



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112017011078-4 B1



(22) Data do Depósito: 27/11/2015

(45) Data de Concessão: 11/05/2021

(54) Título: USOS DE UMA COMPOSIÇÃO PREPARADA A PARTIR DE KIWI OURO SECO

(51) Int.Cl.: A61K 36/185.

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2015 NZ 706405; 28/11/2014 NZ 702454.

(73) Titular(es): ANAGENIX IP LIMITED.

(72) Inventor(es): JULIET ANSELL; PAUL BLATCHFORD.

(86) Pedido PCT: PCT NZ2015050200 de 27/11/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/085356 de 02/06/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/05/2017

(57) Resumo: A presente divulgação abrange composições preparadas de kiwi. Em particular, a invenção abrange composições preparadas das variedades de kiwi ouro de *Actinidia chinensis*. São também englobados métodos para preparar estas composições. Além disso, são englobados ainda métodos de uso destas composições, em particular, para tratar ou prevenir transtornos do sistema gastrointestinal, incluindo entre outros: inflamação, constipação, irregularidade intestinal, desequilíbrios da microbiota, síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal.

USOS DE UMA COMPOSIÇÃO PREPARADA A PARTIR DE KIWI OURO SECO

PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do pedido de patente da Nova Zelândia com o número 702454 depositado em 28 de Novembro de 2014 e do pedido de patente da Nova Zelândia com o número 706405 depositado em 27 de Março de 2015, estando o conteúdo dos mesmos aqui incorporado a título de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere a composições preparadas a partir de kiwis ouro, *Actinidia chinensis*. Estão também relacionados métodos de preparação de tais composições e métodos de uso de tais composições, incluindo métodos de tratamento ou prevenção de transtornos do sistema gastrointestinal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] O trato gastrointestinal contém cerca de 10^{14} células microbianas, consistindo em mais de 1000 espécies ou filotipos, a maioria dos quais residindo no cólon (Rajilic-Stojanovic e Vosm 2014; Qin et al. 2010; Egert et al. 2006). O intestino grosso é um sítio de fermentação metabolicamente ativo, caracterizado por diversas relações microbianas e intrincadas que são parte integrante da saúde humana (Backhed et al. 2005). Os dados experimentais mostraram até que ponto a microbiota colônica e seu hospedeiro humano existem em um delicado estado de equilíbrio. A microbiota tem se mostrado associada a uma ampla gama de benefícios para a saúde, incluindo melhora da maturação e função imunológica, comportamento modificado, regulação da saciedade, inibição de patógenos, aumento da absorção mineral e manutenção do equilíbrio energético (Geurts et al. 2014; Parnell e Reimer 2012; Bravo et al. 2011; Buffie e Pamer 2013).

[004] Esta interdependência entre hospedeiro-microbiota foi ilustrada em um estudo utilizando camundongos e peixe-zebra, onde as microbiotas nativas de cada um foram transplantadas para representantes livres de germes de outras espécies. Verificou-se que a composição pode ser revertida para se assemelhar à da microbiota hospedeira nativa (Rawls et al. 2006). Os desequilíbrios na composição da comunidade microbiana causados pela dieta, genética, idade, estresse ou xenobióticos podem induzir um estado de disbiose que pode promover uma microbiota mais suscetível à doença. O consumo de certos tipos de componentes dietéticos tem uma grande influência sobre as comunidades de microrganismos do cólon, sendo as alterações tipicamente observadas dentro de 24 horas após o consumo (Wu et al. 2011; Parkar et al. 2012).

[005] No trato gastrointestinal humano, *Faecalibacterium prausnitzii* é uma das espécies mais populosas, sendo tipicamente observada em mais de 5% da proporção total da microbiota colônica de adultos saudáveis (Miquel et al. 2013). Os membros do filo Firmicutes, *F. prausnitzii*, são habitantes comensais do intestino grosso humano, com propriedades anti-inflamatórias demonstradas *in vivo* (Sokol et al. 2009; Furet et al. 2010). Baixos níveis de *F. prausnitzii* têm sido associados repetidamente a uma variedade de transtornos intestinais incluindo síndrome do intestino irritável (IBS), atopia, diabetes e doenças inflamatórias do intestino (IBD), tais como a doença de Crohn (CD) e colite ulcerosa (UC) (Sokol et al. 2009; Furet et al. 2010; Rajilic-Stojanovic et al. 2011; Candela et al. 2012; Willing et al. 2010). Estas observações consistentes mostram que uma concentração esgotada de *F. prausnitzii* é um ponto final indesejável e, portanto, qualquer tratamento que pode estimular seletivamente a sua proliferação é provavelmente valioso.

[006] Os mecanismos pelos quais *F. prausnitzii* facilitam os seus efeitos

promotores de saúde foram atribuídos à produção de butirato e aos efeitos anti-inflamatórios. Um estudo com camundongo por Sokol e colaboradores verificou que o sobrenadante de *F. prausnitzii* ou *F. prausnitzii* reduziu a gravidade da colite induzida por produtos químicos, promoveu a síntese de citocinas anti-inflamatórias e atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios são mediados por metabólitos secretados (Sokol et al. 2008). Além disso, *F. prausnitzii* gera grandes quantidades de butirato, bem como algum lactato e formiato, como resultado da fermentação de carboidratos (Duncan et al. 2002; Duncan et al. 2004).

[007] A constipação é um estado comum que pode afetar significativamente a qualidade de vida de um indivíduo, sendo a deficiência comparada com a de estados crônicos graves, tais como diabetes e osteoartrite. Estima-se que até 20% da população mundial sofre desse estado, sendo as mulheres e indivíduos com mais de 65 anos os mais afetados(Attaluri et al. 2011; Udani & Bloom 2013). As complicações que podem surgir da constipação incluem fissuras anais, prolapsos retais e impactação fecal. O esforço para passar fezes pode levar a hemorróidas. Em estágios posteriores de constipação, o abdômen pode se tornar distendido, duro e difusamente sensível. Os casos graves podem apresentar sintomas de obstrução intestinal, por exemplo, vômitos e abdome doloroso, bem como encoprese, onde fezes moles do intestino delgado ultrapassam a massa de matéria fecal impactada no cólon.

[008] É bem conhecido que a perturbação do equilíbrio da microbiota no trato digestivo pode alterar a motilidade intestinal, resultando em constipação (Husebye et al. 2001; Rhee et al. 2001). Além disso, pacientes com constipação intestinal crônica apresentam desequilíbrio na microbiota, caracterizado por uma

diminuição relativa de bactérias benéficas e um aumento de bactérias e fungos potencialmente patogênicos (Khalif et al. 2005). Esses pacientes mostram um aumento significativo nas contagens de *E. coli*, *S. aureus* e enterobactérias (Khalif et al. 2005).

[009] Além disso, uma progressão da doença mais prolongada da constipação crônica leva a pontuações mais elevadas para microrganismos indesejáveis, e as pontuações mais baixas para os desejáveis (Khalif et al. 2005). Em um estudo com crianças diagnosticadas com constipação crônica, a disbiose intestinal foi encontrada nas fezes, com aumento significativo nas contagens de *Clostridium*, *Bacteroides* e *E. coli* (Zoppi et al. 1998). Um estudo particular encontrou uma diminuição significativa na contagem de cepas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nas fezes de indivíduos constipados; tal diminuição é até dez vezes menor para o gênero *Bifidobacterium* (Chassard et al. 2012).

[010] As opções de intervenção para a constipação continuam a ser difíceis e desafiadoras, e muitos indivíduos estão insatisfeitos com as terapias e medicamentos atuais. Estes incluem modificações no estilo de vida e na dieta, tais como aumento do consumo de frutas e legumes, suplementação de fibras (metilcelulose, Konjac glucomannan, psyllium), aumento da ingestão de líquidos e exercício, bem como intervenção farmacológica com amaciadores de fezes, laxantes estimulantes e laxantes osmóticos (Attaluri et al. 2011; Leung et al. 2011; Liu 2011).

[011] O uso rotineiro de laxantes é contraindicado, uma vez que os pacientes podem vir a depender de seu uso. Os enemas podem ser usados para fornecer uma forma de estimulação mecânica. Por outro lado, os enemas são tipicamente úteis apenas para fezes no reto, não no trato intestinal. Uma faixa crescente de ervas e

outros produtos naturais (incluindo aloe e ruibarbo (Udani & Bloom 2013)) anunciados para ajudar a laxação foi disponibilizada no mercado. No entanto, há apenas evidências anedóticas sobre sua eficácia e sucesso em proporcionar alívio da constipação.

[012] Em contraste, sabe-se que a fibra é importante na digestão – a fibra solúvel atrai a água que ajuda a retardar a digestão, e a fibra insolúvel adiciona volume às fezes para ajudar à laxação. Enzimas também ajudam a digestão por decompor os grandes compostos dietéticos em peças menores controláveis. Por exemplo, a amilase decompõe o amido em açúcares simples e as proteases decompõem as proteínas em aminoácidos. No entanto, só a suplementação com fibras e enzimas é amplamente ineficaz para a constipação de trânsito lento (atraso prolongado no trânsito das fezes através do cólon) e transtornos defecatórios. Além disso, tal suplementação pode ter efeitos secundários indesejados tais como produção excessiva de gás e inchaço incômodo.

[013] Os kiwis verdes (por exemplo, *Actinidia deliciosa* var. Hayward) foram destacados como um produto eficaz na área da digestão com vários estudos que agora demonstram a sua eficácia (Stonehouse et al. 2012). O consenso atual é que o efeito de laxação do kiwi verde parece ser principalmente devido à sua fibra dietética e ao conteúdo de enzima (Chang et al. 2010; Rush et al. 2002, Stonehouse et al. 2012, Drummond & Gearry 2013).

[014] Em contraste, os kiwis ouro (por exemplo, *Actinidia chinensis* var. Hortl6A) não são tradicionalmente associados à laxação (Ferguson 2003; Rush 2002). Foi observado que o kiwi ouro tem pouco/nenhum índice da actinidina e menos fibra dietética que o kiwi verde. A variedade Hortl6A de kiwis foi investigada quanto a seu efeito sobre a imunidade (Hunter et al 2012, Skinner 2012), com a

afirmação de que os efeitos laxantes reduzidos ou menores do kiwi ouro o tornam a escolha ideal para reforçar naturalmente a imunidade, particularmente em crianças onde o aumento da laxação pode não ser desejável (Adaim 2010).

[015] Dada a ocorrência de transtornos gastrointestinais na população, há uma necessidade de novas composições, particularmente, composições derivadas de fontes naturais, para restaurar e manter a saúde digestiva.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[016] Em um aspecto, a invenção compreende um método de preparação de uma composição de kiwi, compreendendo:

obter kiwis ouro que é uma variedade de Gold3 ou um derivado genético do mesmo;

remover as peles do kiwi e formar um purê para um tamanho de peneira inferior a 1 mm; e

secar o purê e produzir um pó.

[017] Em vários aspectos:

O método compreende ainda a remoção das sementes do kiwi antes da formação de purê.

O método compreende ainda purificar o kiwi para obter puré com um valor de Brix de 16 a 21°.

O método compreende ainda purificar o kiwi para obter puré com uma viscosidade de 11,0 a 13,0, ou 10,0 a 14,0, medida a 12,5° Brix, 20°C.

O método compreende ainda a liofilização do purê e a moagem para produzir o pó.

O método compreende ainda o enriquecimento da composição para polifenois.

O método compreende ainda a adição de polifenois à composição.

O método compreende ainda a secagem do purê durante 24 a 56 horas.

O método compreende ainda a liofilização do purê durante 40 a 56 horas.

[018] Em um outro aspecto, a invenção compreende uma composição preparada a partir de kiwi ouro seco, em que o kiwi ouro seco é um kiwi Gold3 ou um derivado genético do mesmo. O pó pode ser produzido por um método de qualquer um dos aspectos anteriores.

[019] Em vários aspectos:

A composição é formulada para administração entérica.

A composição é formulada para administração oral.

A composição é formulada como um comprimido ou uma cápsula.

A cápsula é uma cápsula de gel.

O comprimido ou cápsula é formulado de modo a compreender 400 a 800 mg do pó.

Alternativamente, a cápsula é formulada para compreender 100 a 1000 mg do pó.

A composição é formulada como um líquido.

O líquido é formulado para compreender 400 a 800 mg do pó por unidade de dosagem.

A composição é formulada como uma geleia ou um sachê.

A composição é formulada em combinação com um auxiliar digestivo adicional.

A composição é formulada em combinação com uma ou mais composições dentre composição prebiótica, probiótica ou simbiótica.

A composição é formulada em combinação com fibra e/ou uma enzima

digestiva.

A composição é suplementada com polifenois.

[020] Em um outro aspecto, a invenção compreende um método para tratar ou prevenir a constipação, ou para manter ou melhorar a regularidade intestinal, compreendendo:

administrar a um indivíduo uma composição de qualquer um dos aspectos anteriores, desse modo, tratando ou prevenindo a constipação, ou mantendo ou melhorando a regularidade intestinal, no indivíduo.

[021] Em vários aspectos:

A composição é administrada por via entérica.

A composição é administrada por via oral ou por via retal.

A composição é administrada como um comprimido, cápsula ou líquido.

A composição é administrada como uma geleia ou um sachê.

A cápsula é uma cápsula de gel.

A composição é administrada em uma dosagem de 2000 a 4000 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

Alternativamente, a dosagem é de 250 a 2500 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido do mesmo.

A composição é administrada em combinação com um auxiliar digestivo adicional.

A composição é administrada em combinação com uma ou mais composições dentre composição prebiótica, probiótica ou simbiótica.

A composição é administrada em combinação com fibra e/ou uma enzima digestiva.

A composição é suplementada com polifenois.

[022] Em um outro aspecto, a invenção compreende um método para tratar ou prevenir o desequilíbrio microbiano no trato digestivo, compreendendo: administrar a um indivíduo uma composição de qualquer um dos aspectos anteriores, desse modo, tratando ou prevenindo o desequilíbrio da microbiota no indivíduo.

[023] Em vários aspectos:

A composição é administrada por via entérica.

A composição é administrada por via oral ou por via retal.

A composição é administrada como um comprimido, cápsula ou líquido.

A composição é administrada como uma geleia ou um sachê.

A cápsula é uma cápsula de gel.

A composição é administrada em uma dosagem de 2000 a 4000 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

Alternativamente, a dosagem é de 250 a 2500 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido do mesmo.

A composição é administrada em combinação com um auxiliar digestivo adicional.

A composição é administrada em combinação com uma ou mais composições dentre composição prebiótica, probiótica ou simbiótica.

A composição é administrada em combinação com fibra e/ou uma enzima digestiva.

A composição é suplementada com polifenois.

[024] Ainda em outro aspecto, a invenção compreende um método para manter ou aumentar as bactérias benéficas no trato digestivo, compreendendo: administrar a um indivíduo uma composição de qualquer um dos aspectos

anteriores, desse modo, mantendo ou aumentando as bactérias benéficas no trato digestivo no indivíduo.

[025] Em vários aspectos:

A composição é administrada por via entérica.

A composição é administrada por via oral ou por via retal.

A composição é administrada como um comprimido, cápsula ou líquido.

A composição é administrada como uma geleia ou um sachê.

A cápsula é uma cápsula de gel.

A composição é administrada em uma dosagem de 2000 a 4000 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

Alternativamente, a dosagem é de 250 a 2500 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido do mesmo.

A composição é administrada em combinação com um auxiliar digestivo adicional.

A composição é administrada em combinação com uma ou mais composições dentre composição prebiótica, probiótica ou simbiótica.

A composição é administrada em combinação com fibra e/ou uma enzima digestiva.

A composição é suplementada com polifenois.

[026] As bactérias benéficas são selecionadas de: o grupo de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., e o grupo de *Lachnospiraceae*.

[027] As bactérias benéficas são selecionadas de: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium coccoides*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia*

intestinalis, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii*, e *Ruminococcus flavefaciens*.

[028] Ainda em outro aspecto, a invenção compreende um método para manter ou aumentar *Faecalibacterium prausnitzii* no trato digestivo, compreendendo:

administrar a um indivíduo uma composição de qualquer um dos aspectos anteriores, desse modo, mantendo ou aumentando *Faecalibacterium prausnitzii* no trato digestivo no indivíduo.

[029] Em vários aspectos:

A composição é administrada como um ou mais dentre um comprimido, cápsula, líquido, geleia ou sachê.

A composição é administrada como um ou mais dentre um comprimido, cápsula, líquido, geleia ou sachê.

A cápsula é uma cápsula de gel.

A composição é administrada em uma dosagem de 2000 a 4000 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

A composição é administrada em uma dosagem de 250 a 2500 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

A composição é administrada em combinação com um auxiliar digestivo adicional.

A composição é administrada em combinação com uma ou mais composições dentre composição prebiótica, probiótica ou simbiótica.

A composição é administrada em combinação com fibra e/ou uma enzima digestiva.

A composição é suplementada com polifenois.

O indivíduo tem um ou mais sintomas de inflamação.

O indivíduo tem um ou mais sintomas de: doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória do intestino, câncer gastrointestinal, alergia, atopia ou diabetes.

[030] Em um outro aspecto, a invenção compreende um método para tratar ou prevenir a síndrome do intestino irritável ou a doença inflamatória do intestino, compreendendo:

administrar a um indivíduo uma composição de qualquer um dos aspectos anteriores, desse modo, tratando ou prevenindo a síndrome do intestino irritável ou a doença inflamatória do intestino no indivíduo.

[031] Em vários aspectos:

A composição é administrada como um ou mais dentre um comprimido, cápsula, líquido, geleia ou sachê.

A composição é administrada como um ou mais dentre um comprimido, cápsula, líquido, geleia ou sachê.

A cápsula é uma cápsula de gel.

A composição é administrada em uma dosagem de 2000 a 4000 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

A composição é administrada em uma dosagem de 250 a 2500 mg de pó por dia, ou um equivalente líquido.

A composição é administrada em combinação com um auxiliar digestivo adicional.

A composição é administrada em combinação com uma ou mais composições dentre composição prebiótica, probiótica ou simbiótica.

A composição é administrada em combinação com fibra e/ou uma enzima

digestiva.

A composição é suplementada com polifenois.

[032] Ainda em outro aspecto, a invenção compreende o uso da composição de qualquer um dos aspectos anteriores para a preparação de um medicamento para:

tratar ou prevenir a constipação, ou manter ou melhorar a regularidade intestinal, em um indivíduo;

tratar ou prevenir um desequilíbrio de microbiota em um indivíduo;

manter ou aumentar as bactérias benéficas no trato digestivo de um indivíduo;

manter ou aumentar *Faecalibacterium prausnitzii* no trato digestivo de um indivíduo; ou

[033] tratar ou prevenir a síndrome do intestino irritável ou a doença inflamatória do intestino em um indivíduo.

[034] O breve sumário anterior descreve de forma ampla as características e as vantagens técnicas de certas modalidades da presente invenção. Outras vantagens técnicas serão descritas na descrição detalhada da invenção e exemplos a seguir.

[035] Novas características que se acredita serem características da invenção serão melhor compreendidas a partir da descrição detalhada da invenção quando consideradas em relação a quaisquer figuras e exemplos anexos. Contudo, as figuras e exemplos aqui fornecidos se destinam a ajudar a ilustrar a invenção ou a auxiliar no desenvolvimento de uma compreensão da invenção, e não se destinam a limitar o escopo da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[036] Figura 1; O teor de polifenois de kiwi verde (Hayward) e ouro (Gold3) em pó pré- e pós-digestão.

[037] Figura 2; Alteração no crescimento de cepas de bactérias quando expostas a água e extratos de DMSO de kiwi ouro (Gold3) em pó digerido.

[038] Figura 3; Efeito do kiwi ouro (Gold3) em pó sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta *in vitro* com o uso de um modelo de fermentação misto.

[039] Figura 4; Esquema de testes de tratamentos, períodos de washout e pontos de amostragem.

[040] Figura 5A: Melhoria no Índice de Saúde Digestiva em participantes com constipação funcional após tratamento com GOLD (Gold3).

[041] Figura 5B: Diferença líquida na abundância de *Faecalibacterium prausnitzii* em participantes com constipação funcional após tratamento com GOLD (Gold3)

[042] Figura 5C: Dados quantitativos de PGR (LOG transformado) mostrando a diferença líquida nos níveis de *Faecalibacterium prausnitzii* em participantes com constipação funcional após tratamento com GOLD (Gold3).

[043] Figura 6; Dados de LightCycler® 480 qPCR apresentando grupos bacterianos como o número médio de cópias do gene 16S rRNA/grama de amostra fecal (linha superior LOG transformado, linha inferior dados naturais) calculado e o erro padrão da média (SEM) como barras de erro antes e após cada período de tratamento no grupo saudável.

[044] Figura 7; Dados de LightCycler® 480 qPCR apresentando grupos bacterianos como o número médio de cópias do gene 16S rRNA/grama de amostra fecal (linha superior LOG transformado, linha inferior dados naturais) calculado e o erro padrão da média (SEM) antes e após cada período de tratamento no grupo

com constipação funcional.

Descrição detalhada da invenção

[045] A descrição a seguir apresenta inúmeras configurações exemplificadoras, parâmetros e semelhantes. Deve-se reconhecer, no entanto, que tal descrição não pretende ser uma limitação do escopo da presente invenção, mas é, em vez disso, fornecida como uma descrição das modalidades exemplificativas.

[046] Todas as referências, incluindo patentes e pedidos de patente, citadas neste relatório descritivo são aqui incorporadas a título de referência. Não se admite que qualquer referência constitua a técnica anterior. Nem a discussão de qualquer referência constitui uma admissão de que essa referência faz parte do conhecimento geral comum na técnica, na Nova Zelândia ou em qualquer outro país.

Definições

[047] Em cada caso aqui, nas descrições, modalidades e exemplos da presente invenção, os termos "compreendendo", "incluindo", etc., devem ser lidos de forma expansiva, sem limitação. Dessa forma, a menos que o contexto exija claramente o contrário, ao longo da descrição e das reivindicações, as palavras "compreende", "compreendendo", e semelhantes, devem ser interpretadas em um sentido inclusivo como opostas a um sentido exclusivo, ou seja, no sentido de "incluindo, mas não limitado a".

[048] "Regularidade intestinal" significa ter movimentos intestinais regulares, por exemplo, em uma base diária ou semanal. Embora a regularidade se diferencie de pessoa para pessoa, um número esperado de evacuações pode variar de pelo menos quatro vezes por semana para pelo menos uma vez por dia. Uma "melhoria" na regularidade significa um aumento em pelo menos uma

evacuação por semana.

