, uma vez que os dados antropométricos e demais informações serão obtidas durante consulta individual no domicílio do participante, com nutricionista experiente ou acadêmico de nutrição e o espécime clínico fecal será coletado no domicílio do participante. Acredita-se que este projeto possa contribuir, de maneira geral, para dimensionar a distribuição diferencial bacteriana na microbiota residente intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares, seu papel no ecossistema pela determinação dos perfis funcionais e metabólicos. Esses conhecimentos, de caráter regional, poderiam contribuir para suscitar discussões sobre o envolvimento destas variáveis na etiologia multifatorial de doenças associadas ao desequilíbrio da microbiota residente intestinal e suas comorbidades. Além disso, os resultados deste projeto podem gerar indicadores que poderiam ser usados para prever condições de saúde através do levantamento dos dados de alterações fisiológicas e moleculares relacionadas à fisiologia microbiana no ecossistema intestinal e resposta do hospedeiro a esses microrganismos, correlações entre fatores do comportamento que possam modular estas variáveis, como perfil nutricional; ainda, possibilitar a consolidação da equipe multidisciplinar envolvida no estudo. Identificação dos riscos e as possibilidades de desconfortos e benefícios esperados, estão adequadamente descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios estão de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, itens III; III.2 e V.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N	
Bairro: SAO PEDRO	CEP: 36.036-900
UF: MG	Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788	Fax: (32)1102-3788
	E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br



desconfortos esperados, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens: IV letra b; IV.3 letras a,b,d,e,f,g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. Apresenta o INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS de forma pertinente aos objetivos delineados e preserva os participantes da pesquisa. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido nas Resoluções CNS 466/12; 441/12; com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS e com a Portaria 2.201/12. Data prevista para o término da pesquisa: Outubro de 2020.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas nas Resoluções CNS 466/12; 441/12; com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS e com a Portaria 2.201/12, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_882807.pdf	03/05/2017 16:31:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Modelo_CEP_2017_plataforma_Brasil.doc	03/05/2017 16:30:57	Cláudio Galuppo Diniz	Aceito
Declaração de	declaracao_para_biorrepositorio.pdf	16/03/2017	Cláudio Galuppo	Aceito

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

Instituição e Infraestrutura	declaracao_para_biorrepositorio.pdf	21:52:05	Diniz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_infraestrutura.pdf	16/03/2017 16:55:29	Cláudio Galuppo Diniz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorrepositorio.doc	16/03/2017 16:54:59	Cláudio Galuppo Diniz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	16/03/2017 16:52:35	Cláudio Galuppo Diniz	Aceito
Outros	Intrumentos.doc	16/03/2017 16:46:49	Cláudio Galuppo Diniz	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	16/03/2017 16:41:26	Cláudio Galuppo Diniz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 04 de Maio de 2017

Assinado por:
Lainer Augusta da Cunha Serrano
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N**Bairro:** SAO PEDRO**CEP:** 36.036-900**UF:** MG**Município:** JUIZ DE FORA**Telefone:** (32)2102-3788**Fax:** (32)1102-3788**E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “CORRELAÇÃO ENTRE DIETA E MICROBIOTA: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES”.

Nesta pesquisa pretendemos avaliar a diversidade bacteriana, seu perfil funcional e metabólico, e parâmetros imunológicos de indivíduos que seguem dieta onívora, ovolactovegetariana ou vegana.

Estudos revelam que hábitos alimentares saudáveis podem contribuir para modular, de modo benéfico, as reações entre a microbiota entérica e o hospedeiro, estabelecendo um caminho efetivo na prevenção de várias doenças, tais como doenças cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicas e endócrinas.

Acredita-se que esta pesquisa possa contribuir para dimensionar a distribuição bacteriana na microbiota residente intestinal de indivíduos com diferentes hábitos alimentares, seu papel no ecossistema pela determinação dos perfis funcionais e metabólicos, e aspectos da resposta imunológica sistêmica nestes indivíduos.

Para este estudo estão sendo convidados adultos com dieta alimentar onívora, ovolactovegetariana ou vegana, seguida por no mínimo um ano. Os fatores de exclusão do estudo incluem gestação, lactação, diabetes, hipertensão, doença cardíaca, idade inferior a 18 anos, idade superior a 65 anos e obesidade, dieta alimentar seguida há menos de um ano, doenças renais e/ou outras doenças crônicas. Os participantes responderão a um questionário de dados clínicos, epidemiológicos, um formulário para avaliação do estilo de vida e serão submetidos à avaliação antropométrica (peso, altura, Índice de Massa Corporal, circunferência da cintura, circunferência abdominal e percentual de gordura corporal), avaliação nutricional (pela informação da frequência alimentar média do consumo habitual relativa aos últimos seis meses) e coleta de espécimes clínicos (fezes).

- Considerando-se os riscos envolvendo pesquisas com seres humanos, de acordo com o preconizado pela legislação vigente (resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), o estudo é classificado como de risco mínimo, isto é, o procedimento não acarretará riscos para os participantes, maiores do que aqueles aos quais eles estariam expostos na sua rotina.
- Eventuais desconfortos físicos ou emocionais serão minimizados, uma vez que os dados antropométricos serão obtidos em sala adequada e os espécimes clínicos serão coletados em domicílio (fezes no coletor fornecido), de acordo com um guia de coleta de fezes fornecido pelo pesquisador e sua equipe.
- Para participar deste estudo o Sr(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

- Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão e o(a) Sr(a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, Setor de Microbiologia e a outra será fornecida ao senhor(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5(cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “*CORRELAÇÃO ENTRE DIETA E MICROBIOTA: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES*”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20__.

Nome	Assinatura participante	Data

Nome	Assinatura pesquisador	Data

Nome	Assinatura testemunha	Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
CEP: 36036-900
FONE: (32) 2102-3788/ E-MAIL: cep.propesq@ufjf.edu.br

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. CLÁUDIO GALUPPO DINIZ
DEPTP. PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
RUA LOURENÇO KELMER, S/N – CAMPUS UNIVERSITÁRIO
BAIRRO SÃO PEDRO – CEP: 36036-330 – JUIZ DE FORA, MG

E-MAIL: claudio.diniz@ufjf.edu.br

**ANEXO C - QUESTIONÁRIO QUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QQFA)
ADAPTADO**

PROJETO DE PESQUISA: CORRELAÇÃO ENTRE DIETA E MICROBIOTA: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES.

FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

Participante N° | | | | | Data: ____/____/____

Nome: _____ Idade (anos): _____

e-mail: _____ Telefones: _____

1. Estado civil: [] solteiro(a) [] casado(a) [] outro
2. Cor: [] branca [] preta [] parda [] amarela [] outra
3. Dieta: [] vegana [] ovo-lacto vegetariana [] onívora Tempo que segue esta dieta: _____
4. Você tem ou já teve algum acompanhamento profissional em relação à sua dieta: [] sim [] não
Que tipo: _____
5. Utiliza alimentos orgânicos: [] sim [] não Tempo que consome orgânicos: _____
6. Utiliza adoçantes: [] sim [] não Tempo que usa: _____ Usa qual(is) principalmente: _____
7. Nível de escolaridade: _____
8. Ocupação profissional: _____

9. Vida sexual ativa: [] não [] sim - Parceiros [] 01 [] mais de 01

10. Renda familiar? [] 1 a 3 salários [] 4 a 6 salários [] 7 a 9 salários [] acima de 10 **salários mínimos**

Número de pessoas que vivem desta renda: _____

11. Antibióticos nos últimos 30 dias:

Antifúngico [] sim [] não Antibacteriano [] sim [] não Antiprotozoário [] sim [] não

12. Medicamentos suplementares:

Insulina: [] sim [] não

Hipoglicemiante oral: [] sim [] não

Anti-hipertensivo: [] sim [] não

Antidepressivo: [] sim [] não

Dislipidêmicos: [] sim [] não

Outros: _____

13. Utiliza suplementos alimentares (polivitamínicos, ferro, B12, D, C): [] sim [] não

Descrever: _____

14. Utiliza probióticos e/ou prebióticos: [] sim [] não

Descrever: _____

15. Apresenta alguma patologia:

Diabetes: [] sim [] não [] não sabe

Doenças cardíacas: [] sim [] não [] não sabe

Hipertensão: [] sim [] não [] não sabe

Doenças renais: [] sim [] não [] não sabe

Doenças hepáticas: [] sim [] não [] não sabe

Depressão: [] sim [] não [] não sabe

Doenças na tireóide: [] sim [] não [] não sabe

Imunossupressão: [] sim [] não [] não sabe

Soropositivo(a) para HIV: [] sim [] não [] não sabe

Outra(s): _____

PROJETO DE PESQUISA: CORRELAÇÃO ENTRE DIETA E MICROBIOTA: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES.