[049] O termo "irregularidade do intestino" significa que a regularidade das evacuações foi comprometida. Isto pode significar, por exemplo, um período de tempo aumentado entre as evacuações, ou uma diminuição no número esperado de evacuações por dia ou por semana. Por exemplo, uma redução em pelo menos uma evacuação por semana pode indicar uma irregularidade intestinal.

[050] Como usado aqui "constipação" significa ter um ou mais sintomas de estar constipado, por exemplo, um ou mais dentre: esforço durante um movimento intestinal; fezes duras ou grumosas; sensação de obstrução ou bloqueio anorrectal; sensação de evacuação incompleta; manobras manuais para facilitar a defecação; ou três ou menos evacuações em uma semana.

[051] Um "auxiliar dietético" é uma composição que auxilia na digestão ou outros aspectos do sistema digestivo, por exemplo, fibra solúvel e insolúvel, enzimas digestivas, probióticos, prebióticos e simbióticos. São incluídas como auxiliares digestivos as composições que compreendem um ou mais dentre psyllium, metilcelulose, glucomanano, magnésio, linhaça, pálula, gengibre, aloé (por exemplo, sumo de aloé vera) e ruibarbo.

[052] Uma "enzima digestiva" é uma enzima que auxilia na função do sistema gastrointestinal. Estão incluídas actinidina, amilase, protease, lipase, lactase, maltase, sucrase e celulase.

[053] "Trato digestivo" e "trato gastrointestinal" referem-se ao sistema digestivo (isto é, sistema gastrointestinal) de um ser humano e de outro animal. Isso inclui o esôfago, estômago, intestino delgado, incluindo o duodeno, jejuno e íleo, intestino grosso, incluindo o ceco, cólon ascendente, transverso, descendente, sigmoide e reto. "Intestino" é um sinônimo para o trato intestinal.

[054] Um "transtorno" do trato digestivo inclui uma doença ou outro estado que afeta o sistema digestivo (isto é, sistema gastrointestinal), que pode ser um estado agudo ou crônico, tal como inflamação, constipação, irregularidade do intestino, desequilíbrio de microbiota (por exemplo, níveis reduzidos de organismos benéficos, razões alteradas de organismos benéficos e/ou níveis aumentados de organismos deletérios). Os transtornos particulares incluem a doença inflamatória do intestino e a síndrome do intestino irritável. Outros transtornos são descritos em detalhe aqui.

[055] "Gold3" refere-se a uma variedade particular de kiwis ouro também conhecidos como 'Zesy002', e comercializado como kiwi ZESPRI® SUNGOLD. Um pedido de direitos sobre a variedade vegetal da Nova Zelândia foi feito em 25 de junho de 2009 para Gold3 sob o número de pedido K1W042. O nome botânico para o kiwi ouro Gold3 é *Actinidia chinensis* Planch.

[056] Um "derivado genético" de uma variedade de kiwi ouro (por exemplo, variedade Gold3) refere-se a cultivares descendentes, mutantes (sports) ou outras cultivares que são obtidas a partir do estoque original de kiwi ouro. Isto inclui descendentes obtidos a partir de um cruzamento genético com o kiwi ouro original, por exemplo, progênie F1 ou progênie F2. O termo "derivado genético" pode se referir à própria planta derivada, ou a seu fruto.

[057] "Inflamação" refere-se a um estado caracterizado por uma ou mais dentre: vasodilatação, calor, vermelhidão, dor, inchaço, edema, lesões, fissuras, ulcerações, extravasamento de leucócitos e perda de função. Estão incluídas ambas as formas aguda e crônica de inflamação, a última das quais incluindo transtornos inflamatórios, por exemplo, doenças autoimunes. É particularmente incluída a doença inflamatória do intestino. Outros transtornos inflamatórios são descritos

em outra parte deste documento.

[058] Conforme observado aqui, os termos "lioofilização" e "secagem por congelação" são utilizados de forma sinônima. Será compreendido que os termos "secagem por congelação"/"lioofilização" não excluem o uso de temperaturas mais elevadas (isto é, superiores às temperaturas de congelação). Por exemplo, temperaturas mais elevadas podem ser utilizadas para remover a umidade residual durante a fase de secagem secundária para procedimentos de liofilização/secagem por congelação.

[059] "Microbiota", como usado aqui, refere-se a populações de microrganismos que vivem nos tratos digestivos de seres humanos e outros animais. Os termos sinônimos são "microflora" e "microbioma".

[060] Um "desequilíbrio microbiano" (também chamado de "disbiose") é um estado através do qual o número de organismos benéficos no sistema digestivo é reduzido, uma ou mais razões de organismos benéficos são alteradas, e/ou o número de organismos deletérios no sistema digestivo é aumentado. Os organismos benéficos podem incluir, por exemplo, bactérias produtoras de ácido láctico e bactérias produtoras de butirato. Os organismos benéficos particulares incluem, mas não se limitam a, cepas de *Bifidobacterium*, cepas de *Bacteroidaceae* como *Bacteroides fragilis*, e também bactérias fecais, tais como bactérias benéficas do grupo filogenético *Clostridium leptum*, incluindo *Faecalibacterium prausnitzii*. São também incluídos *Clostridium coccoides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus bromii*, e *Ruminococcus flavefaciens*. Também são incluídos organismos benéficos dos grupos de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Lachnospiraceae*, e *lactobacilos*. Os organismos deletérios podem

incluir, como exemplos não limitativos, cepas de *Staphylococcus* e *Salmonella*, bem como membros dos grupos *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellacea*, *Veillonellacea*, e *Fusobacteriacea*.

[061] Um "prebiótico" é uma composição que aumenta o número e/ou a atividade de organismos benéficos no sistema digestivo. Tipicamente, um prebiótico comprehende componentes fermentáveis e produz mudanças positivas (por exemplo, níveis, atividades ou razões melhoradas) nas populações de bactérias benéficas na microbiota gastrointestinal. Isto inclui, por exemplo, bactérias produtoras de ácido láctico e/ou bactérias produtoras de butirato. Exemplos específicos de organismos benéficos incluem cepas de *Bifidobacterium* e cepas de *Faecalibacterium*, incluindo cepas de *Faecalibacterium prausnitzii*, e também cepas de *Bacteroidacea* como *Bacteriodes fragilis*. São também incluídos *Clostridium coccoides*, *Bacteriodes thetaiotaomicron*, *Bacteriodes ovatus*, *Bacteriodes cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii*, e *Ruminococcus flavefaciens*. Também são incluídos os grupos de *Bacteriodes-Prevotella-Porphyromonas*, *Lachnospiracea*, e *lactobacilos*, bem como outros organismos aqui descritos.

[062] Um "probiótico" é uma composição que comprehende um ou mais organismos benéficos que colonizam o sistema digestivo, incluindo o cólon, por exemplo, bactérias produtoras de ácido láctico e/ou bactérias produtoras de butirato. Organismos benéficos específicos incluem cepas de *Bifidobacterium* e cepas de *Faecalibacterium*, incluindo cepas de *Faecalibacterium prausnitzii*, e também cepas de *Bacteroidacea* como *Bacteriodes fragilis*, bem como outros organismos descritos aqui.

[063] Um "simbiótico" é uma composição que combina um ou mais agentes

prebióticos e um ou mais organismos probióticos.

[064] Como usado aqui, um “sujeito” pode ser um animal humano ou não humano, particularmente, um mamífero, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, suínos, cavalos e outros animais de pecuária, incluindo, também, cães, gatos e outros animais domesticados.

[065] "Tratamento", como usado aqui, pretende significar a redução, melhoria ou resolução de um transtorno, por exemplo, um transtorno gastrointestinal, tal como uma doença ou outro estado do sistema gastrointestinal. Um tratamento resultará na redução, melhoria ou eliminação de um ou mais sintomas do transtorno.

[066] "Prevenção", como usado aqui, pretende significar parar ou retardar o aparecimento de um transtorno, por exemplo, um transtorno gastrointestinal, tal como uma doença ou outro estado do sistema gastrointestinal. Uma medida preventiva resultará na paralisação ou atraso de um ou mais sintomas do transtorno, ou uma diminuição dos sintomas, se os mesmos surgirem.

Kiwi ouro e bioatividade associada

[067] Gold3 é uma nova variedade de kiwis ouro desenvolvida por Zespri®, que se constatou ter uma tolerância a *Pseudomonas syringae pv actinidiae* (Psa; uma doença bacteriana da videira de kiwi) e está substituindo a variedade Hortl 6A como a nova variedade de ouro comercial de escolha na Nova Zelândia. A variedade Gold3 de kiwi é semelhante em composição nutricional à sua antecessora, tendo menos teor de fibra dietética e de actinidina do que o kiwi verde (Tabela 1).

Tabela 1: Teor nutricional de todo o kiwi

	Propriedades nutricionais médias das amostras colhidas 2009/10 ¹			
Componente	Unidades	Kiwi Ouro (<i>Actinidia chinensis</i>)		Kiwi Verde (<i>Actinidia deliciosa</i>)
		Gold3	Hort16A	Hayward
Vitamina C	mg/100 g	133	92	89
Vitamina E	IU/100 g	1,4	2,1	1,4
Fibra dietética solúvel	g/100 g	2,1	2,2	3,6
Fibra dietética insolúvel	g/100 g	<1	1,1	2,1
Beta caroteno	mg/100 g	0,016	0,025	0,023
Alfa caroteno	mg/100 g	<0,005	<0,005	<0,005
Açúcar total	g/100 g	12,7	12,4	9,5
Ácido fólico	mg/100 g	21,4	24,6	29,9
Oxalato	Rafídeos/g	585	1267	965
Actinidina	FU/100 g	88	3,4	334
Nitrogênio	mg/100 g	164	148	135
Fósforo	mg/100 g	25,3	23,8	26,8
Potássio	mg/100 g	327,5	305	335
Cálcio	mg/100 g	23	31,8	35,3
Magnésio	mg/100 g	12,7	15,4	15,3
Enxofre	mg/100 g	15,2	15,3	14,8
Ferro	mg/100 g	0,265	0,267	0,323
Boro	mg/100 g	0,333	0,385	0,33
Cobre	mg/100 g	0,106	0,131	0,095
Manganês	mg/100 g	0,055	0,087	0,139
Zinco	mg/100 g	0,073	0,106	0,104
Sódio	mg/100 g	< 1	1,78	1,61

¹ guia de informações de novas variedades Zespri® 2010.

[068] Uma vez que as variedades kiwi ouro contêm níveis mais baixos de fibra

e actinidina, os componentes considerados como sendo principalmente responsáveis pelos efeitos de laxação de kiwis verde, seria de esperar que um produto derivado de kiwi ouro teria um menor efeito laxante do que um derivado do kiwi Hayward verde.

[069] Surpreendentemente, os inventores verificaram que o pó derivado de kiwi Gold3 (GOLD) melhorou a laxação ao mesmo grau que o pó derivado de kiwi Hayward verde (ACTAZIN™) em indivíduos saudáveis (ver Exemplos 5 e 6, aqui a seguir). Estes resultados sugerem que outros componentes bioativos de kiwi presentes no pó de Gold3 podem ter um maior impacto sobre o efeito de laxação observado do que dita a convenção atual. As composições são, portanto, úteis para melhorar ou manter a regularidade do intestino e/ou tratar ou prevenir a constipação.

[070] Embora não pretendendo se ater a nenhuma teoria, postula-se que os polifenois podem ser ingredientes ativos importantes nas variedades de kiwi ouro, em especial, na variedade Gold3 de kiwi. Postula-se que a eficácia observada para a laxação pode ser atribuível à combinação da fibra, enzimas, carboidratos prebióticos, e polifenois na fruta.

[071] Os polifenois são compostos que ocorrem naturalmente em plantas, caracterizados pela presença de uma ou mais unidades de fenol. Acredita-se que pelo menos alguns dos benefícios para a saúde dos polifenois surgem através do favorecimento do crescimento de bactérias benéficas e pelas bactérias convertendo os polifenois em outros compostos bioativos que são absorvidos na corrente sanguínea e exercem efeitos tanto no intestino como em outras partes do corpo (Seeram 2014; Cardona et al. 2013).

[072] Estima-se que 90 a 95% do consumo total de polifenois se acumula no

côlon onde os compostos fenólicos são submetidos a metabolismo por micróbios intestinais para gerar metabólitos de baixos pesos moleculares. Estes metabólitos são absorvíveis e podem ser atribuíveis para os efeitos de saúde observados dos polifenois (Cardona et al. 2013).

[073] Com base nos resultados aqui apresentados, os inventores acreditam que os polifenois das variedades de kiwi ouro, por exemplo, Gold3 ou seus derivados, podem ter a capacidade de atuar como prebióticos. Os pesquisadores no campo descreveram os prebióticos como "ingredientes seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal, conferindo assim benefício(s) sobre a saúde do hospedeiro" (Gibson et al. 2010).

[074] Em particular, o kiwi ouro tem teores mais elevados de polifenois que o kiwi verde (ver, por exemplo, Drummond 2013; ver também Tabela 5, no presente documento). Além disso, estudos in vitro dos inventores mostraram que kiwi ouro Gold3 em pó digerido (digestão gastrointestinal superior simulada) tem um perfil de polifenol alterado em comparação com a pré-digestão (ver Exemplo 2); no entanto, o teor fenólico geral é mantido. Embora o kiwi verde em pó também tenha um perfil de polifenol alterado pós-digestão, o teor global é reduzido por digestão (ver Exemplo 2).

[075] A partir daí, os inventores concluem que os polifenois presentes no kiwi ouro Gold3 em pó estão sobrevivendo a digestão no estômago, melhor do que os no kiwi verde em pó. Isto significa que os polifenois do kiwi ouro, tal como a variedade Gold3 de kiwi estão disponíveis para a biotransformação em diferentes compostos fenólicos.

[076] Sem se ater à teoria, acredita-se que o kiwi ouro Gold3 tem um perfil

único rico em ácido clorogênico, E-cafeoil-3-glicosídeo, florizina, procianidina B2, e queracetina. Acredita-se que estes compostos fenólicos permanecem 'não digeridos' e, portanto, transitam para o cólon, onde são metabolizados pela microbiota intestinal em metabólitos (derivados fenólicos). Estes derivados podem ser absorvidos e passam a interagir em outras vias metabólicas e trazem benefícios para a saúde, incluindo a laxação facilitada.

[077] Sabe-se que a via de fenilpropanoide produz a maior parte dos compostos fenólicos presentes em plantas. Os fenilpropanoides controlam os sistemas de reparação, crescimento e defesa de plantas (sistemas imunológicos), e a sua interação com os micróbios benéficos e predadores benéficos (sistemas tróficos). Assim, é possível que os compostos fenólicos na variedade Gold3 possam ser responsáveis tanto por pela resistência da planta à praga como pelos benefícios digestivos do pó derivado de Gold3, tal como aqui divulgado.

[078] Os inventores também constataram que o kiwi ouro Gold3 em pó contém componentes resistentes à digestão, que são conhecidos por ter propriedades prebióticas (ver Exemplo 4). Estes componentes auxiliam na modulação da microbiota intestinal, e estimulam a produção de metabólitos, tais como ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs; ver Exemplo 4), que são atribuídos com vários benefícios para a saúde.

[079] Além disso, os inventores constataram que o kiwi ouro Gold3 em pó influencia o padrão de crescimento da microflora intestinal, estimulando o crescimento de bactérias benéficas em relação às bactérias prejudiciais (ver Exemplo 3). Notavelmente, os inventores também constataram um aumento significativo na abundância relativa de *Faecalibacterhim prausnitzi* em amostras fecais de pacientes com constipação tratados com kiwi ouro Gold3 em pó (Exemplos

7 e 8). Este aumento de bactérias benéficas, incluindo *F. prausnitzii*, foi confirmado por análise por PCR quantitativa (Exemplos 9 e 10).

[080] Esta é uma descoberta significativa uma vez que as concentrações empobrecidas de *F. prausnitzii* estão associadas com transtornos gastrointestinais, e em particular, com estados inflamatórios do trato gastrointestinal. Nota-se que níveis reduzidos de *F. prausnitzii* têm sido associados, especificamente, com a síndrome do intestino irritável (IBS) e doença inflamatória do intestino (IBD), bem como outros estados clínicos. Ver, por exemplo, Sokol et al. 2008; Sartor 2011. Ver também, mais adiante.

[081] Deste modo, é evidente que os kiwis Gold3 ouro e seus derivados genéticos podem ser usados nas composições para: tratar ou prevenir a constipação, manter ou melhorar a regularidade do intestino, tratar ou prevenir o desequilíbrio da microbiota, manter ou aumentar as bactérias benéficas no trato digestivo, manter ou aumentar *F. prausnitzii* no trato digestivo, e/ou tratar ou prevenir a síndrome do intestino irritável ou doença inflamatória do intestino. Outros usos para a composição são descritos em detalhe nesse documento.

Métodos para produção de composições de kiwi

[082] A presente invenção se refere, em geral, a uma composição preparada a partir de kiwi ouro. Em um aspecto particular, a composição é preparada a partir de *Actinidia chinensis*. De preferência, é usada a variedade Gold3 (também conhecida como G3) de kiwi ouro. Em outros aspectos, podem ser usados um ou mais derivados genéticos da variedade kiwi ouro. Por exemplo, pode ser desejável usar a progênie F1 ou F2 de um cruzamento genético que inclui o estoque principal da variedade de kiwi ouro. Alternativamente, quaisquer cultivares mutantes ou outros cultivares obtidos a partir do original podem ser utilizadas.

[083] A composição pode ser preparada na forma de pó, por exemplo, um pó liofilizado, ou em qualquer outra forma de dosagem adequada. Em certos aspectos, pode ser desejável formular o pó em comprimidos (incluindo comprimidos se dissolução rápida) ou cápsulas (incluindo cápsulas de liberação prolongada). Os comprimidos podem ser comprimidos ranhurados, comprimidos mastigáveis, comprimidos efervescentes, comprimidos orodispersíveis, ou comprimidos para formar uma suspensão. As cápsulas podem ser cápsulas de gelatina, incluindo cápsulas de gelatina produzidas por encapsulamento de gel em peça única e encapsulamento de gel em duas peças. As cápsulas que não são de gelatina também estão incluídas, bem como pílulas. O pó pode ser fornecido na forma de fluxo livre ou como um bolo sólido. A composição pode ser fornecida como um pó para formar uma suspensão, um pó para formar uma solução, grânulos orais a granel, ou pó oral a granel. Alternativamente, a composição pode formulada como um tônico, elixir, linctus, concentrado, xarope, solução, suspensão, emulsão, quantidades em goles, purê, pasta, ou como gotas. Em outros aspectos, a composição pode ser formulada como um gel ou geleia. A composição pode ser fornecida em forma de sachê, por exemplo, um sachê em pó, ou um sachê de gel ou geleia. São também incluídas formulações que compreendem tiras finas, ou que compreendem sólidos em uma cápsula para misturar com o alimento ou bebida. Outras fórmulas são também possíveis, como descrito aqui abaixo.

[084] As composições da invenção podem ser preparadas a partir de um puré de kiwi ouro obtido de uma ou mais fontes comerciais. De preferência, o puré de kiwi ouro teve tanto as sementes como a pele removida. É também preferido que o purê tenha sido preparado com um tamanho de peneira de cerca de 1 mm ou menos. Prefere-se ainda que o purê tenha uma viscosidade (medida a 12,5° Brix,

20°C) de cerca de 12,0; ou pode variar de 10,0 a 14,0; ou de 11,0 a 13,0; ou de 11,75 a 12,25; ou um de 11,8 a 12,2; ou de 11,9 a 12,1; ou pode ser de cerca de 11,0, de cerca de 11,25, de cerca de 11,7, de cerca de 11,8, de cerca de 11,9, de cerca de 12,1, de cerca de 12,2, de cerca de 12,3, ou de cerca de 12,5.

[085] O pH do purê pode variar de 3,2 a 3,8; ou 3,0 a 4,0; ou 3,1 a 3,9; ou pode ser de cerca de 3,1, de cerca de 3,2, de cerca de 3,3, de cerca de 3,4, de cerca de 3,5, de cerca de 3,6, de cerca de 3,7, de cerca de 3,8, de cerca de 3,9, ou de cerca de 4,0. Em algumas circunstâncias, pode ser desejável ajustar o pH do purê ou da composição final para aproximar os níveis fisiológicos. Em particular, pode ser útil a obtenção de uma faixa de pH de 6,0 a 8,0; ou de 6,5 a 7,5; ou de 6,8 a 7,2; ou um pH de cerca de 6,5, cerca de 6,7, cerca de 6,8, cerca de 6,9, cerca de 7,0, cerca de 7,1, cerca de 7,2, cerca de 7,3, cerca de 7,4, ou cerca de 7,5.

[086] Em certos aspectos, as composições da invenção podem ser preparadas por tecnologia de "polpação macia" referida na Patente da Nova Zelândia nº 235972 (que é aqui incorporada por referência), que pode ser adaptada para produzir um suco de kiwi ouro polpudo.

[087] Em estágios preparatórios iniciais, os kiwis ouro podem ser submetidos a um processo de pré-tratamento que pode incluir as etapas bem conhecidas de amadurecimento, inspeção, classificação e/ou seleção dos kiwis. Com respeito ao amadurecimento, é preferencial utilizar kiwi ouro amadurecido ou maduro quando se produzem as composições de acordo com a invenção; no entanto, material apodrecido ou em decomposição é, de preferência, evitado.

[088] O amadurecimento pode ser avaliado usando métodos amplamente conhecidos e utilizados na técnica. O amadurecimento pode ser medido antes da colheita ou processamento do kiwi ouro. Em particular, o amadurecimento pode

ser medido usando o sistema de Brix. O kiwi ouro com um nível de açúcar que varia de 16 a 21°Brix; ou 14° a 23°Brix; ou 15° a 22°Brix; ou cerca de 14°, cerca de 15°, cerca de 16°, cerca de 17°, cerca de 18°, cerca de 19°, cerca de 20°, cerca de 21°, cerca de 22°, ou cerca de 23°Brix, pode ser indicativo de amadurecimento.

[089] O kiwi ouro que excede este nível de Brix pode estar excessivamente maduro ou em fermentação e pode não produzir uma composição ideal. Os kiwis com um nível de Brix abaixo do ideal podem ser artificialmente amadurecidos antes do uso. O tempo deixado em armazenamento pode ser suficiente para alcançar o amadurecimento. Por exemplo, o kiwi ouro colhido a cerca de 5°Brix pode subir para acima dos 10°Brix em 4 a 6 semanas em armazenamento a frio a 0°C. Este fruto irá amadurecer para chegar a 12°Brix ou mais após a remoção do armazenamento a frio. Outras alterações na química também ocorrem durante o amadurecimento de modo que o kiwi esteja dentro da faixa ideal de maturação para fornecer um produto otimizado.

[090] Como parte do processamento, os kiwis ouro podem ser esterilizados. A fruta pode ser passada através de um conjunto tendo uma ou mais escovas rotativas para remover qualquer matéria estranha aderente. Técnicas convencionais de lavagem podem então ser utilizadas. Por exemplo, é possível usar uma série de bicos de pulverização para lavar os kiwis. Os aditivos de lavagem que auxiliam na limpeza ou na redução das contagens de bactérias dos kiwis podem ser utilizados de acordo com os regulamentos e as exigências locais. Por exemplo, o fruto pode ser lavado com uma lavagem de cloro e/ou uma lavagem de água impregnada com ozônio seguido por uma lavagem com água doce.

[091] O kiwi ouro esterilizado pode então ser transportado para dentro de um distribuidor. Este pode ser afunilado para formar um funil para dirigir o kiwi, um

a um, ao conjunto de corte. O conjunto de corte pode incluir um dispositivo de corte tal como um laser de água ou semelhante, que tem a vantagem de evitar danos à semente para que a semente da fruta não contamine a polpa. Outros dispositivos de corte apropriados incluem lâminas circulares rotativas, lâminas de reciprocidade, dispositivos de corte com jato fluido, lâminas oscilantes, etc.

[092] O dispositivo de corte pode cortar o kiwi ouro substancialmente no meio, por exemplo, no seu comprimento. Alternativamente, o dispositivo de corte pode ser substituído por um dispositivo de esmagamento macio capaz de romper a pele dos kiwis. De preferência, isto é feito sem causar dano celular significativo aos kiwis. Por exemplo, o kiwi ouro pode ser dirigido entre os rolos para se obter a ruptura da pele do kiwi. Em particular, o kiwi pode ser rebentado por passagem da fruta através de rolos espaçados inclinados um para o outro. Este método pode ser usado para espremer a fruta de modo que a pele é separada. O kiwi rebentado permanece substancialmente intacto, mas facilmente separável em grandes fragmentos. Outros métodos de ruptura podem ser usados.

[093] Após o corte, os segmentos de kiwi ouro podem ser passados através de um conjunto de prensagem destinado a separar a pele da polpa. O conjunto de prensagem pode ser adaptado para realizar um processo de polpação ou Trituração. Tal processo pode ser relativamente leve e suave ("polpação macia") em comparação com as técnicas de polpação de fruta convencionais. Com a polpação macia, não ocorre desintegração ou lise significativa de células de frutas ou componentes. De preferência, apenas uma pequena proporção (geralmente menos de 5 a 10%) de sementes é fragmentada por este processo. São excluídos dos processos de polpação macia os métodos de lise químicos e/ou enzimáticos, técnicas térmicas, técnicas dirigidas à decomposição de células, e técnicas

mecânicas que envolvem a pulverização excessiva de material de fruto.

[094] Em uma modalidade, o conjunto de prensagem realiza a polpação macia do kiwi ouro pressionando os segmentos de kiwi entre uma prensa de correia dupla convergente. As correias de prensagem podem ser múltiplos laços girados em torno de uma série de polias. A distância que separa as correias de prensagem pode diminuir na direção do percurso do kiwi. Desta forma, pode ser exercido um aumento de força sobre o kiwi à medida que o mesmo se desloca ao longo do comprimento do conjunto de prensagem. Isso pode produzir polpação do kiwi sem prejuízo significativo para as sementes. Isto, por sua vez, impede que as sementes contaminem a polpa.

[095] A polpa gerada a partir do conjunto de prensagem pode ser dirigida a um processo de triagem, a fim de separar as sementes da polpa. Em particular, a polpa pode ser separada da semente, utilizando uma técnica de triagem mecânica macia. Por exemplo, um finalizador de polpa pode ser usado. Este inclui um impulsor flexível rotativo que é girado no interior de uma peneira em forma de cone, com aberturas de um tamanho predeterminado. Em aspectos particulares, o tamanho das aberturas é selecionado para permitir que a polpa e o suco do kiwi passem através da peneira, mantendo uma porção substancial, senão a totalidade, das sementes no interior da cavidade interna definida pela peneira.

[096] Em certos aspectos, pode ser preferencial usar uma pasta em vez de um purê do kiwi ouro. Uma pasta de kiwi pode ser feita como um concentrado. Por exemplo, a fruta pode ser aquecida durante várias horas, coada, e reduzida a uma forma concentrada espessa. A fruta pode ser aquecida depois da remoção das peles, ou após o processo de polpação ou de formação de purê. A fruta pode ser aquecida gradualmente, e depois mantida aquecida a uma temperatura moderada,

com mistura. Depois do espessamento, a pasta pode ser espalhada sobre uma folha plana, ou transferida para uma embalagem, por exemplo, um saco, tubo, frasco, garrafa ou outro recipiente. A pasta pode ser transferida de forma asséptica, de tal modo que seja adequada para consumo humano. De preferência, a pasta de kiwi é produzida a partir de kiwi ouro maduro. De preferência, a pasta é preparada a partir de fruta em polpa. A pasta pode ser uma preparação lisa, e pode compreender um concentrado de cerca de 40° Brix; ou de 30° a 50° Brix; ou de 35° a 45° Brix; ou cerca de 35°, cerca de 36°, cerca de 37°, cerca de 38°, cerca de 39°, cerca de 41°, cerca de 42°, cerca de 43°, cerca de 44°, ou cerca de 45° Brix.

[097] A polpa (por exemplo, na forma de pasta ou purê) pode então ser processada por uma etapa de congelação. Isto pode ser seguido ou utilizado junto com uma etapa de secagem. Em uma modalidade alternativa, a polpa é seca e processada para formar um pó sem uma etapa de congelação intermediária. Por exemplo, métodos envolvendo a secagem em tambor podem ser utilizados. No processo de secagem em tambor, um purê ou pasta pode ser seco a temperaturas relativamente baixas sobre tambores rotativos de alta capacidade, que produzem folhas de produto secas em tambor. Em certos aspectos, um aditivo pode ser utilizado para acelerar ou, então, auxiliar no processo de secagem. Por exemplo, o amido de ervilha ou outros auxiliares de secagem podem ser utilizados. O produto seco pode então ser moído até uma forma de flocos ou pó acabada. Com vantagem, técnicas de secagem em tambor podem ser usadas para produzir uma composição seca que conserva seus componentes principais, por exemplo, compostos fenólicos, e que pode ser facilmente reconstituída usando líquido. Por exemplo, podem ser feitos produtos secos em tambor para serem solúveis em água fria. Como outras alternativas, a secagem por correia ou secagem por convecção pode ser usada. Tais

métodos de secagem são amplamente conhecidos e usadas na técnica.

[098] Se o congelamento for usado, é preferível congelar a polpa logo que possível depois de que a mesma é produzida para manter a frescura. No entanto, a congelação pode ser realizada dentro de 24 ou 48 horas, como necessário. Metodologias de congelação são bem conhecidas e não precisam ser aqui descritas em maiores detalhes. O congelação rápida é particularmente preferida para uso de acordo com a invenção. A polpa pode ser congelada em estacas de tamanho padrão, que são usadas para recolher a polpa fresca após o processamento. A polpa pode ser armazenada congelada (por exemplo, a -18°C) até que seja necessário fazer a composição.

[099] A polpa congelada pode ser seca por congelação, isto é, liofilizada. Técnicas de secagem por congelação são amplamente conhecidas e comumente usadas. O ciclo de secagem por congelação pode ser de cerca de 48 horas; ou pode variar de 40 a 56 horas; ou de 12 a 36 horas; ou 36 a 60 horas; ou cerca de 40 horas, cerca de 42 horas, cerca de 44 horas, cerca de 46 horas, cerca de 48 horas, cerca de 50 horas, cerca de 52 horas, ou cerca de 54 horas. Um ciclo de liofilização mais longo, por exemplo, pelo menos 48 horas ("liofilização suave"), pode ser usado para reter a atividade máxima. Em aspectos particulares, o processo pode ser realizado de tal forma que a formação de água é evitada, e o teor de umidade é minimizado durante o processamento.

[100] Pode ser desejável o uso de um processo de liofilização particular para a obtenção do produto seco. Por exemplo, um programa de secagem por liofilização pode ser usado como parte de um sistema de secagem automatizado. O processo de liofilização pode incluir várias etapas de secagem, por exemplo, com aumentos e reduções graduais de temperatura. De preferência, uma configuração de secagem

primária é usada para sublimação, seguida por uma ou mais configurações de secagem secundárias que são usadas para remover a umidade residual. Em aspectos particulares, a temperatura mais alta do processo de liofilização não excede 70°C. Em outros aspectos, a temperatura do processo de liofilização varia entre -10°C a 70°C. Em um outro aspecto, é usada a liofilização por até 48 horas.

[101] O produto seco resultante pode, depois, ser moído para formar o pó que pode então ser usado como apropriado. Os métodos de moagem são bem conhecidos e amplamente usados na técnica. Tamanhos de malha padrões podem ser usados para produzir o pó, por exemplo, podem ser usados tamanhos de malha US 20, US 23, US 30, US 35, US 40, US 45, ou US 50. O tamanho da peneira para formar o pó pode variar de 1,0 a 0,3 mm; ou 0,84 a 0,4 mm; ou 0,71 a 0,5 mm; ou pode ser de cerca de 1,0 mm, de cerca de 0,84 mm, de cerca de 0,71 mm, de cerca de 0,59 mm, de cerca de 0,5 mm, de cerca de 0,47 mm, de cerca de 0,465 mm, de cerca de 0,437 mm, de cerca de 0,4 mm, de cerca de 0,355 mm, ou de cerca de 0,3 mm.

[102] Para assegurar a mínima degradação dos ingredientes de kiwi, o processo de preparação pode ser realizado a uma temperatura inferior a 40°C. Em várias modalidades, o processo é realizado a uma temperatura variando entre -4°C a 40°C; ou de -1°C a 10°C; ou de 1°C a 6°C; ou de aproximadamente 0°C, aproximadamente 1°C, aproximadamente 2°C, aproximadamente 3°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 5°C, ou aproximadamente 6°C. Estas temperaturas podem ser mantidas durante todo o processo de preparação, incluindo o armazenamento de frutos inteiros, antes de serem rompidos, e durante o processo de polpação/formação de purê. Para resultados ótimos, estas temperaturas são mantidas pelo menos a partir do ponto em que a fruta foi

rompida. O uso de tais temperaturas evita a oxidação do fruto e o uso de agentes redutores. Em certas circunstâncias, pode ser possível obter a certificação orgânica.

[103] O método de processamento é, de preferência, realizado de modo a evitar ou pelo menos minimizar quaisquer danos ou efeitos sobre o material ativo no kiwi ouro. Para assegurar métodos de produção ótimos, as composições resultantes podem ser monitoradas quanto à atividade, por exemplo, quanto ao teor de polifenois. Pode-se esperar que a composição contenha, pelo menos, os seguintes compostos polifenólicos: ácido clorogênico, B-cafeoil-3-glicosídeo, ácido neoclorogênico, florizina, procianidina B2, e queracetina ramnosídeo. Também podem estar presentes: catequina, epicatequina, E-cafeoil-4-glicosídeo, e queracetina rutinosídeo. Os níveis destes polifenois estão indicados aqui abaixo. Ensaios para os polifenois são bem conhecidos na técnica e também estão descritos abaixo. Em particular, é possível medir equivalentes de ácido gálico (GAE) para determinar o teor total de polifenois. Por exemplo, o método de Folin-Ciocalteu (empregando o reagente de Folin-Ciocalteu, também chamado de reagente de fenol de Folin ou reagente de Folin-Denis) pode ser usado para ensaios colorimétricos *in vitro* de compostos fenólicos (Singleton et al. 1999).

[104] Alternativamente ou adicionalmente, as composições podem ser testadas para a estimulação do crescimento de organismos benéficos, por exemplo, Lactobacillus e/ou Bifidobacterium, ou para o aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta, por exemplo, acetato, butirato, e/ou propionato. Estes níveis de crescimento e níveis de ácidos orgânicos estão indicados aqui abaixo. Os ensaios correspondentes são amplamente conhecidos e também descritos em detalhe neste documento. De preferência, as atividades observadas na estimulação do crescimento bacteriano e dos níveis de ácidos orgânicos, e o teor de polifenois

observado estão ainda presentes após a digestão da composição, por exemplo, tal como ensaiado por digestão *in vitro*. Em aspectos particulares, os ensaios de digestão *in vitro* podem ser usados como descrito pelos inventores, neste documento. Outros ensaios *in vitro* são conhecidos e usados na técnica (ver, por exemplo, Kaur et al. 2010).

[105] Em algumas circunstâncias, pode ser possível o uso de derivado genético de estoque de kiwi ouro (por exemplo, estoque de Gold3) para se obter as composições da invenção. Espera-se que uma composição obtida de tal derivado compartilhe uma ou mais das características das composições obtidas do estoque de kiwi ouro. As características exemplificativas incluem: níveis de polifenois e perfis de polifenois, níveis de actinidina, níveis de fibra, níveis de vitamina, estimulação do crescimento de organismos benéficos, e melhoria dos níveis de ácidos orgânicos, como mencionado acima e divulgado em detalhe neste documento.

[106] Em relação ao fruto propriamente dito, espera-se que os kiwis obtidos de um derivado genético possam compartilhar uma composição semelhante constituída como o kiwi ouro original. Por exemplo, o teor de vitamina C do fruto pode ser de 100 a 150 mg; ou de 90 a 200 mg; ou de 80 a 220 mg; ou de cerca de 80 mg, de cerca de 90 mg, de cerca de 100 mg, de cerca de 115 mg, de cerca de 130 mg, de cerca de 140 mg, de cerca de 150 mg, de cerca de 160 mg, de cerca de 170 mg, ou de cerca de 180 mg, por 100 g de fruta. O teor de actinidina do fruto pode ser de 60 a 110 FU; ou de 70 a 100 FU; ou 80 a 90 FU; ou de cerca de 60 FU, cerca de 70 FU, cerca de 80 FU, cerca de 90 FU, cerca de 100 FU, cerca de 110 FU, ou cerca de 120 FU, por 100 g de fruta. O teor total de polifenois do fruto pode ser de 250 a 450 mg de GAE; ou de 200 a 800 mg de GAE; ou de 300 a 600 mg de GAE; ou de 270

a 430 mg de GAE; ou de 280 a 420 mg de GAE; ou de 290 a 410 mg de GAE; ou de 300 a 400 mg de GAE; ou de 310 a 390 mg de GAE; ou de 320 a 380 mg de GAE, por 100 g de fruta.

Composições que compreendem kiwi ouro

[107] Os inventores constataram que kiwi ouro Gold3 em pó inclui ingredientes benéficos que são úteis para a manutenção da saúde do sistema digestivo, bem como o tratamento e prevenção de problemas digestivos e/ou transtornos gastrointestinais. Os inventores demonstraram que o kiwi ouro Gold3 em pó é particularmente eficaz para melhorar a regularidade do intestino. O pó de Gold3 foi também eficaz na estimulação do crescimento de bactérias benéficas em relação às bactérias prejudiciais, e geração de aumentos em *F. prausnitzii*, especificamente.

[108] Deste modo, as composições de kiwi ouro da presente invenção podem ser usadas para sustentar ou melhorar a saúde geral do intestino e/ou para tratar ou prevenir várias doenças ou outras afecções do trato digestivo, incluindo inflamação, constipação, desequilíbrio da microbiota, síndrome do intestino irritável, e doença inflamatória do intestino. Além disso, as composições podem ser usadas para manter ou melhorar a regularidade do intestino, e manter ou aumentar as bactérias benéficas no trato digestivo, incluindo *F. prausnitzii*.

[109] O kiwi ouro em pó pode ser encapsulado, comprimido, ou adicionado ou incorporado em outros produtos. Particularmente englobadas estão as fórmulas de liberação retardada, fórmulas de liberação prolongada, assim como fórmulas para desintegração rápida. As cápsulas de gelatina são especificamente incluídas, assim como sachês e comprimidos mastigáveis. As fórmulas de combinação são adicionalmente incluídas, as quais incluem o pó da invenção misturado com outros

agentes benéficos, por exemplo, um ou mais probióticos, prebióticos, simbióticos, ou outros auxiliares digestivos. Em modalidades alternativas, o pó pode ser reconstituído como um líquido, por exemplo, um concentrado, xarope, suspensão, ou tônico para administração oral, ou como uma composição de enema ou clister para administração retal. Os supositórios retais também estão incluídos.

[110] Em aspectos preferidos, o kiwi ouro em pó resultante é encapsulado, e cada cápsula contém cerca de 500 mg ou cerca de 600 mg do pó seco; ou variando de 50 a 650 mg; de 150 a 850 mg; ou de 200 a 800 mg; de 300 a 700 mg; ou de 550 a 750 mg; ou aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 575 mg, aproximadamente 590 mg, aproximadamente 610 mg, aproximadamente 625 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 675 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, ou aproximadamente 850 mg, do pó seco.

[111] Em certas circunstâncias, pode ser desejável isolar ou enriquecer os polifenois do kiwi ouro. Em particular, pode ser vantajoso usar o kiwi ouro para obter composições enriquecidas com polifenol, concentrados fenólicos, ou composições compreendendo compostos fenólicos isolados. Por exemplo, as composições da invenção podem ser enriquecidas em polifenois de tal modo que a sua concentração é aumentada em relação a dos outros componentes do kiwi ouro, por exemplo, fibras, açúcares e/ou proteínas. Em aspectos particulares, as composições da invenção podem incluir os polifenois que foram isolados (por exemplo, purificados) dos outros componentes do kiwi ouro.

[112] Os métodos de enriquecimento e extração de polifenois são amplamente conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Sun-Waterhouse et al. 2009; Eidenberger et al. 2014). De preferência, a composição resultante tem, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, ou pelo menos 10 vezes a quantidade de polifenois em comparação com a composição preparada sem etapas de enriquecimento ou de isolamento de polifenol. As composições enriquecidas com polifenol, concentrados fenólicos, e composições que compreendem compostos fenólicos isolados podem ser secas como um pó, e usadas de acordo com a presente invenção. Em aspectos particulares, tal pó é encapsulado, e cada cápsula contém aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, ou aproximadamente 350 mg, ou aproximadamente 400 mg, de pó; ou variando de 100 mg a 200 mg; ou de 100 a 300 mg; ou de 200 a 400 mg de pó.

[113] A forma farmacêutica pode conter excipientes, por exemplo, um ou mais antiaderentes, ligantes, revestimentos, desintegrantes, aromatizantes, corantes, edulcorantes, lubrificantes, deslizantes, agentes de fluxo, agentes antiaglomerantes, sorventes ou conservantes. Os excipientes úteis incluem, mas não se limitam a: estearina, estearato de magnésio, e ácido esteárico; sacarídeos e seus derivados, por exemplo, dissacarídeos: sacarose, lactose; polissacarídeos e os seus derivados, por exemplo, amidos, celulose ou celulose modificada, tais como celulose macrocristalina e éteres de celulose, tais como hidroxipropil celulose; álcoois de açúcar tais como isomalte, xilitol, sorbitol e maltitol; proteínas, tais como gelatina; polímeros sintéticos tais como polivinilpirrolidona, polietileno glicol; ácidos graxos, ceras, goma-laca, plásticos e fibras vegetais, por exemplo, zeína de proteína do milho; hidroxipropil metilcelulose; polímeros reticulados, por exemplo,

a polivinilpirrolidona reticulada (crospovidona), e carboximetil celulose de sódio reticulada (croscarmelose de sódio); amido glicolato de sódio; dióxido de silício, sílica fumada, talco e carbonato de magnésio.

[114] Espera-se que as composições de kiwi ouro da presente invenção incluam vários componentes, por exemplo, carboidratos, fibra dietética, polifenois, e actinidina. Em vários aspectos, pode ter de 10 a 20 mg de carboidratos; 0,5 a 5,5 mg de fibra dietética; de 0,1 a 0,5 mg de GAE de polifenois; e de 100 a 500 AU de actinidina, por 25 mg de pó. Em um aspecto específico, pode ter, aproximadamente, 18 mg de carboidratos, aproximadamente 3,0 mg de fibra dietética, aproximadamente 0,28 mg de GAB de polifenois, e aproximadamente 230 AU de actinidina, por 25 mg de pó.

[115] As composições de kiwi ouro da presente invenção podem incluir determinados polifenois como componentes ativos. Os polifenois na composição podem ainda estar presentes após a digestão da composição, por exemplo, digestão in vitro, como descrito em detalhe aqui. Por exemplo, após a digestão, o teor de ácido clorogênico da composição pode ser pelo menos 40 µg/g, pelo menos 45 µg/g, pelo menos 50 µg/g, ou pelo menos 55 µg/g; ou de 40 a 60 µg/g; ou de 45 a 55 µg/g, com base no peso seco. O teor de E-cafeoil-3-glicosídeo da composição pode ser pelo menos 45 µg/g, pelo menos 50 µg/g, pelo menos 55 µg/g, pelo menos 60 µg/g, pelo menos 65, pelo menos 70 µg/g, ou pelo menos 75 µg/g; ou de 40 a 80 µg/g; ou de 50 a 70 µg/g, com base no peso seco. O teor de epicatequina da composição pode ser pelo menos 6 µg/g, pelo menos 7 µg/g, pelo menos 8 µg/g, pelo menos 9 µg/g, pelo menos 10 µg/g, pelo menos 11 µg/g, pelo menos 12 µg/g, pelo menos 13 µg/g, ou pelo menos 14 µg/g; ou de 8 a 12 µg/g; ou de 9 a 11 µg/g, com base no peso seco. O teor de ácido neoclorogênico da composição pode ser

pelo menos 15 µg/g, pelo menos 18 µg/g, pelo menos 20 µg/g, pelo menos 22 µg/g, pelo menos 25, pelo menos 30 µg/g, ou pelo menos 35 µg/g; ou de 10 a 30 µg/g; ou de 15 a 25 µg/g, com base no peso seco.

[116] De acordo com outros aspectos, após digestão, o teor de florizina das composições de kiwi ouro pode ser, pelo menos 45 µg/g, pelo menos 50 µg/g, pelo menos 55 µg/g, pelo menos 60 µg/g, pelo menos 65, pelo menos 70 µg/g, ou pelo menos 75 µg/g; ou de 40 a 80 µg/g; ou de 50 a 70 µg/g, com base no peso seco. O teor de procianidina B2 pode ser pelo menos 15 µg/g, pelo menos 20 µg/g, pelo menos 25 µg/g, pelo menos 30, pelo menos 35 µg/g, pelo menos 40 µg/g, ou pelo menos 45 µg/g; ou de 20 a 40 µg/g; ou de 25 a 35 µg/g, com base no peso seco. O teor de quercetina ramnosídeo da composição pode ser pelo menos 15 µg/g, pelo menos 18 µg/g, pelo menos 20 µg/g, pelo menos 22 µg/g, pelo menos 25, pelo menos 30 µg/g, ou pelo menos 35 µg/g; ou de 10 a 30 µg/g; ou de 15 a 25 µg/g, com base no peso seco.