QUESTIONÁRIO QUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Nome: _____ Idade (anos): _____ Participante N° | | | |

Prezado participante, informe a frequência média de consumo habitual (diária, semanal ou mensal) relativa aos últimos seis meses e o tamanho da porção ingerida. Para ajudá-lo na estimativa das porções há um álbum fotográfico elaborado por VANNUCCHI et al., 2007.

ATENÇÃO: Não altere sua rotina alimentar! A autenticidade da sua informação é fundamental. Seus registros serão mantidos em sigilo!

Grupo do leite e derivados	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25		CODIF.
			P(1)	P(75) M(2) G(3)	
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100mL	250mL	
Leite desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100mL	250mL	
Leite semidesnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100mL	250mL	
Leite vegetal: _____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100mL	250mL	
Iogurte natural desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100mL	250mL	
Iogurte com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100mL	250mL	
Queijo fresco ou ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g	40g	
Queijo amarelo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g	30g	
Tofu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g	30g	
Requeijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g	40g	
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Grupo dos pães e cereais matinais					
Pão francês, forma, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2g	75g	
Pão integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g	75g	
Pão doce, de queijo, <i>croissant</i>	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g	50g	
Biscoitos doces/ salgados ou torradas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	14g	40g	
Aveia, granola, barra de cereais e sucrilhos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g	50g	
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g	50g	
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Gorduras					
Margarina comum	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2,5g	6 g	
Margarina <i>light</i>	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2,5g	6 g	
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3g	7 g	
Creme vegetal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3g	7 g	
Maionese	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	7g	30g	
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	7g	30g	
Cereais, Tubérculos e Massas					
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g	145g	
Batata, mandioca, polenta (fritas)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g	100g	
Batata, mandioca, polenta (não fritas)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g	140g	
Milho verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g	145g	
Batata-doce	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g	120g	
Massas, macarrão, lasanha, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	45g	200g	

Salgados e tortas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	40g	150g
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g	300g
Farofa, farinha de milho, outros: _____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g	30g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M		
Grupo das frutas				
Laranja, mexerica, poncã	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	125g	360g
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g	120g
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g	130g
Mamão papaia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g	170g
Melancia, melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g	150g
Uva, abacaxi, goiaba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	40g	150g
Abacate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	80g	215g
Manga, caqui	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	45g	180g
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165mL	250 mL
Jaca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	45g	180g
Suco de outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200mL	600mL
Outras frutas:	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	75g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	75g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	75g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	75g
Grupo das leguminosas				
Feijão roxo, carioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g	140g
Ervilha, lentilha, grão de bico, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g	60g
Feijoada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	150g	300g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g	140g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g	140g
Grupo de verduras/legumes				
Alface, escarola, agrião, rúcula, almeirão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g	40g
Repolho, acelga, couve, espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	75g
Couve-flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g	80g
Cenoura, abóbora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12g 50g	48g 120g
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	80g
Berinjela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g	80g
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g	80g
Vagem, chuchu, abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g	65g
Sopas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	290g	780g
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	290g	780g
Grupo das carnes e ovos				
Carne bovina sem gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	75g	120g
Carne bovina com gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	75g	120g
Carne de porco com gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	77,5g	255g
Carne de porco sem gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	77,5g	255g
Bacon, toucinho, torresmo, pururuca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	77,5g	255g
Carne de frango ou de outras aves sem pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	65g	135g
Carne de frango ou de outras aves com pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	65g	135g

	Quantas vezes você come?	Unidade	CODIF.
Com que frequência você usa gordura ou óleo no preparo de suas refeições?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	
Quantas porções de vegetais (verduras e legumes) você costuma comer, sem incluir batatas ou saladas de maionese?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	
Quantas porções de frutas você costuma comer, sem incluir sucos de frutas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	

PROJETO DE PESQUISA: CORRELAÇÃO ENTRE DIETA E MICROBIOTA: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES.

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Participante N° | | | | | Data: ____/____/____
Nome: _____ Idade (anos): _____

1. Peso (kg): _____;
2. Altura (cm): _____;
3. IMC: _____;
4. Classificação: _____

Referência:

- baixo peso ($IMC < 18,5$),
- eutrofia ($18,5 \leq IMC < 25$),
- pré-obesidade ($25 \leq IMC < 30$),
- obesidade ($IMC \geq 30$)

5. % de Gordura corporal: _____;
6. % de Hidratação: _____;
7. % de Musculatura: _____;
8. % Massa Óssea : _____;
9. Taxa de Metabolismo Basal: _____;
10. Circunferência da cintura (cm): _____;
11. Circunferência abdominal (cm): _____;
12. Circunferência do quadril (cm): _____;
13. RCQ: _____.

PROJETO DE PESQUISA: CORRELAÇÃO ENTRE DIETA E MICROBIOTA: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES.

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO DO ESTILO DE VIDA

1. Você pratica alguma atividade física? (0) Não (1) Sim.

Se SIM, qual atividade? _____

Com que frequência? _____ vezes/semana.

Quanto tempo gasta praticando atividade física? _____ horas.

2. Em média, quanto tempo por dia você gasta assistindo TV ou fica no computador? _____ horas.

3. Você fuma? (0) Não (1) Sim.

Se sim, há quanto tempo? _____ Quantos cigarros fuma por dia? _____

4. Você costuma consumir bebida alcoólica?

(0) nunca

(1) diariamente

(2) 1 ou menos de uma vez por mês

(3) pelo menos 1 vez por semana

(4) 2 a 4 vezes por mês

(5) 2 a 3 vezes por semana

5. Qual o tipo de bebida você bebe?

(0) Nenhuma (1) cerveja (2) vinhos (3) destilados (cachaça, *whisky*, vodca, licor) (4) bebidas *ice*

6. Quantas doses contendo álcool você consome num dia típico quando você está bebendo?

(0) Nenhuma (1) 1 a 2 doses (2) 3 a 5 doses (3) 6 a 8 doses (4) 10 ou mais

ANEXO D – Caracterização de morfotipos obtidos a partir de cultura de amostras fecais em meios de cultura seletivos e suas respectivas ocorrências absolutas.

Código	Descrição dos morfotipos	Ocorrência absoluta		
		VG	VT	ON
M1	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	12	19	16
M2	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor amarela, aspecto úmido e Gram positiva.	3	1	0
M3	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor amarela, aspecto úmido e Gram positiva.	4	7	2
M4	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	2	0	0
M5	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	1	1	0
M6	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor amarela, aspecto úmido e Gram positiva.	1	1	3
M7	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor amarela, aspecto viscoso e Gram positiva.	4	2	3
M8	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor amarela, aspecto úmido e Gram positiva.	4	5	3
M9	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcida, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	3	0	0
M10	Tamanho médio, forma circular, elevação do tipo elevada, borda ondulada, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	1	0	0
M11	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	5	5	10
M12	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor amarela, aspecto viscoso e Gram positiva.	4	1	3
M13	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo ondulada, borda lobada, brilho opaco, cor branca, aspecto seco e Gram positiva.	1	0	0
M14	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	2	0	0
M15	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lobada, brilho opaco, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	2	0	2
M16	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo achatada, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	1	0	0
M17	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto seco e Gram positiva.	1	0	0
M18	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, cor branca, brilho opaco, aspecto membranoso e Gram positiva.	1	0	0
M19	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo côncava, borda lobada, brilho translúcido, cor amarela, aspecto viscoso e Gram positiva.	1	1	0

M20	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lobada, brilho opaco, cor branca, aspecto membranoso e Gram positiva.	1	0	2
M21	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	3	2	0
M22	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor amarela, aspecto úmido e Gram positiva.	0	5	5
M23	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo côncava, borda lobada, brilho opaco, cor branca, aspecto seco e Gram positiva.	0	1	1
M24	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	2	0
M25	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo côncava, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	2	0
M26	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	1	0
M27	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto seco e Gram positiva.	0	1	0
M28	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lobada, brilho opaco, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	1	0
M29	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor amarela, aspecto membranoso e Gram positiva.	0	2	0
M30	Tamanho pequeno, com forma puntiforme, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	6	3
M31	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto leitoso e Gram positiva.	0	1	3
M32	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor amarela, aspecto úmido e Gram positiva.	0	2	1
M33	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	1	0	1
M34	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lobada, brilho opaco, cor branca, aspecto seco e Gram positiva.	0	0	1
M35	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor amarela, aspecto viscoso e Gram positiva.	0	1	0
M36	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	1	0
M37	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho opaco, cor amarela, aspecto viscoso e Gram positiva.	0	2	0
M38	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo ondulada, borda lobada, brilho opaco, cor amarela, aspecto viscoso e Gram positiva.	0	1	1
M39	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, transparente, aspecto úmido e Gram positiva.	1	3	1
M40	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	5	7	1
M41	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	4	2	0