[117] Em ainda outros aspectos, após a digestão, o teor de catequina das composições de kiwi ouro pode ser pelo menos 0,5 µg/g, pelo menos 1 µg/g, pelo menos 2 µg/g, ou pelo menos 3 µg/g; ou de 1 a 4 µg/g; ou de 2 a 3 µg/g, com base no peso seco. O teor de E-cafeoil-4-glicosídeo da composição pode ser pelo menos 3 µg/g, pelo menos 4 µg/g, pelo menos 5 µg/g, pelo menos 6 µg/g, pelo menos 7 µg/g, pelo menos 8 µg/g, ou pelo menos 9 µg/g; ou de 4 a 8 µg/g; ou de 5 a 7 µg/g, com base no peso seco. O teor de quercetina rutinosídeo da composição pode ser pelo menos 1 µg/g, pelo menos 2 µg/g, pelo menos 3 µg/g, pelo menos 4 µg/g, ou pelo menos 5 µg/g; ou de 1 to 5 µg/g; ou de 2 to 4 µg/g, com base no peso seco.

[118] Na ausência de digestão, as composições de kiwi ouro da presente invenção podem incluir um teor total de polifenois de 1000 a 1200 mg de GAE; ou

de 900 a 1300 mg de GAE; ou de 800 a 1400 mg de GAE, por 100 g. O teor de E-cafeoil-3-glicosídeo pode ser de 60 a 120 µg/g; ou de 80 a 100 µg/g; ou de 90 a 110 µg/g; ou de cerca de 80 µg/g, de cerca de 90 µg/g, de cerca de 100 µg/g, de cerca de 110 µg/g, de cerca de 115 µg/g, ou de cerca de 120 µg/g, com base no peso seco. O teor de epicatequina pode ser de 20 a 60 µg/g; ou de 30 a 50 µg/g; ou de cerca de 20 µg/g, de cerca de 30 µg/g, de cerca de 40 µg/g, de cerca de 45 µg/g, de cerca de 50 µg/g, ou de cerca de 60 µg/g, com base no peso seco. O teor de ácido neoclorogênico pode ser de 20 a 60 µg/g; ou de 30 a 50 µg/g; ou de cerca de 20 µg/g, de cerca de 30 µg/g, de cerca de 39 µg/g, de cerca de 40 µg/g, de cerca de 41 µg/g, de cerca de 50 µg/g, ou de cerca de 60 µg/g, com base no peso seco. O teor de procianidina B2 pode ser de 40 a 120 µg/g; ou de 50 a 100 µg/g; ou de 65 a 90 µg/g; ou de 60 a 80 µg/g; ou de cerca de 40 µg/g, ou de cerca de 50 µg/g, ou de cerca de 60 µg/g, ou de cerca de 70 µg/g, ou de cerca de 75 µg/g, ou de cerca de 80 µg/g, ou de cerca de 90 µg/g, ou de cerca de 100 µg/g, com base no peso seco.

[119] As composições de kiwi ouro da presente invenção podem também incluir fibras como componente ativo. Em aspectos particulares, o teor total de fibras pode ser de 12,4 a 12,7%, com base no peso seco; ou de 12,0 a 13,0%; ou de 10 a 15%; ou de cerca de 10%, de cerca de 11%, de cerca de 12%, de cerca de 13%, de cerca de 14%, ou de cerca de 15%, com base no peso seco. Em aspectos particulares, o teor de fibras solúveis pode ser de 3,4 a 3,5% com base no peso seco; ou de 3,0 a 4,0%; ou de 3,2 a 3,8%; ou de cerca de 3,0%, de cerca de 3,1%, de cerca de 3,2%, de cerca de 3,3%, de cerca de 3,4%, de cerca de 3,5%, de cerca de 3,6%, de cerca de 3,7%, de cerca de 3,8%, de cerca de 3,9%, ou de cerca de 4,0%, com base no peso seco. Em aspectos adicionais, o teor de fibras insolúveis pode ser de 8,9 a 9,3%, com base no peso seco; ou de 8,0 a 10,0%; ou de 8,5 a 9,5%; ou de cerca

de 8,0%, de cerca de 8,5%, de cerca de 9,0%, de cerca de 9,5%, ou de cerca de 10,0%, com base no peso seco.

[120] As composições de kiwi ouro da invenção podem também incluir vários açúcares, incluindo açúcares neutros e ácidos urônicos. Os polissacarídeos pécticos são especificamente incluídos nas composições da invenção. Em relação a açúcares neutros, as composições da invenção podem incluir um ou mais dos seguintes: ramnose, arabinose, galactose e glicose.

[121] As composições de kiwi ouro da presente invenção pode incluir ainda a enzima actinidina. Em aspectos particulares, os níveis de actinidina podem ser de 8.000 a 11.000 AU; ou de 6.000 a 16.000 AU; de ou de 7.000 a 11.000 AU; ou de 8.000 a 10.000 AU; ou de cerca de 8,000 AU, de cerca de 9.000 AU, de cerca de 10.000 AU, de cerca de 11.000 AU, ou de cerca de 15.000 AU, por grama. Os métodos para medir o nível de actinidina são amplamente conhecidos e usados na técnica. Ver, por exemplo, Drummond 2013 e Kaur et al. 2010. Por exemplo, é possível medir a digestão de N- α -CBZ-lys-p-nitrofenol (Z-lys-pNp; Sigma Aldrich Pty Ltd), por exemplo, a 25°C (isto é, 77°F), para determinar os níveis/atividade de actinidina (Boland & Hardman 1972). Medições podem ser expressas como AU/g ou AU/mg para a composição. Alternativamente, é possível medir os níveis de actinidina utilizando ensaios fluorescentes para avaliar a atividade de protease de cisteína (Nieuwenhuizen et al. 2012; Maddumage 2013). Em particular, podem ser usados os substratos fluorescentes Z-FRAMC(benziloxicarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina), H-D-Ala-Leu-Lys-AMC, ou Bz-Arg-AMC (Feinchemikalien AG). Estas medições podem ser expressas como FU/g ou FU/mg para a composição.

[122] Espera-se que as composições de kiwi ouro da presente invenção sejam ativas na estimulação do crescimento de organismos entéricos benéficos (por

exemplo, bactérias benéficas) tais como membros dos grupos *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, bem como certos membros do grupo *Clostridiales*, incluindo *Faecalibacterium prausnitzii*, como demonstrado aqui. Outros organismos benéficos também podem apresentar um aumento do crescimento, por exemplo, as cepas de *Erysipelotrichales* e *Bacteroidales*. São também incluídos organismos benéficos que incluem *Clostridium coccoides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus bromii*, e *Ruminococcus flavefaciens*. Também são incluídos os organismos benéficos dentro dos grupos *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, e *Lachnospiraceae*, bem como outros organismos descritos aqui.

[123] Em vários aspectos da invenção, a composição de kiwi ouro (por exemplo, 25 mg de pó, que pode ser diluída em 0,3 a 0,5 mg/ml de pó) pode aumentar o crescimento de uma ou mais cepas de *Lactobacillus* e/ou de *Bifidobacterium* (por exemplo, começando com 1 bilhão de unidades formadoras de colônia (ufc) em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 100%, ou pelo menos um 10%. Em um aspecto particular, 25 mg de pó adicionado a 1 bilhão de ufc de organismo(s) probiótico(s) podem ser usados para se obter uma taxa de crescimento superior a 50%, em relação ao controle, que foi normalizado para 0%. Tais aumentos podem ainda ser observados depois da digestão da composição, por exemplo, a digestão *in vitro*, como aqui descrito em detalhe. De preferência, não existem aumentos concomitantes em organismos entéricos nocivos (por exemplo, bactérias prejudiciais) tais como cepas de *Salmonella* e/ou de *Staphylococcus*. Em alguns casos, pode ser possível obter reduções em um ou mais organismos nocivos.

[124] As composições de kiwi ouro da invenção podem também ser ativas na estimulação do crescimento de bactérias fecais, incluindo bactérias *Clostridiales*, tais como aquelas do grupo filogenético *Clostridium leptum*, e em particular cepas de *Faecalibacterium*, incluindo *Faecalibacterium prausnitzii*. Aumentos na abundância relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* podem ser pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, ou pelo menos 200%; ou 20% a 200%; ou 50% a 150%; ou 70% a 100%, nos indivíduos, por exemplo, indivíduos com constipação, depois de tratamento com o kiwi ouro em pó.

[125] As composições de kiwi ouro da invenção mostram atividade no aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta. Em aspectos particulares da invenção, a composição (por exemplo, 10 mg de pó) pode aumentar os níveis de um ou mais dentre acetato, butirato, e propionato em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 18%, pelo menos 20%, pelo menos 22%, pelo menos 25%, pelo menos 28%, ou, pelo menos 30%. Tais aumentos podem ainda ser observados depois da digestão da composição, por exemplo, a digestão *in vitro*, como aqui descrito em detalhe.

Métodos de uso das composições de kiwi

[126] Conforme observado acima, as composições de kiwi ouro da presente invenção podem ser usadas para sustentar ou melhorar a saúde geral do intestino e/ou para tratar ou prevenir várias afecções do trato digestivo, incluindo inflamação, constipação, desequilíbrio da microbiota, síndrome do intestino irritável, e doença inflamatória do intestino. Além disso, as composições podem ser usadas para manter ou melhorar a regularidade do intestino, e manter ou aumentar

as bactérias benéficas no trato digestivo, incluindo *F. prausnitzii*.

[127] A constipação pode ser causada por um transtorno da função do intestino ou um problema estrutural, e pode ter um ou mais sintomas dentre: evacuações reduzidas, evacuações incompletas e assistidas, esforços para evacuar, formas endurecidas ou grumosas de fezes, distensão abdominal, flatulência, dor abdominal, e dependência de laxantes. Causas comuns da constipação são: ingestão de água inadequada; fibra inadequada na dieta; uma interrupção da dieta regular ou de rotina; atividade ou exercício inadequado; consumo de grandes quantidades de produtos lácteos; estresse; evitação da evacuação (por exemplo, devido à dor); abuso de laxantes ou amaciadores de fezes; hipotireoidismo; condições neurológicas, tais como a doença de Parkinson ou esclerose múltipla; medicamentos antiácidos contendo cálcio ou alumínio; medicamentos (especialmente medicamentos para a dor, tais como narcóticos, antidepressivos, ou suplementos de ferro); depressão; transtornos alimentares; síndrome do intestino irritável; gravidez; câncer do cólon; e falta de função nervosa e muscular no intestino.

[128] A etiologia dos desequilíbrios da microbiota (por exemplo, diminuição de organismos benéficos, razões alteradas de organismos benéficos, e/ou aumentos de organismos nocivos) é complexa e ainda não foi completamente elucidada. Os desequilíbrios podem ser causados por certos medicamentos tais como antibióticos, transtornos do trato digestivo, ou insuficiências alimentares. Um desequilíbrio da microbiota intestinal pode se apresentar como um ou mais sintomas dentre: diarreia, em particular, diarreia associada a antibióticos, fezes líquidas, constipação, e/ou inchaço.

[129] Os desequilíbrios da microbiota estão correlacionados com vários

transtornos do sistema gastrointestinal, bem como outros transtornos. Em particular, um desequilíbrio na microbiota pode ser associado com doença inflamatória do intestino, síndrome do intestino irritável, doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, enterocolite necrosante, inflamação intestinal, infecções entéricas, carcinogênese incluindo carcinomas gástricos, carcinomas colorretais, colelitíase, endotoxemia, doença hepática, tal como a cirrose, e encefalopatia hepática.

[130] Os desequilíbrios microbianos no trato digestivo estão associados com várias condições de saúde diferentes, incluindo:

Transtorno	Observações	Sistema/órgão afetado	Referências
Doença de Crohn	Diminuição da diversidade – redução de <i>F. prausnitzii</i>	GIT	(Fujimoto et al. 2013; Willing et al. 2010)
Colite ulcerativa	Diminuição da diversidade – redução de <i>A. muciniphila</i> e <i>F. prausnitzii</i>	GIT	(Lepage et al. 2011; Sokol et al. 2009)
Síndrome do intestino irritável	Aumento de cluster IX de <i>Clostridium</i> , diminuição de <i>Bacteroides spp.</i>	GIT	(Jeffery et al. 2012; Maccaferri et al. 2012)
Câncer do GIT	Diminuição da diversidade, variação em <i>Bacteroides spp.</i> , aumento de <i>Fusobacteria spp.</i> , redução de <i>F. prausnitzii</i>	GIT	(Chen et al. 2012; Wang et al. 2012)
Alergia/Atopia	Diminuição da diversidade, aumento de Enterobacteriaceae, redução de <i>A. muciniphila</i> e <i>F. prausnitzii</i>	Sistêmica	(Abrahamsson et al. 2012; Candela et al. 2012)

Doença celíaca	Composição alterada, especialmente no intestino delgado. Menos lactobacilos e bactérias bífidas	GIT	(de Sousa Moraes et al. 2014; Kalliomaki et al. 2012)
Diabetes	Redução de <i>Bifidobacterium</i> spp. e <i>F. prausnitzii</i>	Sistêmica	(Furet et al. 2010; Wu et al. 2010)
Obesidade	Aumento na razão entre Firmicutes e Bacteroidetes	Sistêmica	(Ley et al. 2006; Turnbaugh et al. 2008)
Autismo	Aumento de <i>Sutterella</i> spp., diminuição de <i>A. muciniphila</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp.	Cérebro	(Wang et al. 2011; Williams et al. 2012)
Aterosclerose[†]	Envolvimento de <i>Veillonella</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. E enterotipo de <i>Prevotella</i>	Artérias	(Koeth et al. 2013; Koren et al. 2011)
Depressão e ansiedade[†]	Alterações na microbiota intestinal como um todo e diminuição de <i>Bifidobacterium</i> spp.	Cérebro	(Desbonnet et al. 2008; Neufeld et al. 2011)
Cólica infantil[†]	Aumento da Proteobactéria e redução de bactérias bífidas e lactobacilos	GIT	(de Weerth et al. 2013; Savino et al. 2007)
Esclerose múltipla[†]	Alterações na microbiota intestinal como um todo e diminuição de <i>Clostridium perfringens</i> Tipo Bspp.	Cérebro	(Lee et al. 2011; Rumah et al. 2013)
Doença de Parkinson[†]	Diminuição de <i>Prevotellaceae</i> e aumento de <i>Clostridium</i> spp.	Cérebro	(Murata et al. 2013; Scheperjans et al. 2014)
Artrite reumatoide[†]	Alterações na microbiota intestinal como um todo e diminuição de	Sistêmica	(Abdollahi-Roodsaz et al.

	<i>Bacteroides</i> spp.		2008; Vaahtovuo et al. 2008)
--	-------------------------	--	------------------------------

[†] Evidências preliminares de ligação entre a microbiota colônica e esses transtornos. GIT, trato gastrointestinal. Tabela modificada de Vos & de Vos 2012.

[131] A inflamação do trato digestivo pode ser associada com várias afecções incluindo glossite atrófica, queilite angular, granulomatose orofacial, esofagite, gastrite, incluindo a gastrite atrófica, estenose pilórica, colite, ileíte, doença de Crohn, doença celíaca, doença inflamatória do intestino, síndrome do intestino irritável, lesões, fissuras, e várias úlceras, incluindo úlceras da boca, esôfago, estômago e intestinos, e especificamente incluindo colite ulcerativa. A inflamação pode também ser associada com os organismos nocivos, tais como organismos bacterianos, protozoários e/ou virais, incluindo os grupos/organismos de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Proteobacteria*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium varium*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, rotavírus, norovírus, adenovírus, astrovírus, e vírus do sarampo. Em certas circunstâncias, a inflamação pode resultar de lesões, medicação ou cirurgia.

[132] As composições de kiwi ouro da invenção podem ser usadas no tratamento ou prevenção de inflamação gastrointestinal, constipação, irregularidade intestinal, desequilíbrio da microbiota, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória do intestino, ou outras afecções aqui descritas. Como dosagens exemplificativas, as composições podem ser administradas de 250 a 2500 mg; 500 a 5000 mg; 1000 a 4000 mg; ou de 1500 a 4500 mg; ou de 2000 a 3000 mg; ou a cerca de 250 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 800 mg, cerca de

1000 mg, cerca de 1200 mg, cerca de 1500 mg, cerca de 1700 mg, cerca de 1800 mg, cerca de 2000 mg, cerca de 2200 mg, cerca de 2300 mg, cerca de 2400 mg, cerca de 2500 mg, cerca de 2600 mg, cerca de 2700 mg, cerca de 2800, cerca de 2900, cerca de 3000 mg, cerca de 3200, cerca de 3500, cerca de 3600 mg, cerca de 4000 mg, cerca de 4200 mg, cerca de 4800 mg, cerca de 5000 mg, cerca de 5400 mg, cerca de 6000 mg, ou cerca de 6600 mg, do kiwi ouro em pó por dia, ou dosagem equivalente, se uma forma líquida for usada. A administração pode ser realizada uma vez por dia, duas vezes por dia, ou três vezes por dia. A administração pode ser feita com os alimentos, ou antes de uma refeição. A forma farmacêutica e a dosagem apropriada serão prontamente determinadas por uma pessoa com conhecimentos na técnica.

[133] Várias vias de administração podem ser usadas para as composições de kiwi ouro da invenção, incluindo a administração entérica, administração oral, e a administração retal. A administração oral pode ser por comprimido, cápsula, sachê, gotas, elixir, linctus, solução, emulsão, suspensão, quantidades em goles, purê, pasta, xarope, gel, geleia, tônico, ou outros meios conhecidos. A administração entérica pode ser por tubagem duodenal ou pelo tubagem gástrica, incluindo tubagem nasogástrica. A administração retal pode ser por enema, supositório, ou outros meios adequados. Os diferentes meios de administração são conhecidos na técnica e podem ser usados por um especialista. As composições da invenção não se limitam a uma forma particular de administração.

[134] Em aspectos particulares, as composições da invenção podem ser administradas em combinação com um ou mais organismos probióticos. Por exemplo, a composição de kiwi ouro pode ser formulada como uma forma farmacêutica combinada com um ou mais probióticos. Alternativamente, a

composição de kiwi ouro pode ser administrada como uma forma farmacêutica separada, juntamente com um ou mais probióticos. Organismos probióticos exemplificativos incluem, mas não se limitam a: *Bacillus coagulans*, por exemplo, cepas GBI-30 e 6086; *Bifidobacterium longum*, por exemplo, subsp. *infantis* 35624; *Lactobacillus acidophilus*, por exemplo, cepas NCFM e CL1285; *Lactobacillus paracasei*, por exemplo, cepas St11 e NCC2461; *Lactobacillus johnsonii*, por exemplo, cepas La1 e NCC533; *Lactobacillus LC1*; *Lactobacillus plantarum*, por exemplo, cepas 299v e HEAL 9; *Lactobacillus reuteri*, por exemplo, ATCC 55730, SD2112, Protectis (DSM 17938, cepa filha de ATCC 55730), Prodentis (DSM 17938/ATCC 55730 e ATCC PTA 5289 em combinação), e cepas RC-14®; *Saccharomyces boulardii*; *Lactobacillus rhamnosus*, por exemplo, uma cepa GR-1®; *Lactobacillus casei*, por exemplo, uma cepa LBC80R; *Lactobacillus bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*; e *Lactobacillus bifidus*. Outros organismos que podem ser úteis como probióticos incluem as cepas *Faecalibacterium*, incluindo *Faecalibacterium prausnitzii*, e também as cepas *Bacteroidaceae* como *Bacteroides fragilis*.

[135] Em outros aspectos, as composições de kiwi ouro da invenção podem ser administradas em combinação com um ou mais agentes, por exemplo, prebióticos, como uma forma farmacêutica combinada ou em formas farmacêuticas separadas. Conforme anteriormente identificado, os agentes prebióticos são constituídos de compostos fermentáveis ou fibras não digeríveis que passam através da parte superior do trato digestivo e estimulam o crescimento e/ou atividade de organismos benéficos que colonizam o intestino grosso, agindo como substrato para os mesmos.

[136] Estes agentes podem ser prebióticos de cadeia curta, de cadeia longa,

ou de espectro total. Os prebióticos de cadeia curta incluem 2 a 8 ligações por molécula de sacarídeo. Os prebióticos de cadeia longa incluem 9 a 60 ligações por molécula de sacarídeo. Os prebióticos de espectro total incluem uma gama completa de comprimentos de ligações moleculares de 2 a mais que 60 ligações por molécula de sacarídeo. Agentes prebióticos exemplificativos incluem, mas não se limitam a; oligofrutose, inulina, inulina enriquecida com oligofrutose, fruto-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, polidextrose, galacto-oligossacarídeos, trans-galacto-oligossacarídeos, oligossacarídeos de mananas, lactulose, tagatose e amido.

[137] Com base nos resultados aqui apresentados, acredita-se que os polifenois presentes nas composições divulgadas podem estar atuando como agentes de prebióticos. Dessa forma, pode ser útil adicionar um ou mais compostos fenólicos às composições da invenção, para complementar a atividade prebiótica das mesmas. Compostos exemplificativos incluem, mas não se limitam a: derivados fenólicos, tais como ácido fenólico, e flavonoides, tais como ligninas, proantocianidinas, antocianinas, antocianidinas, isoflavonas, catequinas, taninos, quercetina, naringenina e hesperidina. Particularmente englobados são os compostos fenólicos extraídos de um ou mais dentre: chá, cacau, vinho, soja, feijoa, frutas cítricas, maçãs, uvas, bagas, e kiwis, particularmente, kiwi ouro, incluindo Hort16 e Gold3. Os fenólicos específicos de kiwi ouro Gold3 incluem, mas não se limitam a: catequina, ácido clorogênico, E-cafeoil-3-glicosídeo, E-cafeoil-4-glicosídeo, epicatequina, ácido neoclorogênico, florizina, procianidina B1 e B2, quercetina ramnosídeo, e querecetina rutinosídeo.