M42	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	5	0	0
M43	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho opaco, cor cinza, aspecto seco e Gram positiva.	1	2	0
M44	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	2	0	0
M45	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	4	11	15
M46	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor cinza, aspecto úmido e Gram positiva.	3	3	0
M47	Tamanho pequeno, com forma puntiforme, elevação do tipo convexa, borda lisa, transparente, aspecto úmido e Gram positiva.	2	2	6
M48	Tamanho pequeno, com forma puntiforme, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	1	0	0
M49	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	1	1	1
M50	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	1	2	1
M51	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	1	0	0
M52	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo côncava, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	1	0
M53	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor preta, aspecto úmido e Gram positiva.	0	6	1
M54	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor cinza, aspecto úmido e Gram positiva.	1	3	1
M55	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor cinza, aspecto úmido e Gram positiva.	0	3	1
M56	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor branca, aspecto úmido e Gram positiva.	0	1	1
M57	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor preta, aspecto úmido e Gram positiva.	1	10	12
M58	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto leitoso e Gram positiva.	1	2	1
M59	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor preta, aspecto úmido e Gram positiva.	0	1	0
M60	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor cinza, aspecto úmido e Gram positiva.	0	0	1
M61	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho opaco, cor branca, aspecto viscoso e Gram positiva.	0	0	1
M62	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor preta, aspecto úmido e Gram positiva.	0	0	1
M63	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, transparente, aspecto úmido e Gram positiva.	0	0	1

M64	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	2	6	8
M65	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	4	3	2
M66	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	5	3	1
M67	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lobada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	1	0	2
M68	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho opaco, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	1	1	0
M69	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	0	4	9
M70	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e gram negativa.	2	2	0
M71	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	1	4	2
M72	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto viscoso e Gram negativa.	6	4	1
M73	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	5	2	0
M74	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	2	1	0
M75	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto seco e Gram negativa.	1	0	0
M76	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	1	0	0
M77	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	2	0	0
M78	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	2	2	3
M79	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	4	1	0
M80	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	2	5	1
M81	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	1	4	0
M82	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lobada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	1	2	0
M83	Tamanho grande, com forma irregular, elevação protuberante, borda lobada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	3	2	1
M84	Tamanho médio, com forma irregular, elevação protuberante, borda lobada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	4	4	3

M85	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	6	9	10
M86	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	0	1	1
M87	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	2	0	0
M88	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	1	0	1
M89	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lobada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto seco e Gram negativa.	1	0	0
M90	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lobada, brilho opaco, cor roxa, aspecto seco e Gram negativa.	1	0	0
M91	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	1	1	4
M92	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	0	3	3
M93	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lobada, brilho translúcido, cor vinho, aspecto úmido e Gram negativa.	0	1	0
M94	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor vinho, aspecto úmido e Gram negativa.	0	2	1
M95	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	0	1	0
M96	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor vinho, aspecto úmido e Gram negativa.	0	2	0
M97	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lobada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto membranoso e Gram negativa.	0	1	0
M98	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor vinho, aspecto úmido e Gram negativa.	1	3	1
M99	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo protuberante, borda lobada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e gram negativa.	1	4	1
M100	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	1	4	3
M101	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lobada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	0	1	0
M102	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda lacerada, brilho translúcido, cor rosa, aspecto membranoso e Gram negativa.	0	1	0
M103	Tamanho grande, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda ondulada, brilho translúcido, cor rosa, aspecto úmido e Gram negativa.	0	1	1
M104	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor rosa, aspecto viscoso e Gram negativa.	0	1	2
M105	Tamanho médio, com forma irregular, elevação do tipo elevada, borda ondulada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto seco e Gram negativa.	0	0	1
M106	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo protuberante, borda lisa, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	0	0	1

M107	Tamanho médio, com forma circular, elevação do tipo convexa, borda lisa, brilho translúcido, cor roxa, aspecto viscoso e Gram negativa.	0	0	2
M108	Tamanho pequeno, com forma circular, elevação do tipo elevada, borda ondulada, brilho translúcido, cor metalizada, aspecto úmido e Gram negativa.	0	0	1
M109	Tamanho grande, com forma irregular, elevação do tipo convexa, borda lobada, brilho translúcido, cor roxa, aspecto úmido e Gram negativa.	0	1	1

ANEXO E - ARTIGO PUBLICADO

Revista Antibiotics (ISSN: 2079-6382)

Fator de Impacto atual: 5.222

Classificação JCR:

23/93 (Q2) em 'Infectious Diseases'

64/270 (Q1) em 'Pharmacology & Pharmacy'



Article

Influence of Human Eating Habits on Antimicrobial Resistance Phenomenon: Aspects of Clinical Resistome of Gut Microbiota in Omnivores, Ovolactovegetarians, and Strict Vegetarians

Suzane Fernandes da Silva, Isabela Brito Reis , Melina Gabriela Monteiro, Vanessa Cordeiro Dias ,
Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Vânia Lúcia da Silva and Cláudio Galuppo Diniz *

Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Center for Studies in Microbiology, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, Brazil; sfs.fernandes@ufff.br (S.F.d.S.); isabritoreis@ufff.br (I.B.R.); melinamoreira84@gmail.com (M.G.M.); vanessa.dias@icb.ufff.br (V.C.D.); alessandra.machado@icb.ufff.br (A.B.F.M.); vania.silva@icb.ufff.br (V.L.d.S.)

* Correspondence: claudio.diniz@icb.ufff.br; Tel.: +55-32-2102-3213



Citation: da Silva, S.F.; Reis, I.B.; Monteiro, M.G.; Dias, V.C.; Machado, A.B.F.; da Silva, V.L.; Diniz, C.G. Influence of Human Eating Habits on Antimicrobial Resistance Phenomenon: Aspects of Clinical Resistome of Gut Microbiota in Omnivores, Ovolactovegetarians, and Strict Vegetarians. *Antibiotics* **2021**, *10*, 276. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030276>

Academic Editors: Mohammad Amjad Kamal and Firoz Anwar

Received: 14 February 2021

Accepted: 4 March 2021

Published: 9 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The use of xenobiotics in food production and how food intake is carried out in different cultures, along with different eating habits (omnivorism (ON), ovolactovegetarianism (VT), and strict vegetarianism (VG)) seem to have implications for antimicrobial resistance, especially in the human gut microbiota. Thus, the aim of this study was to evaluate aspects of the clinical resistome of the human gut microbiota among healthy individuals with different eating habits. Volunteers were divided into 3 groups: $n = 19$ omnivores (ON), $n = 20$ ovolactovegetarians (VT), and $n = 19$ strict vegetarians (VG), and nutritional and anthropometric parameters were measured. Metagenomic DNA from fecal samples was used as a template for PCR screening of 37 antimicrobial resistance genes (ARG) representative of commonly used agents in human medicine. The correlation between eating habits and ARG was evaluated. There were no significant differences in mean caloric intake. Mean protein intake was significantly higher in ON, and fiber and carbohydrate consumption was higher in VG. From the screened ARG, 22 were detected. No clear relationship between diets and the occurrence of ARG was observed. Resistance genes against tetracyclines, β -lactams, and the MLS group (macrolides, lincosamides, and streptogramins) were the most frequent, followed by resistance genes against sulfonamides and aminoglycosides. Vegetables and minimally processed foods seem to be the main source of ARG for the human gut microbiota. Although eating habits vary among individuals, the open environment and the widespread ARG from different human activities draw attention to the complexity of the antimicrobial resistance phenomenon which should be addressed by a One Health approach.

Keywords: clinical resistome; gut microbiota; eating habits; omnivorism; ovolactovegetarianism; strict vegetarianism

1. Introduction

The clinical resistome is defined as the set of genes related to antimicrobial resistance to drugs commonly used to treat infectious diseases in a particular environment [1,2]. The human gut microbiota is assumed to be an important reservoir of antimicrobial resistance genes (ARG), since it is always in contact with environmental microorganisms, which are introduced by oral contamination through food and water ingestion, and by contact with animals and other people. Horizontal transference of ARG may occur in the intestinal environment among commensal microorganisms, including potentially pathogenic ones, and pathogens [3,4].

In light of the One Health concept, in which human health is linked to animal and environmental health [5], the microbiomes of humans, animals, and the different environments show a connection with each other, allowing ARG to be shared and widely

distributed [6,7]. According to the historic perspective, the One Health concept has focused on local interconnections and interdependencies. As a contemporary point of view, this approach considers global health and includes the comprehension of characteristics that may stimulate the global antimicrobial resistance (AMR) [6].