[138] De acordo com outros aspectos, as composições da invenção podem ser administradas em combinação com um ou mais agentes simbióticos

(prebióticos e probióticos combinados). Por exemplo, o kiwi ouro em pó pode ser formulado como uma forma farmacêutica combinada com um ou mais simbióticos. Alternativamente, o kiwi ouro pode ser administrado como uma forma farmacêutica separada, juntamente com um ou mais simbióticos. Como exemplos, *Bactérias bífidas* ou *Lactobacilos* podem ser combinados com os fruto-oligossacarídeos ou inulinas ou galacto-oligossacarídeos. As combinações simbióticas específicas incluem, mas não se limitam a: *Bactérias bífidas* e fruto-oligossacarídeos; *Lactobacillus rhamnosus*, por exemplo, uma cepa GG, e inulinas.

[139] Como aspectos adicionais, as composições da invenção podem ser administradas em combinação com fibras e/ou enzimas digestivas. Por exemplo, o kiwi ouro em pó pode ser formulado como uma forma farmacêutica combinada com uma ou mais composições que compreendem fibras e/ou enzimas digestivas. Alternativamente, o kiwi ouro em pó pode ser formulado conforme administrado como uma forma farmacêutica separada, com uma ou mais composições compreendendo fibras e/ou enzimas digestivas. As composições de fibras exemplificativas incluem composições solúveis e/ou insolúveis de fibras, por exemplo, composições incluindo um ou mais dentre dextrina de trigo, policarbofil de cálcio, psyllium, inulina, metilcelulose, glucomanano, linho, linhaça, grama de trigo, acácia senegal, e ruibarbo. As enzimas digestivas exemplificativas incluem, mas não se limitam a: actinidina, protease, lipase, amilase, celulose, pancreatina, pepsina, bromelina, papaína, tripsina e quimiotripsina. Combinações de enzimas digestivas podem também ser usadas, por exemplo, combinações de protease, lipase e amilase, incluindo aquelas com ou sem actinidina adicionada.

[140] De acordo com outros aspectos, as composições de kiwi ouro da presente invenção podem ser administradas em combinação com um ou mais

agentes anti-inflamatórios e/ou agentes antimicrobianos. De particular interesse é o uso da composição da invenção como um suplemento prebiótico durante e/ou após o tratamento com antibióticos. Por exemplo, o kiwi ouro em pó pode ser formulado como uma forma farmacêutica combinada com um ou mais agentes anti-inflamatórios/antimicrobianos. Alternativamente, o kiwi ouro pode ser administrado como uma forma farmacêutica separada, juntamente com um ou mais agentes anti-inflamatórios/antimicrobianos. Os agentes anti-inflamatórios/antimicrobianos exemplificativos incluem, mas não se limitam a, aminossilicilatos, por exemplo, mesalazina (por exemplo, Pentasa®) e sulfasalazina (por exemplo, Salazopyrin®), corticosteroides, por exemplo, budesonida (por exemplo, Entocort®) e acetato de hidrocortisona (por exemplo, Colifoam®), e também incluem azatioprina (por exemplo, Azasan®, Imuran®), mercaptopurina (por exemplo, Purinethol®, Purixan™), ciclosporina (por exemplo, Gengraf®, Neoral®, Sandimmune®), infliximab (por exemplo, Remicade®), adalimumab (por exemplo, Humira®), golimumab (por exemplo, Simponi®), metotrexato (por exemplo, Rheumatrex™, Methotrexate™), natalizumab (por exemplo, Tysabri™), vedolizumab (por exemplo, Entyvio™), ustekinumabe (por exemplo, Stelara®), e antibióticos incluindo metronidazol (por exemplo, Flagyl®) e ciprofloxacina (por exemplo, Cipro®, Ciplox™).

EXEMPLOS

[141] Os exemplos aqui descritos são fornecidos com a finalidade de ilustrar as modalidades específicas da invenção e não se destinam a limitar a invenção de modo algum.

Exemplo 1 Preparação de kiwi em pó

[142] Purê de kiwi ouro congelado (Purê de kiwi ouro congelado de

resistência única (sem sementes)) foi obtido da Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, Nova Zelândia. O purê foi produzido de 100% de kiwi ouro da Nova Zelândia (*Actinidia chinensis* G3) cultivado nos padrões de exportação de Zespri®, e classificado a mão. O purê foi produzido por processos de fabricação para remover a pele e as sementes para deixar um purê liso e enriquecido.

[143] A especificação do produto do purê de kiwi ouro congelado é a seguinte:

[144] A cor é kiwi ouro, sendo normal alguma variação na cor. O sabor é típico de kiwi ouro maduro. A textura é lisa e sem sementes. O purê tem quantidades nulas de fruta podre ou fermentada, ou corpos estranhos, e não contém *E coli* detectável. O valor de Brix é de 16 a 21°. A viscosidade (a 12,5°Brix, 20°C) é de cerca de 12,0, mas pode variar quando a fruta é mantida por uma estação. O pH é de 3,2 a 3,8. O tamanho da peneira é < 1 mm. O produto é mantido congelado a -18°C até seu uso.

[145] Além disso, o purê de kiwi verde congelado (Purê de kiwi verde congelado de resistência única (sem sementes)) foi obtido da Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, Nova Zelândia. O purê foi produzido de 100% do kiwi verde da Nova Zelândia (*Actinidia deliciosa*, variedade Hayward) cultivado nos padrões de exportação de Zespri®, e classificado a mão. O purê foi produzido por processos de fabricação para remover a pele e as sementes para deixar um purê liso e enriquecido.

[146] A especificação do produto do purê de kiwi verde congelado é a seguinte:

[147] A cor é kiwi verde, normal alguma variação na cor. O sabor é típico de kiwi verde maduro. A textura é lisa e sem sementes. O purê tem quantidades nulas

de fruta podre ou fermentada, ou corpos estranhos, e não contém *E. coli* detectável. O valor de Brix é de 13 a 18°. A viscosidade (a 12,5°Brix, 20°C) é de cerca de 12,0, mas pode variar quando a fruta é mantida por uma estação. O pH é de 3,2 a 3,8. O tamanho da peneira é < 1 mm. O produto é mantido congelado a -18°C até seu uso.

O processo para a obtenção de kiwi em pó foi como a seguir:

1) O purê Gold3 Congelado foi adquirido da Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, Nova Zelândia.

2) O purê congelado foi liofilizado (seco por congelação). O processo de liofilização foi tipicamente realizado durante até cerca de 48 horas, a temperaturas não excedendo 70°C. O material seco resultante foi então moído através de uma malha US 20 para produzir um pó que flui livremente.

3) O mesmo método foi usado para se obter pó de kiwi verde.

Exemplo 2 Medição de polifenois para pós de kiwi

[148] Foram testados os perfis de polifenois de pós de kiwi verde e kiwi ouro. Os pós de kiwi verde (Hayward) e ouro (Gold3) liofilizados (secos por congelação) foram preparados de acordo com o Exemplo 1.

[149] Os pós foram digeridos usando um modelo gastrointestinal superior *in vitro*, como descrito em Monro et al. 2010. Resumidamente, 20 mL de água e 5 mL de solução salina a 20% foram adicionados a 5 g de amostras ao pH 2,5 antes da agitação em vórtice. Em seguida, 1 mL de 1% de pepsina em ácido clorídrico 0,05 M foi adicionado, seguido por 30 minutos de incubação a 37°C com mistura constante lenta (220 rpm). As amostras foram ajustadas ao pH 6,5, seguido da adição de 5 mL de extrato biliar a 2,5% obtido da Sigma Aldrich®, e 1 mL de pancreatina a 5% em cloreto de sódio a 3% (NaCl).

[150] As amostras foram então agitadas e incubadas a 37°C com mistura

constante lenta (220 rpm) durante 2 horas. As amostras digeridas foram então transferidas para sacos de diálise (MWCO de 500 Da, obtidos da ThermoFisher Scientific) e dialisadas em NaCl 10 mM a 4°C de um dia para o outro, seguido por uma alteração no fluido de diálise e mais 2 horas a 2°C, que representa a absorção no intestino delgado. As amostras foram armazenadas a -80°C e, em seguida, foram liofilizadas.

[151] As amostras pré e pós-digeridas dos pós de kiwi verde e de kiwi ouro liofilizados (100 mg) foram extraídas com 5 mL de etanol/ácido fórmico/água (80:20:1). A mistura de extração foi sonicada durante 30 minutos, em seguida, foi armazenada de um dia para o outro. As amostras foram centrifugadas a velocidade máxima para remover partículas e diluídas 2 x antes da análise por cromatografia líquida – espectrometria de massa (LC-MS). Os detalhes são fornecidos na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2: Análise LC-MS para pós de kiwi pré e pós-digerido

LCMS	LC de separação rápida Dionex Ultimate® 3000 com espectrômetro de massa micrOTOF QII
Coluna	Zorbax™ SB-C18 2,1 m x 100 mm, 1,8 µm
Fluxo de fase móvel	350 µL/min
Solventes	A = 100% de acetonitrila B = 0,2% de ácido fórmico
Gradiente	10% A, 90% B, 0 – 0,5 min Linear a 50% A, 50% B, 0,5 – 18 min Linear a 100% A, 18 – 30 min Retenção a 100% A durante 30 – 40 min Linear a 10% A, 90% B, 40 – 40,2 min
Volume de injeção	2 µL
Parâmetros de MS	Temperatura de secagem com N ₂ : 200°C

	Fluxo de secagem com N ₂ : 8 L/min Nebulizador com N ₂ : 1,5 bar Faixa de massa: 100 – 1500 Da Taxa de aquisição: 2 varreduras/s
--	---

[152] As concentrações do composto foram calculadas utilizando as curvas de calibração de padrões autênticos.

[153] Conforme mostrado na Figura 1, o pó de Gold3 digerido (digestão gastrointestinal superior simulada) tem um perfil de polifenol alterado em comparação com a pré-digestão (Figura 1); no entanto, o teor fenólico global é retido. Em particular, pré-digestão de 269 µg/g de teor de polifenois contra pós-digestão de 264 µg/g de teor de fenol foi observada para o pó de Gold3 (Figura 1; total combinado para compostos fenólicos testados). O pó de kiwi verde também apresenta um perfil de polifenol alterado pós-digestão, mas o teor global é reduzido por digestão (Figura 1). Para o pó de kiwis verde, o teor total de polifenois foi de 258 µg/g de pré-digestão contra 153 µg/g de pós-digestão (Figura 1; total combinado para compostos fenólicos testados).

Exemplo 3 Ensaios de alto rendimento microbiano para pós de kiwi

[154] O pó de kiwi ouro Gold3 foi obtido de uma fórmula de pasta (preparada por Cedenco Foods, Nova Zelândia), que foi seca em tambor com amido de ervilha (14.28:1 peso úmido). Uma amostra (5 g) do pó foi digerida *in vitro* utilizando um modelo gastrointestinal superior como descrito no Exemplo 2.

[155] O material digerido foi então solubilizado em água ou dimetil sulfóxido (DMSO) a uma concentração uniforme de 100 mg/mL. As amostras foram então diluídas 100 vezes com água desionizada estéril para reduzir o DMSO a uma concentração controlável para evitar a lise bacteriana. A água e ‘extratos’ de DMSO foram adicionados a cavidades de ensaio de alto rendimento microbiano a uma

concentração final de 1,0 mg/mL.

[156] Os organismos usados no estudo incluíram probióticos de *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20), *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10), e pathogenic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 1772 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

[157] Um bioensaio de crescimento em microplacas com noventa e seis cavidades medindo a densidade óptica (OD), como descrito em Rosendale et al. 2008, foi usado para este trabalho. A alteração no crescimento (Δ crescimento) foi calculada e usada para representar a magnitude do efeito. A mesma foi calculada pela conversão da OD a uma porcentagem de OD de controle, depois subtraindo 100, efetivamente normalizando o controle de crescimento para um valor de linha de base zero.

[158] Uma cepa de bactéria por microplaca foi usada e cada extrato foi analisado em quadruplicado por microplaca a uma faixa de concentrações (0, 0,0124, 0,037, 0,111, 0,333, 1 mg/mL). As microplacas foram inoculadas com um volume igual (50 μ L) de inóculo bacteriano e a OD medida imediatamente a um comprimento de onda de 595 nm com um leitor de placas (FLUOstar Optima®) para determinar o valor do crescimento em branco/zero. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, em seguida, a OD foi determinada para medir o crescimento das culturas.

[159] Os resultados mostraram que o pó de kiwi ouro Gold3 suportou o crescimento de cepas de Lactobacilos e Bactérias bífidas, sem ter um efeito significativo no número de bactérias patogênicas, em relação ao controle (Figura 2).

Exemplo 4 Modelo de fermentação misto para testar pós de kiwi

[160] O pó de kiwi ouro Gold3 foi obtido de uma fórmula de pasta (preparada

por Cedenco Foods, Nova Zelândia), que foi seca em tambor com amido de ervilha (14.28:1 peso úmido). Uma amostra (5 g) de pó foi digerida de acordo com o Exemplo 2. A amostra digerida foi solubilizada em água a uma concentração final de 10 mg/mL.

[161] Amostras fecais recentemente obtidas foram colhidas de três voluntários humanos saudáveis. O pó de kiwi ouro digerido foi incubado em um tubo de teste inoculado com microbiota mista de um único doador fecal, o que foi repetido para cada um dos três doadores. Tubos Hungate contendo meios de fermentação pré-reduzidos (9 mL) sob dióxido de carbono foram suplementados com 1 mL de amostra ou de controle e inoculados com 1 mL de uma solução 10% (p/v) de suspensão fecal. Os tubos foram incubados a 37°C com agitação orbital suave (150 rpm). As subamostras foram periodicamente removidas (0, 5, 10, 24, 48 horas) com uma seringa e uma agulha de calibre 22 através do septo de borracha para evitar a exposição da amostra à atmosfera.

[162] As amostras retiradas dos tubos de fermentação foram recolhidas em tubos Eppendorf® de 1,5 mL e centrifugadas imediatamente a 13.000 x g durante 5 minutos. Os sobrenadantes isentos de partículas e células foram coletados em tubos Eppendorf® frescos e congelados a - 80°C até o necessário.

[163] O sobrenadante foi descongelado e diluído a 1:4 em 0,01 M de salina tamponada com fosfato com 2-etylbutirato (5 mM de concentração final) como padrão interno. A amostra foi, em seguida, centrifugada a 3.000 x g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (0,25 mL) foi acidificado com ácido clorídrico concentrado (0,125 ml), éter dietílico (0,5 mL) foi adicionado, em seguida, submeteu-se a vórtice e centrifugou-se a 10.000 x g durante 5 minutos (4°C). A fase superior de éter dietílico foi coletada, seca com sulfato de magnésio, e derivatizada

com N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluroroacetamida com 1% de terc-butildimetilclorosilano por aquecimento a 80°C durante 20 minutos.

[164] As concentrações de metabólitos de ácidos orgânicos microbianos nas amostras de fermentação foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa (GC) conforme indicado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Análise de GC de metabólitos de ácidos orgânicos

GC	Shimadzu GC-17A com detector de ionização de chama (FID)
Coluna	10 m x 0,53 mm ID x 2,65 µm
Gás de arraste	Hélio
Vazão	37 mL/min
Pressão	7 kPa, aumentando para 15 kPa a 0,8 kPa/h Retenção por 4 min
Programa de temperatura	70°C aumentando para 80°C a 10°C/min Aumento para 255°C a 20°C/min Retenção por 5 min
Injetor e detector de temperatura	260°C
Volume de injeção	1 µL, sem separação

[165] As misturas padrões de ácido orgânico da concentração conhecida foram analisadas juntamente com as amostras e usadas para criar curvas padrão com as áreas de picos relativos normalizadas para a resposta a 2-etilbutirato. Os resultados foram expressos como µmol de ácido orgânico/mL de fermenta.

[166] Conforme mostrado na Figura 3, a presença do pó de kiwi ouro Gold3 promoveu um aumento na produção de ácido orgânico, particularmente após as primeiras 12 horas de exposição. Dado o aumento observado, isto indica que os componentes não digeríveis fermentáveis (carboidratos e polifenois) no pó de kiwi

ouro foram decompostos e usados como substrato de geração de energia e de crescimento. Isto é consistente com a ação como prebiótico.

Exemplo 5 Ensaio clínico para testar pó de kiwi ouro Gold3 para melhorar a regularidade

[167] Visão geral do protocolo clínico

[168] O estudo foi concebido como um ensaio cruzado controlado por placebo, duplo-cego e randomizado com os participantes consumindo quatro diferentes intervenções durante 4 semanas cada um, com 2 semanas de períodos de washout entre cada intervenção. Uma visão esquemática do modelo do estudo é mostrada na Figura 4.

[169] Participantes do ensaio clínico

[170] Dois grupos de participantes foram recrutados através de anúncios em jornal e rádio, na comunidade, em departamentos de saúde distritais locais, na Universidade Canterbury (Christchurch, Nova Zelândia), na Universidade Lincoln (Lincoln, Nova Zelândia), boletins informativos, cartazes em consultórios médicos de clínica geral e através da nossa base de dados existente de participantes anteriores.

[171] Vinte e nove participantes totais foram recrutados de cinquenta e um voluntários totais. Os participantes foram divididos em dois coortes: coorte 1 ("saudável"): os participantes sem sintomas clínicos de constipação; e coorte 2 ("funcionalmente constipado"): os participantes classificados como tendo constipação funcional C3 com base nos critérios de Rome III.

[172] Critérios de Rome III:

1) Deve incluir dois ou mais dos seguintes procedimentos: a) esforço durante pelo menos 25% das defecações; b) fezes duras ou grumosas em pelo

menos 25% das defecações; c) sensação de obstrução ou bloqueio anorretal durante pelo menos 25% das defecações; d) sensação de evacuação incompleta durante pelo menos 25% das defecações; e) manobras manuais para facilitar pelo menos 25% das defecações; f) três ou menos defecações por semana;

- 2) Fezes moles raramente estão presentes, sem o uso de laxantes; e
- 3) Critérios insuficientes para a síndrome do intestino irritável.

[173] Os critérios de inclusão foram: idade de 18 a 60; limites de IMC entre 19 e 30 K/m²; glicose no sangue em jejum inferior a 5,6 mmol/L; os indivíduos foram solicitados a estarem dispostos a manter sua ingestão de alimentos e bebidas habitual (que não fosse a substituição de alimentos de estudo por produtos semelhantes) e padrão de atividade física ao longo do período de estudo; os indivíduos foram solicitados a excluir suplementos com elevado teor de fibras, tais como Metamucil®, Benefibre® e Phloe™, bem como absterem de comer kiwis frescos durante o período de estudo; pediu-se que os participantes evitassem viagens ao exterior durante o período do estudo, devido ao impacto que isso pode ter na dieta.

[174] Os critérios de exclusão foram: a presença de sintomas de alarme gastrointestinais (incluindo sangue nas fezes, diarreias frequentes, dor abdominal constante); pessoas que fazem dieta ou pessoas que estão seguindo a dieta vegana, dietas de alimentos crus ou dietas muito ricas em fibras; gastroparesia ou intolerância à lactose; cirurgia para perda de peso (banda gástrica ou bypass gástrico); mulheres grávidas; transtornos renais, hepáticos, endócrinos, cardíacos, pulmonares, pancreáticos, neurológicos, hematológicos ou biliares clinicamente significativos; e alergia ou sensibilidade conhecida a kiwi.

[175] O grupo "saudável" era composto por participantes que estavam sem

sintomas clínicos de constipação. O grupo "funcionalmente constipado" (FC) foi selecionado com base em critérios Rome III (Drossman 2006) como tendo constipação funcional C3. Vinte participantes (2 homens e 18 mulheres) foram recrutados para o grupo saudável. A idade média foi de 38 anos (faixa de 23 a 56 anos) e o índice de massa corporal média foi de 23 kg/m² (faixa de 19 a 29 kg/m²). Nove participantes (1 homem e 8 mulheres) foram recrutados para o grupo FC. A idade média foi de 44 anos (faixa de 38 a 54 anos) e o índice de massa corporal média foi de 25 kg/m² (faixa de 21 a 29 kg/m²). Ver também a Tabela 6, mais adiante.

[176] Dezenove dos vinte participantes no grupo saudável completaram o estudo. Uma participante do sexo feminino se retirou devido a razões pessoais. Todos os nove participantes do grupo FC completaram o estudo. A ordem em que os participantes foram alocados em sua intervenção foi randomizada por um bioestatístico usando um modelo de Quadrado Latino de Williams e números aleatórios gerados por computador. Após a conclusão das análises, o estudo se tornou não cego para revelar a ordem de intervenção. A aprovação ética foi obtida do New Zealand Human Disability e Ethics Committee “Comitê de Ética e Deficiência Humana da Nova Zelândia” sob revisão acelerada (Pedido número 12/STH/72/AM01), e foi registrado junto a Australia New Zealand Clinical Trials Registry (Registro de Ensaios Clínicos da Austrália e Nova Zelândia). Número de registro ACTRN: 12612001270808.

[177] Métodos de testes clínicos

[178] As intervenções foram administradas em cápsulas de 4 x 600 mg fornecidas pela Anagenix Limited (Wellington, Nova Zelândia) preparadas de modo a parecerem idênticas para preservar intervenção cega (Tabela 4).

Tabela 4: Descrição da composição de intervenção

Intervenção	Tratamento	Dose	Administração-cápsulas/dia
ACTAZIN™ L	Pó de Kiwi Verde	600 mg	1 × ACTAZIN™ + 3 × Placebo
ACTAZIN™ H	Pó de Kiwi Verde	2400 mg	4 × ACTAZIN™
GOLD	Pó de Kiwi Ouro (G3)	2400 mg	4 × GOLD
Placebo	Isomalte de cor verde (E102,E142)	2400 mg	4 × Placebo

Tabela 5: Informação nutricional das intervenções usadas, ACTAZIN™ e GOLD

Informação Nutricional (por 100 g)	GOLD	ACTAZIN™
Energia, kJ	1420	1435
Proteína, g	3,9	3,4
Gordura, total, g	1,8	3,0
- Saturado, g	0,34	0,75
- Insaturado, g	1,4	2,4
- Monoinsaturado, g	<0,10	0,53
- Poli-insaturado, g	1,4	1,8
Carboidrato, g	71	67
- Açúcares, total, g	58	46
- Sacarose, g	<0,05	<0,05
- Glicose, g	27	21
- Frutose, g	31	25
- Lactose, g	<0,05	<0,05
- Maltose, g	<0,05	<0,05
Fibra dietética, g	12	16
Sódio, mg	18	13
Polifenois totais, mg de GAE	1100	900

Actinidina, AUs/g	9100	40700
-------------------	------	-------

[179] Todos os participantes consumiram quatro combinações diferentes de intervenção: Placebo (isomalte de cor verde) (2.400 mg/dia), ACTAZIN™ L (600 mg/dia), ACTAZIN™ H (2400 mg/dia) e GOLD (2400 mg/dia) durante 28 dias a cada intervenção, com um período de washout de 14 dias entre cada uma das fases do tratamento.