Human activities may induce changes in the open environment and exert an important selective pressure on microbial communities, favoring the spread of ARG and contributing to the maintenance of, and even increase in, the antimicrobial resistance phenomenon [8,9].

It is accepted that the food production chain may play an important role in the selection and spread of ARG over the open environment, with food commensal or contaminant microorganisms being recognized as sources of ARG [4,10]. Although some studies show the role of food microorganisms in the spread of ARG with impacts on the human gut resistome, the influence of different eating habits on the phenomenon is still poorly understood [11–15]. Therefore, the objective of this study was to comparatively evaluate aspects of the clinical resistome of the gut microbiota considering different eating habits, namely, omnivorism (ON), ovolactovegetarianism (VT), and strict vegetarianism (VG), and to investigate how food intake may contribute to resistome quality.

2. Results

The sociodemographic, anthropometric, and nutritional data of the participants are presented in Table 1. The average age of the participants was within the inclusion criteria and was overall 28.66 (± 7.79) years old. Regarding ethnic groups, 72.4% were White and 19.0% were Pardo. Less than 10% belonged to other ethnic groups (Black and East Asian—6.9% and 1.7%, respectively), and the average BMI was 21.90. With regards to the gender distribution, 25.9% were male and 74.1% were female. No significant differences were observed in daily caloric intake; however, the lipid consumption was higher in ON compared with VG. Regarding protein intake, consumption was different between the three groups, being higher in omnivores. Carbohydrate consumption was significantly higher among VG than in the other two groups, and there were no significant differences between ON and VT. Regarding the consumption of total fibers, insoluble fibers, and soluble fibers, the three groups behaved differently, with fiber consumption in VG being higher than in the other two groups, and the eating behavior of ON participants showing the lowest fiber consumption.

Table 1. Sociodemographic, anthropometric, and nutritional characteristics of the participants.

Characteristics	Group of Participants According to Their Eating Habits			<i>p</i> < 0.05 *
	ON (<i>n</i> = 19)	VT (<i>n</i> = 20)	VG (<i>n</i> = 19)	
Gender (%; male/female)	15.8/84.2	20.0/80.0	42.1/57.9	na
Average age (years \pm SD)	28.47 \pm 6.02	31.63 \pm 9.72	25.89 \pm 6.24	na
Ethnic Group (%)	White	52.6	78.9	na
	Pardo **	31.6	10.6	na
	Black	10.5	10.5	na
	East Asian	5.3		na
Average BMI (mean \pm SD)	21.46 \pm 1.96	22.13 \pm 1.95	22.12 \pm 1.72	
Mean daily calorie intake (% \pm SD)	2049.3 \pm 836.1	2092.4 \pm 738.9	2522.7 \pm 955.2	
Mean daily lipid intake (% \pm SD)	33.39 \pm 6.07	33.64 \pm 14.41	25.10 \pm 12.11	c
Mean daily protein intake (% \pm SD)	19.22 \pm 4.80	12.10 \pm 3.16	10.17 \pm 1.91	a, b, c
Mean daily CARB intake (% \pm SD)	47.39 \pm 7.35	54.26 \pm 13.95	64.73 \pm 11.34	b, c
Mean daily TF intake (g \pm SD)	23.01 \pm 9.04	41.98 \pm 25.12	63.78 \pm 35.79	a, b, c
Mean daily SF intake (g \pm SD)	2.53 \pm 1.56	4.98 \pm 2.53	13.58 \pm 14.65	a, b, c
Mean daily IF intake (g \pm SD)	5.14 \pm 3.27	8.88 \pm 5.41	21.42 \pm 19.36	a, b, c

* Significant statistical analysis, *p*-value was determined by Student's *t*-test: a: comparison between ON and VT; b: comparison between VT and VG; c: comparison between ON and VG. ** The ethnic group Pardo is used in Brazil to refer to people of mixed ethnic ancestries and represents a diverse range of ethnic backgrounds. BMI = Body Mass Index; CARB = carbohydrates; TF = total fibers; SF = soluble fibers; IF = insoluble fibers. ON = omnivores; VT = ovolactovegetarians; VG = strict vegetarians. SD = standard deviation. na = not applicable.

From the 37 tested ARG, representative of the clinical resistome considering the most widely used antimicrobials in human medicine, 22 were detected at least in one group of individuals. Among the ARG detected, tetracycline resistance genes were the most observed among the three groups, followed by macrolide, lincosamide, and streptogramin (MLS) and macrolide resistance genes and β -lactam resistance genes (Figure 1). The *tet(M)*, *tet(Q)*, and *tet(O)* genes and *erm(B)* were detected in all samples analyzed. *bla_{TEM}* and *mef* were detected at a frequency higher than 70% in the three groups. *aacA-aphD* was also frequently detected, ranging from 37% in VG to 55% in VT. The sulfonamide resistance genes, *sul1* and *sul2*, quinolone resistance genes, *qnrB* and *qnrS*, and *intl-1* genes had intermediate detection frequencies (Figure 2). Fifteen common markers were observed among all evaluated groups. ARG such as *qnrS* and *intl-2* were found only in ON and VT, while *erm(A)* and *tet(L)* were specifically detected in ON and VG; *bla_Z* was observed in VT and VG, whereas *bla_{CTX-M}* was detected in a single sample from the VT group and *tet(E)* detected in only one sample from the ON group (Figure 3).

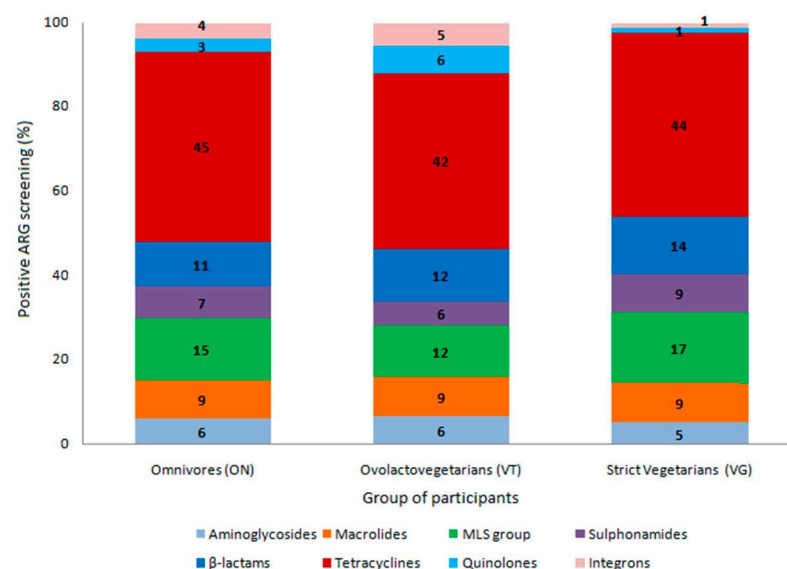


Figure 1. Frequency of detection of antimicrobial resistance genetic markers (ARG) related to different classes of antimicrobial drugs according to positive screening by PCR from the fecal metagenome of omnivores (ON), ovovlactovegetarians (VT), and strict vegetarians (VG). ARG are clustered based on their chemical structure or phenotype, such as β -lactams (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_Z*, *mef*); tetracyclines (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(E)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*); macrolide, lincosamide, and streptogramin (MLS) group (*ermA*, *ermB*, *ermC*); quinolones (*qnrB*, *qnrS*); sulfonamides (*sul1*, *sul2*); aminoglycosides (*aacA-aphD*); and integrons (*intl-1*, *intl-2*).