[180] ACTAZIN™ L (dose baixa, kiwi verde) e ACTAZIN™ H (dose elevada, kiwi verde) foram formulados a partir de kiwi verde ‘Hayward’, *Actinidia deliciosa*, processado a frio e GOLD foi formulado a partir de polpa de kiwi ouro Gold3 ‘Zesy002’, *Actinidia chinensis*, processada a frio. Ver Exemplo 1.

[181] No início e no final de cada período de intervenção de 4 semanas, solicitou-se aos participantes que fornecessem uma amostra fecal. O período de washout de 2 semanas foi escolhido para permitir tempo suficiente para os hábitos intestinais retornarem à linha de base para os parâmetros medidos (ecologia microbiana, metabólitos microbianos).

[182] No início e no final de cada período de intervenção, também se solicitou aos participantes que fornecessem uma amostra fecal e completassem o questionário de sintomas da Síndrome do Côlon Irritável (IBS) de Birmingham (Johnston et al. 2010) bem como um questionário de qualidade de vida específico para IBS (Patrick et al. 1998) relativo ao bem-estar.

[183] Para cada dia desde a linha de base até ao final do estudo, os participantes registraram vários parâmetros nos relatos diários fornecidos. Estes parâmetros incluíram: 1) número de movimentos intestinais; 2) movimentos intestinais incompletos e assistidos; 3) esforço para passagem das fezes; 4) forma

das fezes como determinado pela escala de fezes de Bristol; 5) inchaço; 6) flatulência; 7) dor abdominal; 8) uso de laxante.

[184] Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) em GenStat (v.16, 2013, VSNI Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido). Os dados dos dois coortes foram analisados separadamente. Os resultados de cada período de observação foram analisados como um modelo de bloco completo, com participante e participante x fase como blocos, e fase (1, 2, 3, ou 4) e intervenção (incluindo washout) como fatores. Os dados médios de washout foram usados como linha de base para fins de análise estatística. Os resíduos foram inspecionados para assegurar que as expectativas de ANOVA foram atingidas; quando necessário os dados foram log-transformados para estabilizar a variância.

[185] A análise de subgrupo post hoc foi realizada no coorte saudável usando teste Q de Cochran para comparar os participantes que responderam a cada intervenção (isto é, com um aumento de pelo menos um movimento intestinal por semana em relação ao período de washout anterior). Os participantes foram, então, classificados como responsivos (mostraram uma resposta a pelo menos uma das intervenções sem placebo) ou não responsivos; os dados do subgrupo de responsivos (14 de 19 participantes (74%)) foram analisados utilizando ANOVA.

[186] O resultado primário do estudo foi um aumento significativo na frequência das evacuações.

Exemplo 6 Resultados do tratamento na melhoria da regularidade

[187] Os dados demográficos dos participantes são mostrados na Tabela 6. A adesão dentro dos coortes saudável e funcionalmente constipado foi de $98\% \pm 9$ e $99\% \pm 8$, respectivamente.

Tabela 6: Dados demográficos dos participantes do estudo

Características de linha de base	Saudável	Funcionalmente constipado
N	20	9
Homem	2	1
Mulher	18	8
Idade em anos (Média ± DP)	38 ± 11	44 ± 6
Idade (Faixa)	23 – 56	38 – 54
Peso em kg (Média ± DP)	68 ± 13	67 ± 8
Peso (Faixa)	47 – 101	53 – 79
IMC em kg/m² (Média ± DP)	23 ± 3	25 ± 2
IMC (Faixa)	19 – 29	21 – 29
Adesão (%)	98 ± 9	99 ± 8

IMC – Índice de Massa corporal; DP – Desvio Padrão

[188] Os resultados deste estudo estão resumidos nas Tabelas 7 e 8.

[189] No grupo saudável($n = 19$) foram observadas diferenças significativas entre as intervenções e o washout para o número de movimentos intestinais diários ($p = 0,002$), pontuação de fezes de Bristol ($p = 0,036$), cepa ($p = 0,044$) e flatulência ($p = 0,007$). O número de movimentos intestinais diários para intervenções com ACTAZIN-H e GOLD foi significativamente maior ($p = 0,014$ e $p = 0,009$, respectivamente) em comparação com o washout, comum aumento aproximado de 0,8 movimentos intestinais por semana com cada intervenção. Tabela 7.

[190] No subgrupo responsivo ($n = 14$), o consumo de ACTAZIN-L, ACTAZIN-H e GOLD resultou em um aumento significativo nos movimentos intestinais diários ($p = 0,005$, $p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente) quando comparado ao washout. Tabela 7.

[191] O consumo das intervenções por 28 dias foi geralmente bem tolerado, sem eventos adversos graves relatados, e nenhum efeito ($p < 0,05$) sobre os parâmetros de bem-estar foi registrado nos questionários diários exceto para

flatulência auto-relatada, que foi mais elevada no grupo de ACTAZIN-H de coorte saudável ($p = 0,007$). Tabela 7.

[192] Nos indivíduos com constipação funcional ($n = 9$), as intervenções dietéticas não aumentaram significativamente a frequência dos movimentos intestinais em comparação com o washout. Tabela 8. Isto foi atribuído à pequena dimensão da amostra do estudo, que tem limitações no seu poder estatístico para detectar diferenças significativas na frequência das evacuações. No entanto, o grupo funcionalmente constipado mostrou melhoria global nos parâmetros digestivos, e uma redução de outros sintomas de constipação.

[193] No grupo funcionalmente constipado, a melhoria global foi vista no Índice de Saúde Digestiva. Figura 5A. Oito dos nove participantes funcionalmente constipados apresentaram melhora nos parâmetros de saúde gastrointestinal, como calculado a partir da soma da alteração média de washout para: esforço, evacuação incompleta, manobras manuais, inchaço, gases, uso de laxantes e dor. Figura 5A. A pontuação para cada parâmetro foi obtida dos relatos com as anotações diárias dos participantes.

[194] Um aumento de mais de um movimento intestinal por semana em uma população sintomática é considerado uma magnitude clinicamente significativa do efeito (Food and Drug Administration, 2012) e potencialmente, melhoraria os sintomas de pessoas que sofrem de constipação leve ou ocasional. ACTAZIN™ e GOLD, que são derivados de kiwi verde (Hayward) e ouro (Gold3), demonstraram este grau de eficácia em uma população saudável. Em particular, um aumento de cerca de 1,5 movimentos intestinais por semana cada foi observado no subgrupo responsável de coortes saudáveis em comparação o washout.

[195] Em resumo, este estudo mostrou que ACTAZIN™ e GOLD melhoraram

a regularidade e a laxação sem afetar a forma das fezes para o coorte saudável. Para o grupo funcionalmente constipado, GOLD melhorou os parâmetros digestivos gerais e aliviou os sintomas principais de constipação, incluindo esforço, evacuação incompleta, manobras manuais, inchaço, gases, uso de laxante, e dor.

Tabela 7: Análise de resultados de variância para relatos com anotações diárias, sintomas de IBS de Birmingham e questionários de qualidade de vida de IBS no coorte saudável

Grupo saudável (n = 19)	Placebo	Média				Análise de variância valor-P	Washout versus média de tratamentos (1 df)	Valores-P post-hoc				
		ACTAZIN -L	ACTAZIN -H	GOLD	Washout			Diferenças de tratamento (3 df)				
								Placebo	ACTAZIN -L	ACTAZIN-H	GOLD	
Questionário para relatos com anotações diárias												
Número de movimentos intestinais diários		1,12	1,16	1,19	1,20	1,08	0,002	0,918	0,377	0,060	0,014	
Escala de evacuação de Bristol		3,61	3,52	3,61	3,62	3,42	0,036	0,806	0,134	0,421	0,138	
Cepa		0,22	0,22	0,24	0,22	0,28	0,044	0,349	0,157	0,150	0,363	
Evacuação Incompleta		0,14	0,14	0,13	0,17	0,18	0,137	0,432	0,310	0,306	0,174	
Inchaço		0,17	0,15	0,13	0,16	0,14	0,497	0,490	0,223	0,757	0,631	
Flatulência		0,60	0,64	0,67	0,64	0,58	0,007	0,572	0,511	0,073	0,007	

Manobras manuais	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01	0,860	0,339	0,247	0,637	0,343	0,234
Laxantes	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,786	0,703	0,156	0,494	0,475	0,475
Dor abdominal	0,12	0,11	0,05	0,08	0,08	0,339	0,375	0,021	0,083	0,103	0,980
Questionário de sintomas de IBS de Birmingham											
Constipação	1,73	1,94	1,45	2,06	2,23	0,093	0,243	0,218	0,471	0,058	0,672
Diarreia	1,22	1,32	1,43	1,28	1,11	0,222	0,881	0,691	0,428	0,209	0,514
Dor	1,57	1,11	0,69	0,82	1,10	0,707	0,100	0,037	0,957	0,069	0,202
Questionário de qualidade de vida – IBS											
Disforia	8,61	8,38	8,33	8,27	8,38	0,891	0,272	0,134	0,958	0,727	0,441
Interferência com atividade	7,39	7,68	7,93	7,42	7,65	0,743	0,604	0,186	0,858	0,133	0,235
Imagen Corporal	4,41	4,67	4,45	4,35	4,69	0,114	0,592	0,202	0,915	0,277	0,121
Preocupação com a saúde	3,61	3,46	3,60	3,35	3,67	0,067	0,907	0,646	0,138	0,607	0,030
Evitação de alimentos	3,87	4,25	4,42	4,25	4,22	0,855	0,063	0,128	0,889	0,383	0,896
Reação Social	4,26	4,27	4,33	4,16	4,35	0,074	0,323	0,299	0,316	0,823	0,023
Sexual	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Relacionamentos	3,09	3,27	3,43	3,05	3,24	0,676	0,058	0,149	0,788	0,064	0,068

Tabela 8: Análise de resultados de variância para relatos com anotações diárias, sintomas de IBS de Birmingham, e questionários de qualidade de vida em coorte com FC

Place	ACTAZI	ACTAZI	GOLD	Wash	ANOVA valores- <i>p</i>		LSD		Diferença de washout versus intervenções			
bo	N-L	N-H		out								
					Washout		Interve					
					versus	Diferença	Washout	nção				
					média de	entre	as	versus				
					intervenç	intervenç	intervenç	interve	Place	ACTAZI	ACTAZI	
					ões	ões	ão	nção	bo	N-L	N-H	GOLD

Questionário para relatos com anotações diárias

Número
de
moviment
os
intestinais

diários													
Escala de evacuação de Bristol	3,00	2,93	2,82	2,92	2,78	0,210	0,215	0,36	0,46	0,223	0,396	0,799	0,437
Cepa Evacuação	0,55	0,43	0,38	0,41	0,49	0,321	0,527	0,15	0,20	0,433	0,462	0,147	0,305
Incompleta	0,52	0,40	0,41	0,39	0,41	0,720	0,671	0,14	0,18	0,155	0,852	0,957	0,749
Inchaço Gases	0,09	0,14	0,12	0,14	0,12	0,836	0,533	0,05	0,06	0,199	0,313	0,958	0,461
Manobras manuais	0,46	0,32	0,49	0,23	0,43	0,254	0,228	0,16	0,20	0,667	0,158	0,474	0,015
Laxantes	0,93	0,94	0,81	0,84	0,87	0,609	0,115	0,08	0,10	0,132	0,072	0,140	0,535
Dor abdominal	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,615	0,967	0,01	0,02	0,795	0,354	0,673	0,706
	0,27	0,12	0,15	0,12	0,17	0,961	0,639	0,09	0,12	0,023	0,316	0,813	0,323

Questionário de sintomas de IBS de Birmingham

Constipaç ão	6,06	5,63	6,21	4,10	6,19	0,189	0,251	1,72	2,22	0,872	0,510	0,982	0,018
Diarreia	1,58	1,95	2,20	2,10	2,01	0,873	0,761	1,15	1,48	0,441	0,908	0,738	0,872
Dor	3,08	1,97	2,17	1,42	2,86	0,022	0,571	0,96	1,24	0,642	0,070	0,156	0,004

Questionário de qualidade de vida – IBS													
Disforia	12,30	11,94	11,12	11,39	11,98	0,363	0,705	1,05	1,36	0,533	0,931	0,106	0,262
Interferência com a atividade	11,53	11,29	10,68	10,51	11,03	0,924	0,981	0,96	1,24	0,296	0,582	0,459	0,276
Imagem Corporal	8,37	8,51	8,23	7,69	8,81	0,012	0,887	0,77	0,99	0,250	0,431	0,132	0,005
Preocupação com a saúde	5,74	6,45	6,24	6,24	6,61	0,039	0,325	0,69	0,89	0,014	0,636	0,277	0,281
Evitação de alimentos	6,01	6,81	5,87	6,05	5,99	0,536	0,881	1,03	1,33	0,975	0,116	0,817	0,905
Reação Social	6,80	7,03	6,72	6,91	6,78	0,583	0,352	0,50	0,64	0,929	0,326	0,808	0,610
Sexual	2,94	3,00	2,63	2,93	2,60	0,015	0,230	0,36	0,46	0,060	0,028	0,830	0,070
Relacionamentos	4,68	4,97	4,25	4,59	4,76	0,449	0,930	0,60	0,78	0,775	0,475	0,090	0,571

Diferenças significativas mínimas entre duas médias ao nível de 5% –LSD

Exemplo 7 Ensaio clínico para avaliar os efeitos de pó de kiwi ouro Gold3 sobre as populações microbianas do cólon

Visão geral

[196] O estudo de intervenção humana descrito no Exemplo 5 foi usado para determinar o efeito de suplementos derivados de kiwi sobre a composição microbiana colônica e metabolismo. Conforme descrito, dois suplementos derivados de kiwi, polpa de kiwi verde ACTAZIN™ (*Actinidia deliciosa* 'Hayward') e polpa de kiwi GOLD (*Actinidia chinensis* 'Zesy002' Gold3) (Anagenix Ltd, Wellington, Nova Zelândia), foram usados como intervenções dietéticas no ensaio. Estas cápsulas eram suplementos alimentares processados a frio formulados para manter a integridade dos compostos de kiwi inatos. A preparação foi realizada de acordo com o Exemplo 1, acima.

[197] Foram avaliados os resultados para suplementos de kiwi de ACTAZIN™ (2400 mg e 600 mg) e GOLD (2400 mg). Os participantes no ensaio clínico foram recrutados para um grupo saudável de 19 participantes e um grupo funcionalmente constipado de 9 participantes, cada um dos quais realizaram todos os tratamentos e um placebo durante 4 semanas de uma forma cruzada aleatória com períodos de washout de 2 semanas. A modificação da composição da microbiota colônica foi determinada por sequenciamento do gene rRNA 16S e os produtos metabólicos finais foram medidos utilizando cromatografia em fase gasosa.

[198] No grupo funcionalmente constipado, observou-se que a abundância relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* aumentou significativamente ($P = 0,024$) de 3,4% para 7,0% após a suplementação com OURO. Menores proporções de *F. prausnitzii* são muitas vezes associadas com transtornos gastrointestinais; especialmente aqueles com uma patologia inflamatória. A descoberta de que a

suplementação com GOLD aumentou a abundância de *F. prausnitzii* oferece uma estratégia para corrigir a disbiose da microbiota colônica, já que *F. prausnitzii* é um importante produtor de butirato e também tem mostrado que exerce efeitos anti-inflamatórios.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene rRNA 16S

[199] Todas as amostras fecais foram enviadas em gelo seco para Plant & Food Research, Palmerston North, onde foram recebidas e armazenadas a -20°C. Duzentos e cinquenta miligramas de cada amostra foram pesados em um microtubo estéril e o DNA foi extraído de cada amostra utilizando o Kit de isolamento de DNA MO-BIO PowerSoil® (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA # 12888).

[200] PCR foi realizado para amplificar as regiões variáveis V3-V4 do gene rRNA 16S (posições 341-805 no gene rRNA de *Escherichia coli*), utilizando o iniciador direto

Bakt_341F

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGNGGCWGCAG**** (SEQ

ID NO: 1) e iniciador inverso Bakt_805R

GTCTCGTGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGTATCTAATCC**** (SEQ

ID NO: 2) Herlemann et al. 2000; W=A/T, H=A/C/T, V=G/C/A, N=G/A/T/C). A sequência de iniciador apresentada em negrito foi usada para ligação à região de amplicon de interesse e o resto do iniciador foi usado para ligação aos adaptadores de índice Illumina®.

[201] Cada PCR foi realizado em um volume total de 50 µL de consistindo em 25 µL de mistura master HotStarTaq® (QIAGEN, Melbourne, Australia), 1 µL de DNA de molde ou controle negativo (H₂O estéril) e 12 µL de cada um dos iniciadores direto e inverso a uma concentração final de 0,1 µM. As condições de PCR incluíram

uma desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos, seguida por trinta ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de reconhecimento a 55°C, 30 segundos de extensão a 72°C, e terminando com uma etapa de extensão de 5 minutos a 72°C.

[202] Os produtos de PCR foram purificados em coluna utilizando o kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen, Melbourne, Austrália), quantificados utilizando o fluorímetro Qubit® 2.0 (Life Technologies™), e enviados para New Zealand Genomics Ltd (NZGL), Massey Genome Service (MGS), Nova Zelândia (NZ). Em NZGL, a segunda etapa de PCR foi realizada, os amplicons foram verificados na biblioteca QC, diluídos e agrupados. As bibliotecas foram, em seguida, carregadas no instrumento Illumina® MiSeq ao longo de três execuções com extremidade emparelhada (PE) de 2 x 250 pb.

Bioinformática

[203] Os dados de sequenciamento Illumina® MiSeq foram analisados pelo software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) versão 1.8.0; Caporaso et al. 2010). Para montar as leituras de extremidade emparelhada em uma única sequência contínua, foi usado PANDASeq com parâmetros de pelo menos 40 pb sobrepostos, um mínimo de comprimento de 350 pb e um máximo de comprimento de 500 bp (Masella et al. 2012). Quimeras putativas foram filtrados a partir das sequências e as leituras foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUS) com base em um valor de limiar de 97% de identidade utilizando USEARCH e UCLUST (Edgar 2010). Uma subamostra do total de leituras foi tomada para permitir o processamento mais rápido das amostras e para normalizar a aproximadamente 15.000 leituras por amostra, o que é suficiente para atribuição filogenética e taxonômica (Caporaso et al. 2011; Schloss et al. 2012).

[204] O alinhamento de sequências foi realizado utilizando PyNAST

(Caporaso et al. 2010) com referência à base de dados de referência Greengenes core (versão13_8) (DeSantis et al. 2006). A atribuição taxonômica foi feita usando o classificador Bayesiano Naive RDP (Wang et al., 2007). Os grupos saudáveis e FC foram analisados separadamente e o efeito de cada um dos quatro tratamentos sobre a composição da comunidade microbiana foi determinado por comparação da abundância média de cada gênero de bactérias depois de cada tratamento (maior que 1% de abundância em pelo menos uma das oito amostras) com o valor médio antes do tratamento.

Quantificação de ácido orgânico por GC

[205] Uma porção de 500 a 1000 mg de cada amostra fecal foi pesada em um tubo limpo e diluída a 1:10 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O padrão interno (butirato de etila) foi incluído para gerar uma concentração final de 5 mM. Os ácidos orgânicos foram quantificados por GC usando um método modificado, como anteriormente descrito (Richardson et al., 1989).

[206] A análise foi realizada em um sistema de cromatografia a gás de Shimadzu (GC-17A, Quioto, Japão) equipado com um detector de ionização de chamas e equipado com uma coluna HP-1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O instrumento foi controlado e os cromatogramas foram adquiridos utilizando software GC Solution Chromatography Data System (Shimadzu, Versão 2.3). As curvas padrões foram preparadas seguindo a análise de soluções padrões de ácidos fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, láctico, succínico, isovalérico, valérico, heptanoico, e hexanoico. As concentrações de ácidos orgânicos foram expressas como $\mu\text{mol/g}$ de fezes.

Análise Estatística

[207] Os cálculos estatísticos foram conduzidos em R Studio usando o pacote

de estatísticas (R Studio 2012). O teste dos postos sinalizados de Wilcoxon foi realizado para avaliar diferenças significativas entre a taxonomia ao nível de gênero e diferenças significativas entre as concentrações de ácidos orgânicos, antes e depois de cada tratamento. Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado significativo após a correção por comparações múltiplas, utilizando o método de Taxa de Descobertas Falsas (FDR) em função do ajuste de p. (Benjamini e Hochberg 1995).

Exemplo 8 Resultados do tratamento sobre as populações microbianas colônicas

Sequenciamento do gene 16S rRNA

[208] O sequenciamento de rendimento elevado foi realizado para regiões variáveis do gene 16S rRNA, amplificadas do DNA bacteriano derivado de amostra fecal. Isto resultou em 26,3 milhões de leituras. Depois da filtração de qualidade, remoção de quimera e subamostragem, um total de 3,72 milhões de leituras foram obtidas com uma média de 14879 (14139 no mínimo-14999 no máximo) sequências por amostra.

[209] Em todas as amostras, 218 filotipos ao nível de espécies foram observados a um limiar de identidade de sequência de 97%. No grupo saudável, *Clostridiales* aumentou significativamente após a suplementação de GOLD de 5,0% a 7,6% ($P = 0,042$) (Tabela 9). No grupo FC, *Faecalibacteriwn prausnitzii* aumentou significativamente após o tratamento com GOLD de 3,4% a 7,0% ($P = 0,024$), um aumento de duas vezes, enquanto *Dorea spp.* aumentou de 0,9% a 1,4% ($P = 0,008$) após o tratamento com ACTAZIN™ H (Tabela 10). Para o grupo FC, *Rwninococcus spp.* diminuiu de 9,9% para 5,6% ($P = 0,024$) após o período de tratamento com placebo (Tabela 10).

[210] Dos nove participantes que consumiram GOLD no grupo FC, oito registraram aumento de *F. prausnitzii*, com apenas uma redução ligeiramente menor sendo observada (Figura 5B). Ao comparar os grupos saudáveis e com FC, muitos dos gêneros observados foram significativamente diferentes entre os grupos, os mais notáveis sendo as espécies *Bacteroides* spp. e *Ruminococcaceae* que foram significativamente maiores no grupo saudável e *Akkennansia* spp. que foi significativamente elevada no grupo FC.