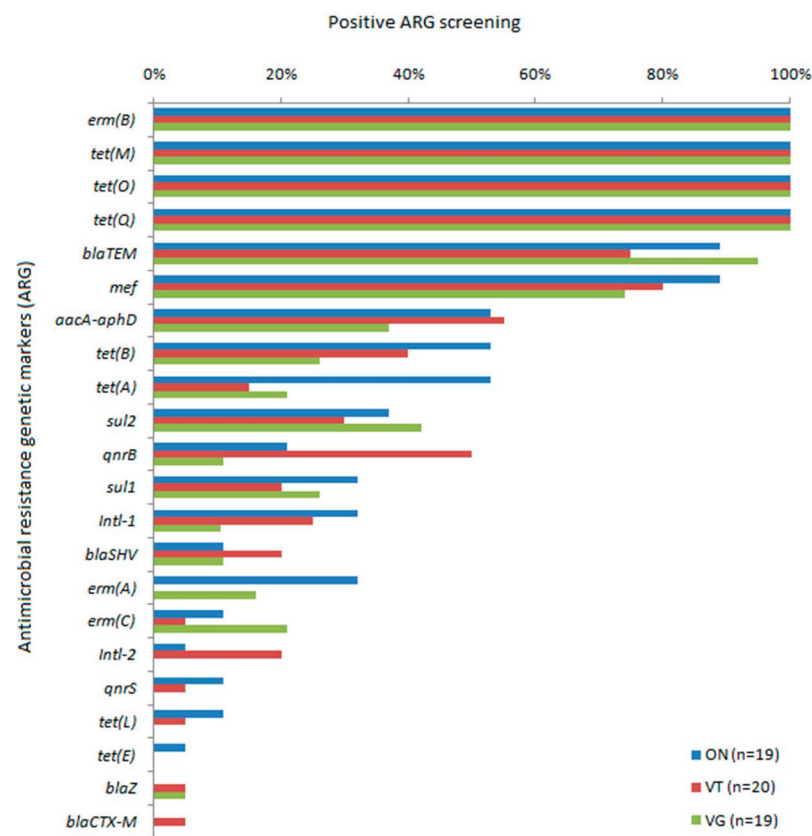


Figure 2. Distribution of 22 antimicrobial resistance genetic markers (ARG) detected out of 37 tested by PCR from the fecal metagenome of omnivores (ON), ovolactovegetarians (VT), and strict vegetarians (VG). Frequency of positive screening among each tested sample.

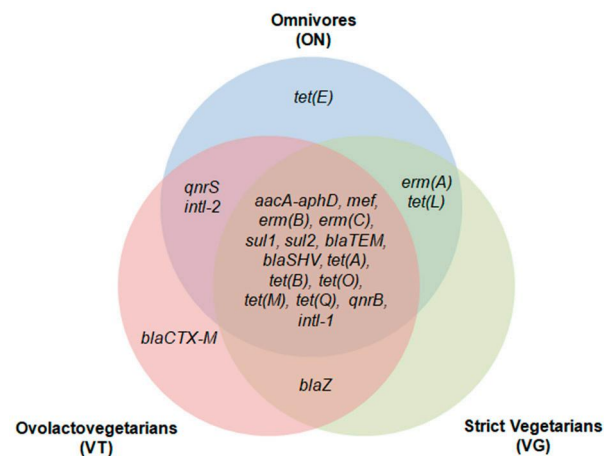


Figure 3. Venn diagram representing the occurrence of antimicrobial resistance genetic markers (ARG) and qualitative clustering according to their positive screening exclusively or shared between omnivores (ON), ovolactovegetarians (VT), and strict vegetarians (VG). β -lactams (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_Z, *mef*); tetracyclines (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(E), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *tet*(Q)); macrolide lincosamide and streptogramin (MLS) group (*erm*A, *erm*B, *erm*C); quinolones (*qnr*B, *qnr*S); sulfonamides (*sul*1, *sul*2); aminoglycosides (*aacA-aphD*); and integrons (*int1-1*, *int1-2*).

Taking together the ARG screening data considering the three different groups of individuals with specific eating habits, a highly homogeneous distribution of detected genetic markers was observed among the ON, VT, and VG. No significant clustering was observed in the similarity matrix and dendrogram obtained. Although two clusters were

observed considering a threshold of similarity between 65% and 70%, no differentiation was observed within each cluster considering the participants in the study. The data support the observation that different eating habits may not influence the distribution of ARG in the human gut microbiota from a holistic point of view (Figure 4).

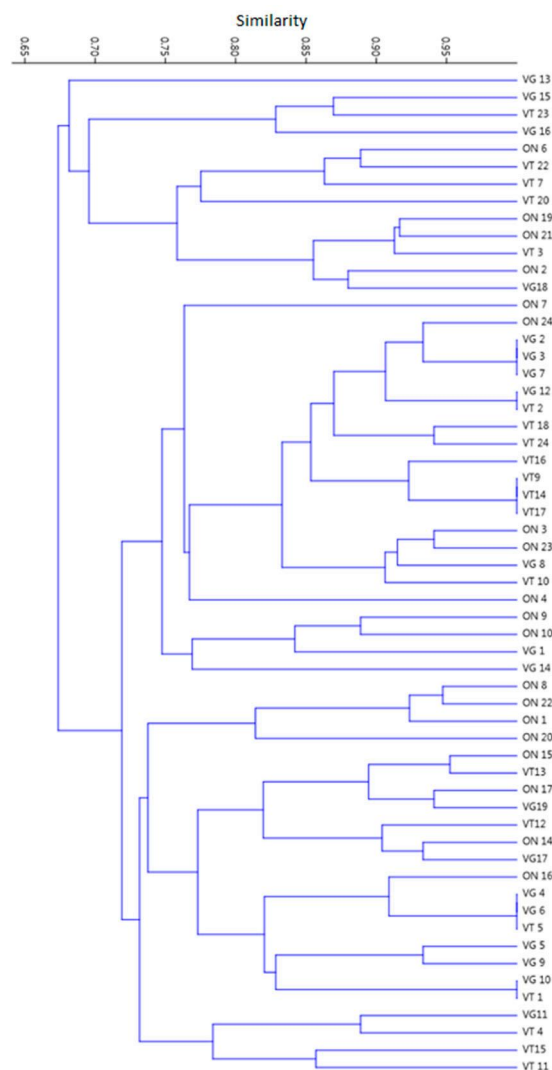


Figure 4. Clustering analysis of 58 healthy individuals with different eating habits (omnivores (ON), ovolactovegetarians (VT), and strict vegetarians (VG)) related to polymerase chain reaction (PCR) screening of antimicrobial resistance genes (ARG), representative of the human gut clinical resistome. The dendrogram was obtained from a binary matrix built based on positive or negative amplification of each tested ARG, using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) grouping method.

3. Discussion

Recently, issues related to antimicrobial resistance have changed as scientific information is gained regarding the origin, transmission, and evolution of the phenomenon. However, the interplay among humans, animals, and the environment in this context, including human activities, has not been completely elucidated [6]. Geography and behavior are among the key factors related to the human microbiota structure, although the microbial core is specific in different species [7,8]. In this regard, biotic and abiotic environmental factors are accepted to modulate a microorganism's distribution in different ecosystems, especially considering the One Health approach. It is expected that the One Health approach will modify concepts to improve our understanding of ARG transmission

and guide strategies to mitigate AMR [6]. Anthropogenic activities and habits such as eating behavior, culture, practices of antimicrobial use in different activity levels, sanitation, hygiene, and waste management have a impact on microbiota diversity as well as on ARG distribution, especially in the gut microbiota [8,16,17]. In addition, it is accepted that environmental resistomes may share a common core which is available to humans and other animals [6,18].

In this longitudinal and prospective study with a probabilistic sample of an average population representative of healthy Brazilians, all of them adult residents in urban areas with different eating habits, no significant differences were observed in the anthropometrical data, clearly supporting that nutritional habits were more likely related to eventual alterations in intestinal microbiota structure, more specifically the gut microbiota resistome. Considering eventual bias related to ethnic groups and their social behavior, it is difficult to address any discussion as most of the participants belonged to the White ethnic group followed by Pardo. The term Pardo is a particularly complex one and is used in Brazil to refer to people of mixed ethnic ancestries and social behavior [19]. Considering the other populational characteristics such as healthy status and being a resident of the same urban area, no differences were observed considering ethnicity. The observed predominance of fiber intake in VT and VG diets compared with ON may suggest that foods with a lower degree of processing, especially vegetables, may be considered the main source of ARG in these individuals, with a low impact of food from animal origin on microbial resistome quality. However, according to the literature, and as observed in the wide distribution of ARG, it is reasonable to suggest an interchange among human, animal, and plant microbiomes, as ARG related to antimicrobials used in veterinary medicine were detected in the gut resistome of VG individuals [6,7].

As for ON, foodstuffs of animal and plant origin are likely to contribute to the resistome composition. In contrast, for VT and VG, it is highly suggested that vegetable-associated microorganisms are the main source for ARG to build the gut resistome. It is important to reinforce that our data showed an overall similar final composition in ON, VT, and VG gut clinical resistomes. A homogeneous distribution of volunteers' samples was observed with no clustering related to eating habits. From a different point of view, some authors state that overall resistome composition is not significantly impacted by diet; however, they suggest that meat and animal-derived foods may carry more ARG [7,20]. It must be stressed that in these reports geographical locations are different, and the numbers of screened ARG are lower than in our study along with inclusion and exclusion criteria, which may explain the non-uniform information drawn from the data.

On the other hand, ARG can remain stable in the human gut microbiota for long periods, even in the absence of antimicrobial selection [21]. Thus, ARG diversity is due not only to the direct effect of the selective pressure exerted by antimicrobial use, but also to transference of ARG between different microbiomes. Several studies have already highlighted the role of fecal contamination in the process of ARG spread, showing high prevalence of ARG in animal and human feces, sewage waste, and water treatment plants. Through soil and irrigation water, ARG may reach vegetables [6,22,23].

The plant microbiome shares ARG with the surrounding environment, and soil is probably the main ARG source for the resistome in plants [24]. As vegetables are usually eaten raw or with low processing, the chances of antimicrobial resistant bacteria and ARG remaining viable and reaching the human gut microbiota are greater [24–26]. Several studies have shown that organic vegetables have a richer resistome when compared with conventional ones, suggesting that the consumption of organic vegetables is also an important source of ARG for the human microbiota [27–30].

Tetracyclines, macrolides, β -lactams, and sulfonamides are among the most used antimicrobials in farm animals [31,32]. They can be used to treat infections, for prophylaxis, metaphylaxis, and, in low doses, as growth promoters. In Brazil, the use of several antimicrobials as growth promoters was banned in the early 2000s. However, the consumption of these drugs remains high, and it is estimated that in Brazil and in the other BRICS countries,

antimicrobial consumption will double in livestock activities by the year 2030. Despite the ban, use of prophylaxis and metaphylaxis remains high [33,34].

ARG such as *tet(Q)* and *tet(O)* are frequently detected in farm animal feces and are shown to be a stable part of their gut resistome. These *tet* genes are commonly associated with transposons and mobile genetic elements, which may contribute to their wide distribution among environments [35]. Variants such as *tet(Q)*, *tet(O)*, and *tet(M)* are highly frequent genes in the human gut resistome [22]. It is known that *tet(Q)* is highly prevalent among isolates of *Bacteroides* spp., major anaerobic bacilli resident in the human gut microbiota. As for *erm* genes, they are also commonly found in healthy individuals, showing homology to alleles in different species, which may suggest horizontal spread [35–37]. Still, according to the literature, *tet* transcripts could play several additional roles, such as cell signaling, communication, or transport. Besides, toxic heavy metals and antimicrobials of the MLS group could participate in co-selection of tetracycline resistance [22,38,39].

The MLS group of ARG is usually detected in the environment related to human and animal microbiota, soil, water, and sewage [18,23,40]. Among them, *erm(B)* is the most common and highly frequent in the human gut microbiota and is associated with mobile genetic elements [18,23,40–42]. As for *mef*, also highly detected in the present study, they encode efflux pumps, and are commonly associated with transposons [42,43].

bla_{TEM}, an important extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) encoding gene, was the main beta-lactamase-related ARG detected in this study, corroborating other authors who describe *bla_{TEM}* in human feces, animal origin foodstuffs, and sewage [31,44–46]. The *bla_{TEM}* genes, together with other ARG related to macrolide, aminoglycoside, and tetracycline resistance, are accepted to be widely spread [18]. In fact, the *aacA-aphD* gene, reported to be an important aminoglycoside ARG, was also among the most observed in this study.

Although some reports have described lower observation of *bla_{TEM}* and higher detection of *bla_{CTX-M}* and variants in human and animal feces and foodstuffs [20,47–49], the low *bla_{CTX-M}* detection in this study raises some considerations: ARG persistency in each environment should be directly impacted by antimicrobial use and ESBL-producing bacteria epidemiology, including geography, movement of people, trade, and social behavior [50]. In Brazil, high detection rates of *bla_{TEM}* in the human gut resistome were recently reported in both eutrophic, overweight, and obese volunteers, which may reinforce the role of local epidemiology as a feature related to ARG persistency in different regions [31].

Sulfonamide and quinolone ARG were also observed but to a lesser extent when compared with tetracycline, MLS, and macrolide genes, with *sul1* and most of all *sul2* genes being detected in all groups, considering the different eating habits. There is evidence of *sul* gene spread throughout water, soil, human and animal feces, vegetables, low processed foods, and sewage [32,51–54]. These antimicrobials, along with tetracyclines and penicillins, are often used in veterinary medicine. In addition, they seem to be highly persistent in soil, sediments, and water, due to properties such as high soil penetration and low removal efficiency, like tetracyclines [32].

Quinolone ARG such as *qnrB* and *qnrS* were also observed. Although the most common mechanism of quinolone resistance is chromosomal mutations, plasmid-mediated resistance can occur and is mainly related to *qnr* genes [55–57]. These genes confer low levels of resistance when compared to chromosomal resistance but may be horizontally transferred. In different ecosystems such as aquatic environments, livestock or human resistomes, more than one quinolone ARG may be observed in a mobile genome [55,56,58,59].

As described elsewhere, ARG are often associated with mobile genetic elements, mainly class 1, but also class 2 and 3 integrons [60]. In this study, *intl-1* was the most detected in all tested groups, in higher frequencies for ON and VT. Although *intl-2* was also detected, but at a lower frequency, it was not observed in the fecal metagenome of VG participants. Facing the frequency of observation and the core of ARG among the three groups of participants, it is reasonable to suggest that although integrons play an important role in ARG spread by horizontal transference, especially class 1, other mobile

genetic elements, such as transposons and plasmids, also have an important role in ARG transfer in the gut microbiota. Further prospective studies are thus needed to map and better address the ARG transference routes in the gut microbiota.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design

This a descriptive cross-sectional study with healthy volunteers, $n = 58$, resident in the southeast region of Brazil, with different eating habits (ON, $n = 19$; VT, $n = 20$; and VG, $n = 19$), invited to participate. The inclusion criteria were: (i) age ranging between 18 and 60 years old; (ii) dietary behavior for at least one year; (iii) body mass index (BMI) between 18.5 and 24.9; (iv) no antimicrobial agent intake in the past 3 months; (v) no pregnancy or breastfeeding; and (vi) no chronic diseases such as systemic pathologies, diabetes, hypertension, cancer, and rheumatoid arthritis. The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora. All volunteers were informed about the study and signed the Free and Informed Consent Form.

4.2. Participants' Anthropometric Data and Dietary Assessment

Volunteers' weight was measured on a digital scale in a central position, erect, barefoot, with feet together, and wearing as little clothing as possible. Height was measured by means of a vertical stadiometer attached to the scale, with the volunteer also barefoot and erect, with heels together, with no headdress and looking at the horizon. BMI was calculated based on the relationship between weight and height (Kg/m^2) and evaluated according to the method proposed by the World Health Organization [61]. To reduce variation, the measures were always measured by the same person, using the same tape measure and scale.

Regular food intake was accessed by a quantitative food frequency questionnaire (QFFQ), according to the literature [62]. In these questionnaires, the volunteers recorded the average food intake (daily, weekly, and monthly) in the past six months. A literature-validated photographic album was used to estimate food portion sizes [63].

4.3. Fecal Specimen Collection and Storage

After dietary assessment, stool samples were collected by spontaneous demand, fresh in its native state in a screw-cap sterile container, and transported to the laboratory within two hours in an ice box to be processed for metagenomic DNA extraction from 200 mg aliquots. Reminiscent stool samples were stored in a freezer at $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

4.4. Extraction, Quantitation, and Integrity of Metagenomic DNA

The metagenomic DNA was extracted using the commercial kit QIAampTMFast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Further, extracted DNA was eluted in a volume of 50 μL and kept in a freezer at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for further analysis. Metagenomic DNA quantification and purity were determined by the A260/A280 absorbance ratio with Nanodrop (Thermo Scientific NanoDropTM2000 micro volume spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

DNA integrity was assessed by electrophoresis on 0.8% agarose gel in 0.5X TBE buffer (Tris-HCl-Borate-EDTA). The gel was stained with ethidium bromide and analyzed in an ultraviolet light transilluminator (GE Healthcare, Amersham, UK).

4.5. Screening of Antimicrobial Resistance Genes (ARG)

The clinical resistome assessed in this study consists of a set of 37 ARG, including classes 1, 2, and 3 integrons (Table S1, Supplementary Data). These resistance markers were PCR screened from metagenomics with specific primers and amplification conditions as previously described in the literature (Table S1, Supplementary Data).

The PCR reactions were performed in 25 μL containing 12.5 μL of PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) and 1 μL of DNA ($\sim 20\text{ ng}/\mu\text{L}$). Primer volumes varied

according to the ARG, and the total volume was completed with water. The reactions took place in an automated thermocycler (Biometra T1 Thermocycler, Gttingen, Germany), according to different running protocols, specific for each primer set (Table S1, Supplementary Data). After PCR reaction, electrophoresis was performed on 1.0% agarose gel, analyzed after ethidium bromide staining on an ultraviolet transilluminator (GE Healthcare, Amersham, UK). A molecular weight standard 1Kb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA) was used. Positive and negative controls were used for each PCR reaction.