Produção de ácido orgânico

[211] Lactato, formiato e isovalerato não foram detectados em amostras fecais neste estudo. Hexanoato diminuiu significativamente em concentração de 0,6 µmol/g a 0,2 µmol/g ($P = 0,030$) após o tratamento com GOLD no grupo saudável (Tabela 11). Succinato diminuiu significativamente em concentração de 2,3 µmol/g a 1,7µmol/g ($P = 0,040$) após o tratamento com placebo no grupo FC (Tabela 12). Não foram observadas outras alterações significativas nas concentrações de ácidos orgânicos em qualquer um dos tratamentos. As diferenças quantitativas entre antes e após cada tratamento foram geralmente modestas, com exceção para o acetato que aumentou ou diminuiu por até 13 µmol/g depois de alguns tratamentos.

Tabela 9: Abundância relativa de grupos bacterianos prevalentes em resposta a tratamentos no grupo saudável

	Placebo		GOLD		ACTAZIN™ L		ACTAZIN™ H	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<i>Bacteroides</i>	18,8 ± 4,0	18,0 ± 3,2	23,1 ± 4,6	22,0 ± 4,2	16,7 ± 3,1	18,4 ± 3,9	19,4 ± 3,2	18,1 ± 3,8
<i>Ruminococcaceae</i> [†]	16,3 ± 2,4	19,6 ± 3,0	17,4 ± 2,3	17,8 ± 2,5	19,9 ± 2,5	22,2 ± 3,8	18,4 ± 2,6	19,9 ± 3,3
<i>Lachnospiraceae</i> [†]	10,8 ± 1,3	11,0 ± 1,5	11,9 ± 1,9	9,5 ± 1,3	11,6 ± 1,6	9,3 ± 1,7	11,6 ± 1,6	11,0 ± 1,4
<i>Faecalibacterium</i>	7,0 ± 1,5	5,7 ± 1,0	7,2 ± 1,6	5,3 ± 0,9	6,3 ± 1,6	4,6 ± 0,8	6,7 ± 1,1	6,5 ± 1,6
<i>Clostridiales</i> [†]	5,9 ± 0,9	5,7 ± 1,0	5,0 ± 0,9	7,6 ± 1,1*	5,9 ± 0,7	5,0 ± 1,1	6,6 ± 1,2	5,6 ± 0,9
<i>Coprococcus</i>	6,6 ± 1,0	5,5 ± 0,8	5,9 ± 1,1	5,1 ± 0,7	5,4 ± 0,8	5,2 ± 0,8	5,1 ± 0,8	4,9 ± 0,8
<i>Blautia</i>	5,8 ± 0,9	4,7 ± 1,0	4,3 ± 0,6	4,8 ± 1,0	4,7 ± 0,7	6,3 ± 1,7	4,8 ± 1,1	6,1 ± 1,8
<i>Ruminococcus</i>	4,9 ± 1,0	6,6 ± 1,6	4,2 ± 0,6	4,4 ± 1,0	6,4 ± 1,0	7,2 ± 1,3	4,1 ± 0,8	5,6 ± 1,2
<i>Rikenellaceae</i> [†]	2,8 ± 0,9	2,7 ± 0,7	2,7 ± 0,7	2,9 ± 1,0	2,8 ± 1,0	2,5 ± 0,9	3,0 ± 0,6	3,5 ± 0,8
<i>Bactérias bífidas</i>	3,0 ± 1,0	2,3 ± 0,6	2,5 ± 1,2	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,4	3,5 ± 1,1	2,7 ± 0,9	2,6 ± 0,8
<i>Bacteroidales</i> [†]	2,2 ± 1,0	2,2 ± 0,8	2,0 ± 0,9	1,9 ± 0,8	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3	2,6 ± 1,1	1,7 ± 0,6
<i>Lachnospira</i>	1,6 ± 0,5	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,8 ± 0,5	1,3 ± 0,4
<i>Parabacteroides</i>	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,8 ± 0,6	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,3
<i>Collinsella</i>	1,8 ± 0,7	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,3
<i>Akkermansia</i>	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,7	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,3
<i>Oscillospira</i>	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,5	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2

<i>Prevotella</i>	1,5 ± 0,7	2,6 ± 1,8	0,8 ± 0,4	2,1 ± 1,5	2,5 ± 1,33	0,7 ± 0,3	0,9 ± 0,5	1,6 ± 0,9
<i>Dorea</i>	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2
<i>Clostridiaceae</i> [†]	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3
Não atribuído	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Dados de sequenciamento de Illumina® MiSeq mostrando gêneros que estão presentes em mais de um por cento de abundância em pelo menos uma amostra. Os dados são os valores médios calculados para todos os participantes ± erro padrão da média (EPM) antes e após cada período de tratamento. * $P \leq 0,05$ - Significativamente diferente em comparação com o pré-tratamento baseado no teste dos postos sinalizados de Wilcoxon após a correção da taxa de descoberta falsa para comparações múltiplas. [†] Algumas bactérias só podiam ser classificadas no nível da ordem ou da família.

Tabela 10: Abundância relativa de grupos bacterianos prevalentes em resposta a tratamentos no grupo funcionalmente constipado

	Placebo		GOLD		ACTAZIN™ L		ACTAZIN™ H	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<i>Ruminococcaceae</i> [†]	17,2 ± 2,3	19,9 ± 2,9	17,1 ± 3,8	16,3 ± 2,1	17,9 ± 2,6	15,0 ± 2,3	16,5 ± 3,1	18,8 ± 2,1
<i>Bacteroides</i>	12,6 ± 3,1	14,4 ± 2,2	14,2 ± 2,6	15,5 ± 2,6	13,9 ± 2,2	12,2 ± 2,5	14,0 ± 2,9	16,3 ± 3,1
<i>Lachnospiraceae</i> [†]	11,4 ± 1,6	8,0 ± 2,3	10,0 ± 2,5	13,9 ± 3,3	10,8 ± 3,1	11,0 ± 2,3	11,7 ± 2,5	8,7 ± 2,2
<i>Faecalibacterium</i>	7,9 ± 2,8	5,8 ± 2,1	3,4 ± 1,0	7,0 ± 1,1*	4,9 ± 1,7	5,0 ± 1,4	7,7 ± 2,1	3,1 ± 1,0
<i>Clostridiales</i> [†]	4,8 ± 0,6	6,8 ± 1,7	6,4 ± 1,3	5,5 ± 1,1	6,4 ± 1,2	6,7 ± 1,7	6,0 ± 1,4	7,5 ± 1,8
<i>Coprococcus</i>	6,5 ± 1,4	6,1 ± 1,1	6,7 ± 1,7	6,6 ± 1,4	6,9 ± 1,4	8,6 ± 1,2	6,0 ± 1,2	7,1 ± 1,9
<i>Blautia</i>	6,6 ± 1,8	3,5 ± 0,9	7,1 ± 2,0	6,0 ± 1,5	6,9 ± 1,5	7,5 ± 1,8	5,9 ± 2,1	5,4 ± 1,3

<i>Ruminococcus</i>	9,9 ± 2,6	5,6 ± 1,0*	6,4 ± 1,4	5,5 ± 0,7	6,2 ± 2,0	7,4 ± 1,5	5,5 ± 1,1	7,2 ± 1,3
<i>Bactérias bífidas</i>	2,6 ± 1,3	2,6 ± 1,0	3,5 ± 1,5	2,6 ± 1,0	2,7 ± 1,5	2,7 ± 0,9	4,0 ± 1,6	1,8 ± 0,8
<i>Akkermansia</i>	2,7 ± 1,7	4,8 ± 2,0	5,0 ± 1,8	2,6 ± 1,0	3,3 ± 1,1	3,3 ± 1,5	3,6 ± 1,0	5,6 ± 2,3
<i>Rikenellaceae</i> †	2,3 ± 0,6	3,1 ± 0,6	3,9 ± 1,2	2,4 ± 0,5	4,0 ± 1,1	3,9 ± 1,3	2,6 ± 0,7	3,2 ± 0,9
<i>Christensenellaceae</i>	1,0 ± 0,6	1,5 ± 0,6	2,2 ± 1,4	1,1 ± 0,6	1,8 ± 0,8	1,4 ± 0,6	2,3 ± 1,6	2,2 ± 1,3
<i>Prevotella</i>	1,8 ± 1,1	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,5	2,0 ± 1,1	0,2 ± 0,1
<i>Collinsella</i>	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,3
Não atribuído	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,1
<i>Parabacteroides</i>	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,3
<i>Oscillospira</i>	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3
<i>Lachnospira</i>	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,4	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,9	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,6	0,5 ± 0,1
<i>Dorea</i>	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,3*
<i>Coriobacteriaceae</i> †	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4
<i>Barnesiellaceae</i> †	0,9 ± 0,3	4,0 ± 2,4	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,5	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,3
<i>Clostridiaceae</i> †	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Dados de sequenciamento de Illumina® MiSeq mostrando gêneros que estão presentes em mais de um por cento de abundância em pelo menos uma amostra. Os dados são os valores médios calculados para todos os participantes ± erro padrão da média (EPM) antes e após cada período de tratamento. * $P \leq 0,05$ – Significativamente diferente em comparação com o pré-tratamento baseado no teste dos postos sinalizados de Wilcoxon após a correção da taxa de descoberta falsa para comparações múltiplas. † Algumas bactérias só podiam ser classificadas no nível da ordem ou da família.

Tabela 11: Concentrações de ácidos orgânicos em amostras fecais em resposta aos quatro tratamentos no grupo saudável

	Média de Pré	EPM de Pré	Média de Pós	EPM de Pós	Valor <i>P</i>	Diferença
Placebo						
Acetato	36,7	5,8	43,2	5,2	1,00	6,5
Butirato	10,5	2,4	13,9	2,6	0,28	3,4
Heptanoato	0,0	0,0	0,0	0,0	0,84	0,0
Hexanoato	0,4	0,2	0,6	0,2	0,58	0,2
Isobutirato	0,6	0,2	0,8	0,2	0,82	0,2
Propionato	7,8	1,7	10,6	2,3	0,74	2,8
Succinato	1,6	0,6	1,0	0,1	0,48	-0,6
Valerato	1,5	0,2	2,0	0,3	0,34	0,5
GOLD						
Acetato	43,7	5,5	31,4	4,8	0,05	-12,3
Butirato	14,2	3,0	9,5	2,7	0,18	-4,7
Heptanoato	0,1	0,1	0,0	0,0	0,20	-0,1
Hexanoato	0,6	0,2	0,2	0,1	0,03*	-0,4
Isobutirato	0,6	0,2	0,4	0,1	0,92	-0,2
Propionato	7,0	1,4	6,0	1,4	0,96	-1,0
Succinato	1,5	0,6	0,9	0,1	1,00	-0,6
Valerato	1,6	0,2	1,3	0,1	0,30	-0,3
ACTAZIN™ L						
Acetato	42,8	5,9	44,0	6,1	1,00	1,2
Butirato	15,3	2,2	13,5	2,2	1,00	-1,8
Heptanoato	0,1	0,1	0,0	0,0	1,00	-0,1

o						
Hexanoato	0,7	0,3	0,8	0,3	1,00	0,1
Isobutirato	0,8	0,3	0,7	0,2	1,00	-0,1
Propionato	8,9	1,3	9,9	1,5	1,00	1,0
Succinato	2,2	0,8	1,1	0,2	0,52	-1,1
Valerato	1,7	0,3	1,8	0,2	1,00	0,1
ACTAZIN™ H						
Acetato	45,2	6,7	32,8	5,0	0,32	-12,4
Butirato	11,9	2,5	10,0	2,4	0,70	-1,9
Heptanoato	0,0	0,0	0,0	0,0	1,00	0,0
Hexanoato	0,3	0,1	0,4	0,2	1,00	0,1
Isobutirato	0,7	0,2	0,5	0,1	0,76	-0,2
Propionato	8,5	1,1	7,7	1,7	1,00	-0,8
Succinato	2,7	1,6	1,1	0,2	1,00	-1,6
Valerato	1,5	0,2	1,5	0,2	1,00	0,0

Níveis medidos por cromatografia gasosa (GC), expressos em $\mu\text{mol/g}$ de fezes. A diferença indica se um aumento líquido (valores positivos) ou uma diminuição líquida (valores negativos) foi observada após os tratamentos. * $P \leq 0,05$ – Significativamente diferente em comparação com o pré-tratamento baseado no teste dos postos sinalizados de Wilcoxon após a correção da taxa de descoberta falsa para comparações múltiplas.

Tabela 12: Concentrações de ácidos orgânicos em amostras fecais em resposta aos quatro tratamentos no grupo funcionalmente constipado

	Média de Pré	EPM de Pré	Média de Pós	EPM de Pós	Valor P	Diferença
Placebo						
Acetato	33,7	7,2	34,7	3,9	1,00	1,0
Butirato	7,0	2,5	5,9	2,1	1,00	-1,1
Heptanoato	0,0	0,0	0,2	0,2	1,00	0,2

Hexanoato	0,2	0,1	0,2	0,1	1,00	0,0
Isobutirato	1,2	0,3	1,5	0,3	1,00	0,3
Propionato	8,5	1,5	9,0	1,4	1,00	0,5
Succinato	2,3	0,3	1,7	0,2	0,04*	-0,6
Valerato	1,4	0,3	1,5	0,3	1,00	0,1
GOLD						
Acetato	40,5	8,7	39,1	7,4	1,00	-1,4
Butirato	8,3	3,8	8,5	2,3	1,00	0,2
Heptanoato	0,0	0,0	0,0	0,0	0,22	0,0
Hexanoato	0,1	0,1	0,4	0,2	0,56	0,3
Isobutirato	1,0	0,3	1,5	0,2	0,72	0,5
Propionato	9,2	2,1	10,4	2,2	1,00	1,2
Succinato	1,7	0,2	1,8	0,2	1,00	0,1
Valerato	1,4	0,3	1,8	0,3	1,00	0,4
ACTAZIN™ L						
Acetato	35,2	5,4	44,7	10,2	1,00	9,5
Butirato	9,4	2,4	10,3	3,1	1,00	0,9
Heptanoato	0,1	0,0	0,1	0,1	1,00	0,0
Hexanoato	0,3	0,2	0,7	0,5	1,00	0,4
Isobutirato	1,6	0,3	1,6	0,3	1,00	0,0
Propionato	9,2	1,7	10,5	2,1	1,00	1,3
Succinato	1,8	0,1	1,7	0,1	0,60	-0,1
Valerato	1,9	0,3	2,0	0,3	1,00	0,1
ACTAZIN™ H						
Acetato	46,0	10,0	32,3	4,2	0,72	-13,7
Butirato	9,5	3,7	4,0	1,2	1,00	-5,5
Heptanoato	0,2	0,2	0,0	0,0	0,28	-0,2
Hexanoato	0,3	0,2	0,1	0,0	0,40	-0,2

Isobutirato	1,2	0,4	1,4	0,3	0,72	0,2
Propionato	10,8	3,2	7,5	1,0	1,00	-3,3
Succinato	2,0	0,2	1,9	0,2	1,00	-0,1
Valerato	1,4	0,4	1,3	0,2	1,00	-0,1

Níveis medidos por cromatografia gasosa (GC), expressos em $\mu\text{mol/g}$ de fezes. A diferença indica se um aumento líquido (valores positivos) ou uma diminuição líquida (valores negativos) foi observada após os tratamentos. * $P \leq 0,05$ – Significativamente diferente em comparação com o pré-tratamento baseado no teste dos postos sinalizados de Wilcoxon após a correção da taxa de descoberta falsa para comparações múltiplas.

Discussão

[212] Foi determinado que vários grupos bacterianos foram significativamente alterados em abundância após o consumo de suplementos derivados de kiwi. *Clostridiales* aumentou em 2,6% depois de suplementação com GOLD (Gold3) no grupo saudável, embora as implicações deste aumento ainda estejam sob investigação. A abundância relativa de *F. prausnitzii* foi significativamente elevada (3,6%) no grupo FC, após um período de 4 semanas de suplemento com o GOLD baseado em kiwi ouro.

[213] Particularmente, *F. prausnitzii* é um produtor de butirato conhecido. O butirato é a fonte de energia preferida para as células epiteliais do cólon e desempenha um papel no alívio da inflamação, bem como atenua a carcinogênese, colonização patogênica, e estresse oxidativo (Hamer et al. 2008; Macfarlane e Macfarlane 2011). Em um estudo recente, demonstrou-se que a administração de uma bactéria produtora de butirato, *Clostridium tyrobutyricum*, protegeu os camundongos de colite induzida por dextrano sulfato de sódio (Hudcovic et al. 2012). Portanto, o aumento da quantidade de *F. prausnitzii* no cólon pode ajudar a atenuar os sintomas de transtornos gastrointestinais, através da produção elevada

de butirato.

[214] Como o trato gastrointestinal humano consiste em cerca de 10^{14} células microbianas (Egert et al. 2006) e a abundância de *F. prausnitzii* é de cerca de 5% (Miquel et al. 2013), isto equivale a uma concentração de aproximadamente cinco trilhões de células *F. prausnitzii*, que podem exercer um efeito significativo sobre as atividades microbianas e o metabolismo. O presente estudo mostrou uma proporção total de 5,6% de abundância de *F. prausnitzii* de todas as amostras no grupo FC (a média feita em todas as amostras no grupo FC, incluindo todos os tratamentos e washout), enquanto que 6,1% foi observado no grupo saudável. As amostras dos participantes no grupo FC antes da administração da suplementação de GOLD tinham uma abundância relativamente baixa de *F. prausnitzii* de 3,4%, que aumentou duas vezes para 7,0% depois do tratamento com GOLD. Uma diminuição de 7,2% para 5,3%, foi observada no grupo saudável o que pode ser devido aos níveis já elevados na linha de base. Isto foi observado em outros estudos, em que a concentração de referência de um grupo bacteriano tem uma influência substancial sobre a magnitude do efeito observado em resposta a uma intervenção dietética (Kolida et al. 2007; Tuohy et al. 2001).

[215] Houve pequenas diferenças entre os ácidos orgânicos depois dos tratamentos que podem ser atribuídas ao uso de amostras fecais como um substituto para a determinação *in situ* da composição e concentração de ácido orgânico. As concentrações de ácido orgânico diminuem distalmente no intestino grosso, o que é devido à fermentação secundária, a absorção na corrente sanguínea e/ou ao uso de ácidos orgânicos (particularmente o butirato) por colonócitos (Bach et al. 2000). Portanto, a medição de ácidos orgânicos em amostras fecais pode subestimar grandemente a concentração de ácidos orgânicos *in situ* (Millet et al.

2010).

[216] O butirato foi ligeiramente superior nas amostras fecais de participantes no grupo FC, o que se alinha com o aumento da abundância de *F. prausnitzii*. Lactato, formiato, e isovalerato não foram detectados nas amostras fecais de ambos os grupos em estudo. O lactato não é normalmente detectado em concentrações elevadas em amostras de fezes de indivíduos saudáveis, uma vez que é um intermediário em muitas redes metabólicas e é consumido por membros da microbiota como parte do metabolismo normal (Duncan et al. 2004; Belenguer et al. 2011). O formiato também atua como um intermediário e pode ser convertido em metano, dióxido de carbono e água, bem como ser apenas produzido na fase inicial de fermentação, normalmente no cólon proximal (Pryde et al. 2002; Huda-Faujan et al. 2010).

[217] *F. prausnizii* é bem caracterizada em termos das suas capacidades metabólicas e perfil de fermentação, apesar de ser uma bactéria sensível ao oxigênio que é difícil de cultivar em laboratório (Duncan et al. 2002). Apesar de seu domínio numérico no intestino e da natureza produtora de butirato, *F. prausnitzii* ainda não foi usada para melhorar a saúde digestiva. Dado que uma abundância empobrecida de *F. prausnitzii* é observada em vários transtornos gastrointestinais, foi proposto que *F. prausnitzii* poderia ser formulada como um probiótico e administrado a pessoas que sofrem de IBS ou IBD (Sokol et al. 2008; Sartor 2011). No entanto, este trabalho ainda está em curso. A sensibilidade ao oxigênio de *F. prausnitzii* torna difícil sua formulação como um componente de composições probióticas.

[218] O suplemento derivado de kiwi ouro, GOLD, fornece um meio de estimular seletivamente a proliferação de *F. prausnitzii*, comensal, e, portanto, é

considerado particularmente útil para transtornos gastrointestinais relacionados com a inflamação. Em conclusão, GOLD, melhorou a disbiose empobrecida de *F. prausnitzii* em participantes com constipação funcional. Como tal, o kiwi ouro em pó Gold3 pode ser usado para restaurar a microbiota para um estado saudável com benefícios anti-inflamatórios e maiores concentrações de butirato *in situ*.

Exemplo 9: Análise de qPCR de microbioma para o ensaio clínico em humanos

Sumário

[219] Este estudo investigou o efeito dos suplementos com kiwi de ACTAZIN™ (2400 mg) e GOLD (2400 mg) sobre as concentrações microbianas fecais em um estudo de intervenção humana bem como em experimentos de fermentação *in vitro*. O objetivo foi determinar o efeito das intervenções baseadas em kiwis sobre a composição microbiana das amostras. A modificação da composição da microbiota colônica foi determinada por reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) que complementa os dados de sequenciamento do gene 16S rRNA existente obtidos anteriormente. Ver Exemplos 7 e 8, acima.

[220] A qPCR em tempo real é um método comum usado para investigar a ecologia microbiana do trato gastrointestinal. Tem sido usada em vários estudos e pode dar uma indicação quantitativa de números microbianos. A quantificação foi realizada no instrumento Roche LightCycler® 480. Além das bactérias totais, grupos bacterianos individuais quantificados foram o grupo de *Clostridium coccoides*, o grupo de *Lachnospiraceae*, *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* e *Faecalibacterium prausnitzii*. Os grupos bacterianos acima também foram quantificados para o trabalho de fermentação *in vitro* com a exceção dos

Lactobacilos, que foram testados anteriormente.

[221] No grupo funcionalmente constipado, a concentração de *F. prausnitzii* aumentou após a suplementação com GOLD, ficando aquém de ser estatisticamente significativa. Menores proporções de *F. prauisnitzii* são muitas vezes associadas com transtornos gastrointestinais; especialmente aqueles com uma patologia inflamatória. A descoberta de que a suplementação com GOLD aumentou as concentrações de *F. prausnitzii* está de acordo com o aumento significativo na abundância encontrada nos dados de sequenciamento e fornece suporte para os efeitos prebióticos de consumo de GOLD.