4.6. Statistical Analysis

Student's *t*-test was used to compare the macronutrient intake from the QFFQ, with a significance level of 5% ($p = 0.05$) and using the XLSTAT statistical program. To evaluate the clinical resistome similarity clustering according to the presence or absence of ARG detection, a dendrogram was constructed based on Dice similarity coefficient and UPGMA method (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

5. Conclusions

Human activities have a strong impact on microbiomes in different environments, with special concern for antimicrobial drug use. Although low processed foods might be considered an important source of ARG for resident microbiota, such as intestinal bacteria, there are several variables that may contribute to human gut resistome content which are still not entirely clear. In general, the results observed may suggest that vegetables and minimally processed foods are highly related to the core gut clinical resistome. In this study, healthy volunteers were screened for ARG from the fecal metagenome, with mostly different eating habits. On the other hand, from a One Health perspective, although vegetable and low processed food intake is thought to be the most common behavior in the sampled population, sources of ARG still may vary between different individuals. The ARG distribution in the environment seems to be so worrisome and widespread that eating habits may not be the only source of genetic elements and selective pressures that may impact the human gut resistome. Facing the relevance of antimicrobial resistance, further studies are needed to better address this issue in order to provide information support to the implementation of public and environmental policies to help to control the phenomenon.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/3/276/s1>, Table S1: Resistance genetic markers screened, initiator oligonucleotides, size of expected amplicons, and references.

Author Contributions: Conceptualization, C.G.D. and V.L.d.S.; methodology, C.G.D., S.F.d.S., I.B.R., and M.G.M.; validation, V.C.D. and A.B.F.M.; formal analysis, C.G.D., V.L.d.S., and S.F.d.S.; investigation, C.G.D., S.F.d.S., I.B.R., and M.G.M.; resources, C.G.D. and V.L.d.S.; Writing—Original draft preparation, S.F.d.S., V.L.d.S., and C.G.D.; Writing—Review and editing, S.F.d.S., V.L.d.S., A.B.F.M., and C.G.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq, FAPEMIG, and PROQUALI/UFJF.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (protocol code n° 2.046.122, approved on 4 May 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: This work was done at the Laboratory of Physiology and Bacterial Molecular Genetics. The authors gratefully acknowledge the financial support of the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank all the participants who generously volunteered and participated in this project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gillings, M.R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 4. [[CrossRef](#)]
2. Ho, J.; Yeoh, Y.K.; Barua, N.; Chen, Z.; Lui, G.; Wong, S.H.; Yang, X.; Chan, M.C.; Chan, P.K.; Hawkey, P.M.; et al. Systematic review of human gut resistome studies revealed variable definitions and approaches. *Gut Microbes* **2020**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)]
3. Baquero, F. Metagenomic epidemiology: A public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 67–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Caniça, M.; Manageiro, V.; Abriouel, H.; Moran-Gilad, J.; Franz, C.M. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *84*, 41–44. [[CrossRef](#)]
5. Destoumieux-Garzón, D.; Mavingui, P.; Boetsch, G.; Boissier, J.; Darriet, F.; Duboz, P.; Fritsch, C.; Giraudoux, P.; Le Roux, F.; Morand, S.; et al. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front. Vet. Sci.* **2018**, *5*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kim, D.W.; Cha, C.J. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: Understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp. Mol. Med.* **2021**, 1–9. [[CrossRef](#)]
7. Milanović, V.; Osimani, A.; Aquilanti, L.; Tavoletti, S.; Garofalo, C.; Polverigiani, S.; Litta-Mulondo, A.; Coccolin, L.; Ferrocino, I.; Di Cagno, R.; et al. Occurrence of antibiotic re-sistance genes in the fecal DNA of healthy omnivores, ovo-lacto vegetarians and vegans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1601098. [[CrossRef](#)]
8. Gillings, M.R.; Paulsen, I.T.; Tetu, S.G. Ecology and Evolution of the Human Microbiota: Fire, Farming and Antibiotics. *Genes* **2015**, *6*, 841–857. [[CrossRef](#)]
9. Swift, B.M.C.; Bennett, M.; Waller, K.; Dodd, C.; Murray, A.; Gomes, R.L.; Humphreys, B.; Hobman, J.L.; Jones, M.A.; Whitlock, S.E.; et al. Anthropogenic environmental drivers of anti-microbial resistance in wildlife. *Sci. Total Environ.* **2019**, *649*, 12–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Koch, B.J.; Hungate, B.A.; Price, L.B. Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: The role of ecology. *Front. Ecol. Environ.* **2017**, *15*, 309–318. [[CrossRef](#)]
11. Levy, S.B.; Fitzgerald, G.B.; Maccone, A.B. Changes in Intestinal Flora of Farm Personnel after Introduction of a Tetracycline-Supplemented Feed on a Farm. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 583–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Levy, S.B.; Fitzgerald, G.B.; Maccone, A.B. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nat. Cell Biol.* **1976**, *260*, 40–42. [[CrossRef](#)]
13. Looft, T.; Johnson, T.A.; Allen, H.K.; Bayles, D.O.; Alt, D.P.; Stedtfeld, R.D.; Sul, W.J.; Stedtfeld, T.M.; Chai, B.; Cole, J.R.; et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal micro-biome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 1691–1696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Amador, P.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Duarte, I. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae on Portuguese Livestock Manure. *Antibiotics* **2019**, *8*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Abriouel, H.; Knapp, C.W.; Gálvez, A.; Benomar, N. Chapter 29—Antibiotic Resistance Profile of Microbes from Traditional Fermented Foods. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*; Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2017; pp. 675–704.
16. Forslund, K.; Sunagawa, S.; Kultima, J.R.; Mende, D.R.; Arumugam, M.; Typas, A.; Bork, P. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Res.* **2013**, *23*, 1163–1169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lee, K.; Kim, D.-W.; Lee, D.-H.; Kim, Y.-S.; Bu, J.-H.; Cha, J.-H.; Thawng, C.N.; Hwang, E.-M.; Seong, H.J.; Sul, W.J.; et al. Mobile resistome of human gut and pathogen drives anthro-pogenic bloom of antibiotic resistance. *Microbiome* **2020**, *8*, 2. [[CrossRef](#)]
18. Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G.J. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome* **2016**, *4*, 1–15. [[CrossRef](#)]
19. Nobles, M. History counts: A comparative analysis of racial/color categorization in US and Brazilian censuses. *Am. J. Public Health* **2000**, *90*, 1738–1745. [[CrossRef](#)]
20. LoSasso, C.; Di Cesare, A.; Mastrorilli, E.; Patuzzi, I.; Cibir, V.; Eckert, E.M.; Fontaneto, D.; Vanzo, A.; Ricci, A.; Corno, G.; et al. Assessing antimicrobial resistance gene load in vegan, vegetarian and omnivore human gut microbiota. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52*, 702–705. [[CrossRef](#)]
21. Versluis, D.; D’Andrea, M.M.; Garcia, J.R.; Leimena, M.M.; Hugenholtz, F.; Zhang, J.; Ozturk, B.; Nylund, L.; Sipkema, D.; Van Schaik, W.; et al. Mining microbial metatranscriptomes for expression of antibiotic resistance genes under natural conditions. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11981. [[CrossRef](#)]
22. Singh, S.; Verma, N.; Taneja, N. The human gut resistome: Current concepts & future prospects. *Indian J. Med Res.* **2019**, *150*, 345–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wang, H.; Hou, L.; Liu, Y.; Liu, K.; Zhang, L.; Huang, F.; Wang, L.; Rashid, A.; Hu, A.; Yu, C. Horizontal and vertical gene transfer drive sediment antibiotic resistome in an urban lagoon system. *J. Environ. Sci.* **2021**, *102*, 11–23. [[CrossRef](#)]
24. Chen, Q.-L.; Cui, H.-L.; Su, J.-Q.; Penuelas, J.; Zhu, Y.-G. Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. *Trends Plant Sci.* **2019**, *24*, 530–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhang, L.; Kinkelaar, D.; Huang, Y.; Li, Y.; Li, X.; Wang, H.H. Acquired Antibiotic Resistance: Are We Born with It? *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7134–7141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Verraes, C.; VanBoxstael, S.; Van Meervenue, E.; Van Coillie, E.; Butaye, P.; Catry, B.; De Schaetzen, M.-A.; Van Huffel, X.; Imberechts, H.; Dierick, K.; et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 2643–2669. [[CrossRef](#)]
27. Su, J.-Q.; Wei, B.; Ou-Yang, W.-Y.; Huang, F.-Y.; Zhao, Y.; Xu, H.-J.; Zhu, Y.-G. Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 7356–7363. [[CrossRef](#)]
28. Zhou, X.; Qiao, M.; Wang, F.H.; Zhu, Y.G. Use of commercial organic fertilizer increases the abundance of antibiotic resistance genes and antibiotics in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2017**, *24*, 701–710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lin, H.; Chapman, S.J.; Freitag, T.E.; Kyle, C.; Ma, J.; Yang, Y.; Zhang, Z. Fate of tetracycline and sulfonamide resistance genes in a grassland soil amended with different organic fertilizers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *170*, 39–46. [[CrossRef](#)]
30. Kumar, K.; Gupta, S.C.; Baidoo, S.K.; Chander, Y.; Rosen, C.J. Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *J. Environ. Qual.* **2005**, *34*, 2082–2085. [[CrossRef](#)]
31. Sarmiento, M.R.A.; de Paula, T.O.; Borges, F.M.; Ferreira-Machado, A.B.; Resende, J.A.; Moreira, A.P.B.; Dutra Luquetti, S.C.P.; Cesar, D.E.; da Silva, V.L.; Diniz, C.G. Obesity, Xenobiotic Intake and Antimicrobial-Resistance Genes in the Human Gastrointestinal Tract: A Comparative Study of Eutrophic, Overweight and Obese Individuals. *Genes* **2019**, *10*, 349. [[CrossRef](#)]
32. Sánchez-Osuna, M.; Cortés, P.; Barbé, J.; Erill, I. Origin of the Mobile Di-Hydro-Pteroyl Synthase Gene Determining Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. de Souza, M.M.S.; Coelho, S.D.M.; Coelho, I.D.S.; Soares, B.D.S.; da Motta, C.C.; de Melo, D.A.; Dubenczuk, F.C.; Santiago, G.S.; Pimenta, R.L.; Marques, V.F.; et al. Antimicrobial Resistance in Animal Production: An Overview. *Braz. J. Vet. Med.* **2016**, *38*, 68–74.
34. Koike, S.; Mackie, R.; Aminov, R.; Mirete, S.; Pérez, M.L. Agricultural use of antibiotics and antibiotic resistance. *Antibiot. Resist. Genes Nat. Environ. Long Term Eff.* **2017**, 217–250.
35. Marosevic, D.; Kaevska, M.; Jaglic, Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage—A review. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2017**, *24*, 338–344. [[CrossRef](#)]
36. Niestępski, S.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E.; Aguilera-Areola, M.G.; Contreras-Rodríguez, A.; Filipkowska, Z.; Osińska, A. The emergence of antimicrobial resistance in environmental strains of the *Bacteroides fragilis* group. *Environ. Int.* **2019**, *124*, 408–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sarkar, A.; Pazhani, G.P.; Dharanidharan, R.; Ghosh, A.; Ramamurthy, T. Detection of integron-associated gene cassettes and other antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* **2015**, *33*, 18–24. [[CrossRef](#)]
38. Santiago-Rodríguez, T.M.; Fornaciari, G.; Luciani, S.; Toranzos, G.A.; Marota, I.; Giuffra, V.; Sangwan, N.; Cano, R.J. Tetracycline-like resistome of ancient human guts. *Hum. Microbiome J.* **2018**, *10*, 21–26. [[CrossRef](#)]
39. Santiago-Rodríguez, T.M.; Fornaciari, G.; Luciani, S.; Dowd, S.E.; Toranzos, G.A.; Marota, I.; Cano, R.J. Gut Microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean Mummy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138135. [[CrossRef](#)]
40. Feng, J.; Li, B.; Jiang, X.; Yang, Y.; Wells, G.F.; Zhang, T.; Li, X. Antibiotic resistome in a large-scale healthy human gut microbiota deciphered by metagenomic and network analyses. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 355–368. [[CrossRef](#)]
41. Hu, Y.; Yang, X.; Qin, J.; Lu, N.; Cheng, G.; Wu, N.; Pan, Y.; Li, J.; Zhu, L.; Wang, X.; et al. Meta-genome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2151. [[CrossRef](#)]
42. Roberts, M. Environmental Macrolide-Lincosamide-Streptogramin and Tetracycline Resistant Bacteria. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Feßler, A.T.; Wang, Y.; Wu, C.; Schwarz, S. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. *Plasmid* **2018**, *99*, 2–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tekiner, S.H.; Özpınar, H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 444–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. De Paula, A.C.L.; Medeiros, J.D.; De Azevedo, A.C.; De Assis Chagas, J.M.; Da Silva, V.L.; Diniz, C.G. Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. *Genes* **2018**, *9*, 106. [[CrossRef](#)]
46. Zieliński, W.; Buta, M.; Hubeny, J.; Korzeniewska, E.; Harnisz, M.; Nowrotek, M.; Płaza, G. Prevalence of Beta Lactamases Genes in Sewage and Sludge Treated in Mechanical-Biological Wastewater Treatment Plants. *J. Ecol. Eng.* **2019**, *20*, 80–86. [[CrossRef](#)]
47. van den Bunt, G.; van Pelt, W.; Hidalgo, L.; Scharringa, J.; de Greeff, S.C.; Schürch, A.C.; Mughini-Gras, L.; Bonten, M.J.M.; Fluit, A.C. Prevalence, Risk Factors and Genetic Characterisation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): A community-Based Cross-Sectional Study, The Netherlands. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Iseppi, R.; Di Cerbo, A.; Messi, P.; Sabia, C. Antibiotic Resistance and Virulence Traits in Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) and Extended-Spectrum β -Lactamase/AmpC-producing (ESBL/AmpC) Enterobacteriaceae from Humans and Pets. *Antibiotics* **2020**, *9*, 152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Schill, F.; Abdulmawjood, A.; Klein, G.; Reich, F. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *257*, 58–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bengtsson-Palme, J.; Angelin, M.; Huss, M.; Kjellqvist, S.; Kristiansson, E.; Palmgren, H.; Larsson, D.G.J.; Johansson, A. The Human Gut Microbiome as a Transporter of Antibiotic Resistance Genes between Continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6551–6560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Adesoji, A.T.; Ogunjobi, A.A.; Olatoye, I.O. Characterization of Integrons and Sulfonamide Resistance Genes among Bacteria from Drinking Water Distribution Systems in Southwestern Nigeria. *Chemotherapy* **2016**, *62*, 34–42. [[CrossRef](#)]
52. Xiong, W.; Sun, Y.; Zhang, T.; Ding, X.; Zhenling, Z.; Wang, M.; Zeng, Z. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. *Microb. Ecol.* **2015**, *70*, 425–432. [[CrossRef](#)]
53. Mu, Q.; Li, J.; Sun, Y.; Mao, D.; Wang, Q.; Luo, Y. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 6932–6940. [[CrossRef](#)]
54. Emachado, E.; Coque, T.M.; Cantón, R.; Sousa, J.C.; Peixe, L. Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 80. [[CrossRef](#)]
55. Caruso, G.; Giammanco, A.; Cardamone, C.; Oliveri, G.; Mascarella, C.; Capra, G.; Fasciana, T. Extra-Intestinal Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Meat. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 8714975. [[CrossRef](#)]
56. Chenia, H.Y. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from South African freshwater fish. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *231*, 26–32. [[CrossRef](#)]
57. Von Wintersdorff, C.J.H.; Penders, J.; Van Niekerk, J.M.; Mills, N.D.; Majumder, S.; Van Alphen, L.B.; Savelkoul, P.H.M.; Wolffs, P.F.G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 173. [[CrossRef](#)]
58. Pham, T.D.M.; Ziora, Z.M.; Blaskovich, M.A.T. Quinolone antibiotics. *MedChemComm* **2019**, *10*, 1719–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Fitzpatrick, D.; Walsh, F. Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, fiv168. [[CrossRef](#)]
60. Cambray, G.; Guerout, A.-M.; Mazel, D. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 141–166. [[CrossRef](#)]
61. WHO. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*; Report of a World Health Organization Consultation; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2000.
62. Cardoso, M.A.; Stocco, P.R. Development of a dietary assessment method for people of Japanese descent living in São Paulo. *Brazil. Cad. Saude Publica* **2000**, *16*, 107–114. [[CrossRef](#)]
63. Sales, R.L.; Silva, M.M.S.; Costa, N.M.B.; Euclides, M.P.; Eckhardt, V.F.; Rodrigues, C.M.A.; Tinoco, A.L.A. Development of a questionnaire to assess food intake of population groups. *Rev. Nutr.* **2006**, *19*, 539–552. [[CrossRef](#)]