Antecedentes

[222] O kiwi verde demonstrou que melhora aspectos da saúde gastrointestinal, incluindo a alteração da ecologia microbiana do ambiente colônico (Blatchford et al. 2015a; Blatchford et al. 2015b; Parkar et al. 2012). Acredita-se que estes benefícios derivam dos níveis inerentes de carboidratos resistentes à digestão (DRC), polifenois e vitamina C (Chan et al. 2007; Ferguson & Ferguson 2003). Os benefícios do kiwi ouro não foram claramente estabelecidos. Este estudo detalha experimentos realizados utilizando amostras a partir do ensaio clínico humano existente (descrito no Exemplo 5). O ensaio cruzado controlado com placebo, randomizado, duplo cego examinou o papel de dois ingredientes derivados de kiwi, ACTAZIN™ (kiwi verde) e GOLD (kiwi ouro Gold3), sobre a saúde digestiva.

[223] Os pontos finais primários medidos no ensaio original foram frequência das fezes, forma das fezes, e pontuações da qualidade de vida. Ver Exemplos 5 e 6. Os pontos finais secundários incluíram a medição de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), e também a medição das alterações nas abundâncias relativas das populações microbianas fecais utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA. A

análise de sequenciamento do gene 16S rRNA gerou uma imagem global da ecologia microbiana das amostras (sob a forma de porcentagens de abundância relativa), mas não gerou resultados quantitativos. Ver Exemplos 7 e 8, acima.

[224] Portanto, as seguintes amostras de DNA obtidas a partir do ensaio original foram usadas para o ensaio atual: 2400 mg de amostras de intervenção de GOLD pré- e pós- ($n = 52$), 2400 mg de amostras de intervenção ($n = 52$) de ACTAZIN™ e amostras de placebo ($n = 52$). Estas amostras foram usadas para determinar a concentração de grupos bacterianos selecionados usando qPCR, que produz uma medida quantitativa da concentração de bactérias em uma amostra.

Materiais e métodos

[225] Conforme detalhado no Exemplo 5, o modelo do estudo foi um ensaio cruzado, randomizado, duplo cego, controlado com placebo com participantes consumindo quatro tratamentos diferentes em quatro semanas, com duas semanas de washout entre cada tratamento. As intervenções foram administradas em cápsulas de 4 x 600 mg formuladas de modo a parecerem iguais para manter o tratamento cego, como mostrado na Tabela 13, abaixo. Ver também o Exemplo 5. Conforme descrito, os ingredientes em pó foram preparados de kiwi verde e kiwi ouro da Nova Zelândia, respectivamente. Ver Exemplos 1 e 5.

Tabela 13: Descrição da composição de intervenção

Intervenção	Composição	Dose	Administração(cápsulas)/dia
ACTAZIN	Pó de Kiwi Verde	2400 mg	4 x ACTAZIN™
GOLD	Pó de Kiwi Ouro	2400 mg	4 x GOLD
PLACEBO	Isomalte de cor verde (E102,E142)	2400 mg	4 x Placebo

[226] As bactérias selecionadas foram usadas como os gêneros representativos para cada um dos sete grupos bacterianos avaliados (Tabela 14).

Todos os isolados foram cultivados anaerobicamente a 37°C de um dia para o outro utilizando tubos Hungate selados com rolhas de borracha butílica, salvo indicação em contrário. Todos os meios foram obtidos da Oxoid (Adelaide, Austrália), salvo indicação em contrário.

[227] *Lactobacillus reuteri* (DPC 16) foi cultivado em caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS); *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20082) foram cultivadas em caldo de MRS suplementado com 0,05% (p/v) de cloridrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich); *Roseburia intestinalis* (DSM 14610) foi cultivada em meio de bactérias ruminais (DSMZ Medium 330); *Lachnospira multipara* (ATCC 19207) foi cultivada em meio RM02 suplementado com fluido ruminal filtrado (Leahy et al. 2010); *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) foi cultivada em caldo anaeróbico Wilkins-Chalgren suplementado com 0,05% (p/v) de cloridrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich) durante 2 dias; *Faecalibacterium prausnitzii* (DSM 17677) foi cultivada em caldo de infusão de cérebro-coração (BHI) suplementado com 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 0,0005% (p/v) de haemin (Sigma-Aldrich), 0,0005% (p/v) de vitamina K (Sigma-Aldrich) e 0,2% cloridrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich); *Escherichia coli* (Nissle) foi cultivada em caldo tróptico de soja (TSB) a 37°C aerobicamente.

Tabela 14: Tabela de iniciadores usados – modelo baseado em sequências de 16S rDNA

Bactérias alvo	Padrão bacteriano	Sequência do iniciador (5' → 3')	Temperatura de recozimento (°C)	Tempo de recozimento (s)	Referências
Bactérias totais	<i>Escherichia coli</i> Nissle	Direto: SEQ ID NO:3 TCCTACGGGAGGCAGCA GT Inverso: SEQ ID NO:4 GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60	60	(Nadkarni et al. 2002)
Bactérias bífidas	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20082	Direto: SEQ ID NO:5 GGGTGGTAATGCCGGATG Inverso: SEQ ID NO:6 CCACCGTTACACCGGGAA	66	45	(Kok et al. 1996)
Lactobacilos	<i>Lactobacillus reuteri</i> DPC16	Direto: SEQ ID NO:7 CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA Inverso: SEQ ID NO:8 CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG	60	30	(Fu et al. 2006)
Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Direto: SEQ ID NO:9 GGTGTGGCTTAAGTGCCAT Inverso: SEQ ID NO:10 CGGATGTAAGGGCCGTGC	63	20	(Rinttila et al. 2004)
<i>Faecalibacter ium prausnitzii</i>	<i>Faecalibacter ium prausnitzii</i> DSM 17677	Direto: SEQ ID NO:11 GGAGGAAGAAGGTCTTCGG Inverso: SEQ ID NO:12 AATTCCGCCTACCTCTGCACT	60	20	(Ramirez-Farias et al. 2009)
Grupo de C <i>coccoides</i>	<i>Roseburia intestinalis</i>	Direto: SEQ ID NO:13 AAATGACGGTACCTGACTAA	50	30	(Matsuki et al. 2002)

	DSM 14610	Inverso: SEQ ID NO:14 CTTGAGTTCATTCTGCGAA			
Lachnospiraceae	<i>Lachnospira multipara</i> ATCC 19207	Direto: SEQ ID NO:15 GACGGTACCTGACTAAGAAC Inverso: SEQ ID NO:16 AGTTTCATTCTGCGAACGT	63	30	(Paturi et al. 2014)

[228] A especificidade de cada cepa padrão de iniciadores foi avaliada utilizando análise *in silico* no software SnapGene® (www.snapgene.com). A densidade celular foi determinada utilizando um hemocitômetro de Neubauer e as culturas foram diluídas ou concentradas como requerido para $1,0 \times 10^8$ ou $1,0 \times 10^9$ células/mL. O DNA foi, em seguida, extraído utilizando o kit de isolamento de MO-BIO PowerSoil® DNA (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA, US # 12888). As curvas padrões foram construídas utilizando séries de diluições de cepas bacterianas representativas de cada grupo. As amostras e padrões foram executadas em triplicado pela quantificação absoluta no instrumento de PCR em tempo real Roche LightCycler® 480. A química de detecção de mistura mestre de Verde I SYBR (04707516001) da Roche foi usada para detectar a amplificação de DNA de cadeia dupla. O volume de reação total foi de 20 µL, consistindo em 10 µL de mistura mestre de verde I SyBr, 4 µL de iniciador direto (5X concentrado a 2,5 µM), 4 µL de iniciador inverso (5X concentrado a 2,5 µM) e 2 µL de molde de DNA ou água estéril (nenhum controle de molde).

[229] Cada teste de qPCR incluiu um ciclo de ativação (95°C) durante 5 minutos, ciclos de teste de 32-40 (incluindo a etapa de desnaturação a 95°C (30s), etapa de reconhecimento como na Tabela 14 e etapa de extensão a 72°C durante 1 minuto), e um ciclo de curva de fusão (60 a 95°C a 0,1°C por segundo, com aquisição

de fluorescência contínua) seguido por um ciclo de resfriamento a 40°C. O ciclo chamado curva de fusão Tm possibilitou a diferenciação entre o produto alvo e o produto de cadeia dupla não específico, tal como dímeros de iniciadores. Os iniciadores foram diluídos em água de grau PCR a uma concentração de 2,5 µM. Esta foi, em seguida, diluída de 1:5 para obter uma solução concentrada 0,5 µM na reação de PCR.

[230] Os cálculos estatísticos foram conduzidos em R usando o pacote de estatísticas (R Development Core Team 2008). O teste dos postos sinalizados de Wilcoxon foi realizado para avaliar diferenças significativas antes e depois de cada tratamento. Para as fermentações *in vitro*, diferenças significativas foram determinadas através da comparação do tempo 0 com outros pontos de tempo. Um valor de *P* menor que 0,05 foi considerado significativo após a correção por comparações múltiplas, utilizando o método de Taxa de Descobertas Falsas (FDR) em função do ajuste de *p*. em Studio R (Benjamini e Hochberg 1995).

Exemplo 10 Resultados da análise de qPCR de microbioma no ensaio clínico em humanos

[231] Os resultados dos dados de qPCR retratam um perfil microbiano relativamente estável ao longo do tempo para cada grupo bacteriano avaliado. Aumentos ou diminuições moderados foram observados após cada tratamento. A Tabela 15 apresenta dados de LightCycler® 480 qPCR apresentando grupos bacterianos como o número médio de cópias do gene 16S rRNA/grama de amostra fecal (LOG transformado) calculado e o erro padrão da média (EPM) antes e após cada período de tratamento no grupo saudável. A Tabela 16 apresenta dados de LightCycler® 480 qPCR apresentando grupos bacterianos como o número médio de cópias do gene 16S rRNA/grama de amostra fecal (LOG transformado) calculado e

o erro padrão da média (EPM) antes e após cada período de tratamento no grupo funcionalmente constipado.

[232] Conforme mostrado na Tabela 15 e na Figura 6, no grupo saudável após tratamento com GOLD, foram observados aumentos moderados nas bactérias totais, grupos de *C. coccoides*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* e *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, em que a concentração de *F. prausnitzii* permaneceu constante. Com suplementação de ACTAZIN™, ligeiras diminuições foram vistas nas bactérias totais, grupos de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, e *F. prausnitzii*, em que o grupo *C. coccoides* permaneceu constante e o grupo de *Lachnospiraceae* aumentou ligeiramente. O tratamento com placebo apresentou concentrações elevadas de bactérias totais e *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* e pequenos decréscimos nas concentrações de grupos de *C. coccoides*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, e *F. prausnitzii*.

[233] Conforme mostrado na Tabela 16 e na Figura 7, no grupo funcionalmente constipado após tratamento com GOLD, foram observados aumentos moderados nas bactérias totais, grupos de *Clostridium coccoides*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, e *Lactobacilli*, e uma diminuição menor em *Bifidobacterium* spp. A concentração de *F. prausnitzii* aumentou na maior parte de log 7,03 a 7,45 que quase atingiu significância ($P = 0,0503$) e está de acordo com uma elevação semelhante relatada nos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA. O aumento em números reais é de 231,9 milhões de números de cópias do gene 16S rRNA, que é um aumento de 179% após o tratamento com GOLD. Após tratamento com ACTAZIN™, foram observadas diminuições em todos os grupos de bactérias. Oito dos nove dos participantes

funcionalmente constipados mostraram um aumento nos níveis de *F. prausnitzii* após tratamento com GOLD. Ver Figura 5C. O tratamento com placebo apresentou concentrações elevadas em todos os grupos, exceto para *Lachnospiraceae* que permaneceu constante.

Tabela 15: Dados de LightCycler® 480 qPCR para o grupo saudável

	GOLD					
	Média de Pré	EPM de Pré	Média de Pós	EPM de Pós	valor <i>P</i>	valor <i>p fdr</i>
Bactéria Total	9,63	0,17	9,77	0,09	0,99	1,00
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	8,91	0,21	9,03	0,15	0,84	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,42	0,18	7,53	0,12	0,81	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromona</i>	7,44	0,17	7,59	0,13	0,44	0,88
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,59	0,14	7,63	0,13	0,95	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,36	0,23	6,42	0,19	0,99	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,87	0,18	6,87	0,13	0,72	1,00
	ACTAZIN™					
Bactéria Total	9,79	0,09	9,69	0,17	0,98	1,00
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	8,79	0,11	8,79	0,22	0,56	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,51	0,08	7,52	0,12	0,91	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromona</i>	7,6	0,1	7,43	0,16	0,60	1,00
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,53	0,07	7,44	0,14	0,91	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,49	0,18	6,41	0,24	0,90	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,97	0,12	6,78	0,21	0,31	0,62
	Placebo					

Bactéria Total	9,71	0,17	9,74	0,1	0,82	1,00
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	8,98	0,22	8,87	0,19	0,35	0,70
Grupo de Lachnospiraceae	7,56	0,2	7,47	0,15	0,51	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromona</i>	7,47	0,18	7,56	0,14	0,87	1,00
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,62	0,19	7,6	0,13	0,66	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,59	0,22	6,55	0,18	0,56	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,91	0,21	6,83	0,17	0,60	1,00

Tabela 16: Dados de LightCycler® 480 qPCR para o grupo funcionalmente constipado

	GOLD					
	Média de Pré	EPM de Pré	Média de Pós	EPM de Pós	valor p	valor p fdr
Bactéria Total	10,01	0,09	10,21	0,07	0,16	0,32
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	9,35	0,17	9,5	0,16	0,86	1,00
Grupo de Lachnospiraceae	7,85	0,11	7,96	0,11	1,00	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromona</i>	7,65	0,15	7,88	0,15	0,22	0,44
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,64	0,11	7,79	0,07	0,49	0,98
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,76	0,3	6,64	0,35	0,80	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7,03	0,16	7,45	0,13	0,05	0,10
ACTAZIN™						
Bactéria Total	10,13	0,15	9,98	0,11	0,34	0,68

Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	9,11	0,2	8,93	0,19	0,60	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,78	0,19	7,56	0,17	0,55	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromona</i>	7,82	0,17	7,5	0,13	0,16	0,32
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,75	0,15	7,67	0,12	0,73	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,95	0,15	6,43	0,27	0,22	0,44
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7,19	0,29	6,86	0,2	0,33	0,66
	Placebo					
Bactéria Total	9,96	0,16	10,08	0,12	0,49	0,98
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	9,23	0,2	9,35	0,17	0,60	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,8	0,17	7,8	0,17	1,00	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromona</i>	7,65	0,24	7,84	0,15	0,49	0,98
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,24	0,1	7,29	0,12	0,93	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,53	0,32	6,93	0,26	0,26	0,52
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7,12	0,29	7,16	0,26	0,73	1,00

[234] As Figuras 6 e 7 mostram os dados da concentração bacteriana graficamente em ambas as formas de log transformado e natural para os grupos saudáveis e com constipação funcional, respectivamente. A visualização dos dados nesta forma destaca quão estável a composição da microbiota fecal é ao longo do tempo.

[235] Nota-se que as bactérias do grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* constituem uma coleção considerável de degradadores primários na comunidade colônica humana. Os mesmos desempenham um papel importante no acesso de carboidrato não absorvido usando mecanismos de eliminação especializados. Entre estes estão os degradadores de celulose, amido, inulina e xilano, tais como *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, e *Bacteroides cellulosilyticus* (Flint et al. 2008; Walker et al. 2008). *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii*, e *Ruminococcus flavefaciens* são também do grupo de degradadores primários principais que são membros do grupo *C. coccoides* (Kurakawa et al. 2015).

[236] O grupo de *C. coccoides* constitui o maior subgrupo de bactérias no cólon, tipicamente constituindo 25-60% de abundância bacteriana total (Hold et al. 2002) e são compostos por uma grande proporção de produtores de butirato (Louis & Flint 2009). Dois principais microrganismos com estados de probiótico comprovados são *Bactérias bíidas* e *Lactobacilos*. As *Bactérias bíidas* têm sido muitas vezes associadas à microbiota saudável e são produtoras de acetato, que podem ter efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro. Os *Lactobacilos* consistem em um grupo de bactérias comensais de ácido láctico que foram exploradas durante séculos na produção de produtos lácteos e foram estudadas em centenas de ensaios no que diz respeito à sua eficácia probiótica (Reid 1999).

[237] O aumento da concentração de *F. prausnitzii* foi muito pequeno para ser significativo ($P = 0,0503$) após o período de 4 semanas de suplemento com o GOLD à base de kiwi ouro Gold3. *F. prausnitzii* é uma das espécies mais populosas do trato gastrointestinal humano, sendo normalmente observada em mais de 5% da proporção total da microbiota colônica de adultos saudáveis (Miquel et al. 2013). Os membros do *Firmicutes* phylum, *F. prausnitzii* são habitantes comensais do intestino grosso humano, que demonstraram propriedades anti-inflamatórias *in vivo* (Furet et al. 2010; Sokol et al. 2009). *F. prausnitzii* geram butirato como resultado da fermentação de carboidratos, assim como lactato e formiato (Duncan et al. 2002; Duncan et al. 2004). O butirato é a fonte de energia preferida para as células epiteliais do cólon e desempenha um papel no alívio da inflamação, bem como atenua a carcinogênese, colonização patogênica, e estresse oxidativo (Hamer et al. 2008; Macfarlane & Macfarlane 2011). GOLD estimula seletivamente a proliferação de *F. prausnitzii* comensais e, portanto, pode ser considerada como útil para transtornos gastrointestinais relacionados com a inflamação.

[238] Em resumo, os dados de qPCR confirmam os dados de abundância relativa microbiana e mostram que o suplemento derivado de kiwi ouro Gold3 aumentou a concentração de *F. prausnitzii* em participantes funcionalmente constipados. Isso demonstra um resultado benéfico já que se sabe que *F. prausnitzii* crescem no intestino grosso e geram butirato, que tem funções protetoras/benefícias para a saúde no intestino.

[239] Estes resultados são considerados como significativos, dado que *F. prausnitzii* é altamente sensível ao oxigênio (Rigottier-Gois 2013), e, portanto, um desafio para formulação e armazenagem como um agente probiótico. Portanto, as composições de kiwi ouro da invenção fornecem um meio eficiente e eficaz para

aumentar os teores de *F. prausnitzii* o que seria de outro modo difícil de modular.

[240] Os versados na técnica podem utilizar as descrições e ensinamentos deste documento para produzir outras modalidades e variações, sem experimentação indevida. Todas essas modalidades e variações são consideradas como fazendo parte da presente invenção.

[241] Deste modo, uma pessoa versada na técnica entenderá de imediato a partir da divulgação que modificações, substituições e/ou variações posteriores realizam substancialmente a mesma função ou atingem substancialmente o mesmo resultado já que as modalidades aqui descritas podem ser usadas de acordo com tais modalidades relacionadas da presente invenção. Dessa forma, a invenção tem por objetivo abranger, dentro do seu escopo, modificações, substituições, e variações de processos, fabricação, composições de matéria, compostos, meios, métodos e/ou etapas aqui descritas.

Referências

[242] Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F, van den Berg WB 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. Journal of Clinical Investigation 118(1): 205-16.

[243] Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Bjorksten B, Engstrand L, Jenmalm MC 2012. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. J Allergy Clin Immunol 129(2): 434-40, 440 e1-2.

[244] Adaim A. 2010. Investigating the effect of gold kiwifruit consumption on the incidence and symptoms of upper respiratory tract infections in preschool children: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters of Sciences in Human Nutrition and Human Health, Massey University,

Auckland, Nova Zelândia.

[245] Attaluri A, Donahoe R, Valestin J, Brown K, Rao SSC 2011. Randomised clinical trial: dried plums (prunes) vs. psyllium for constipation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 33(7): 822-828.

[246] Bach Knudsen KE, Jorgensen H, Canibe N. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. *The British Journal of Nutrition*. 2000; 84: 449-58.

[247] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307: 1915-20.

[248] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*. 1995; 57: 289-300.

[249] Belenguer A, Holtrop G, Duncan SH, Anderson SE, Calder AG, Flint HJ, et al. Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011; 77: 107-19.

[250] Bentley-Hewitt KL, Blatchford PA, Parkar SG, Ansell J, Pernthaner A. Digested and fermented green kiwifruit increases human beta-defensin 1 and 2 production *in vitro*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012; 67: 208-14.

[251] Blatchford P, Bentley-Hewitt KL, Stoklosinski H, McGhie T, Gearry R, Gibson G, Ansell J 2015a. In vitro characterisation of the fermentation profile and prebiotic capacity of gold-fleshed kiwifruit. *Benef Microbes* páginas 1-12. Published online at DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0006>.

[252] Blatchford P, Stoklosinski H, Walton G, Swann J, Gibson G, Gearry R, Ansell J 2015b. Kiwifruit fermentation drives positive gut microbial and metabolic

changes irrespective of initial microbiota composition. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6(1): 37-45.

[253] Boland, M.J., Hardman, M.J. 1972. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS Letters*, 27(2): 282-284.

[254] Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 16050-5.

[255] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13: 790-801.

[256] Candela M, Rampelli S, Turroni S, Severgnini M, Consolandi C, De Bellis G, et al. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiology*. 2012; 12: 95.

[257] Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*. 2010; 26: 266-7.

[258] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010; 7: 335-6.

[259] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108 Suppl 1: 4516-22.

[260] Cardona F, Andres-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human

health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 1415-1422.

[261] Chan AO, Leung G, Tong T, Wong NY. Increasing dietary fiber intake in terms of kiwifruit improves constipation in Chinese patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2007; 13: 4771-5.

[262] Chang C, Lin T, Lu Y, Liu T, Liu J. 2010. Kiwifruit improves bowel function in patients with irritable bowel syndrome with constipation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 19(4): 451-457.

[263] Chassard, C, Dapoigny, M, Scott, KP, Crouzet, L, Del'homme, C, Marquet, P, Martin, JC, Pickering, G, Ardid, D, Eschalier, A, Dubray, C, Flint, HJ and Bernalier-Donadille, A. 2012. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35: 828-838.

[264] Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One* 7(6): e39743.

[265] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 5069-72.

[266] de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, Gouveia Peluzio Mdo C 2014. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical Microbiology Reviews* 27(3): 482-9.

[267] de Vos WM, de Vos EA 2012. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition Revisão* 70 Suplemento 1: S45-56.

[268] de Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos WM 2013. Intestinal

microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics* 131(2): e550-8.

[269] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG 2008. The probiotic *Bifidobacterium infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research* 43(2): 164-74.

[270] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1377-90.

[271] Drummond L. 2013. The composition and nutritional value of kiwifruit. *Advances in Food and Nutrition Research* 68: 33-57.

[272] Drummond L, Gearry RB. 2013. Kiwifruit modulation of gastrointestinal motility. *Advances in Food and Nutrition Research* 68: 219-232.

[273] Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52: 2141-6.

[274] Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 5810-7.

[275] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2460-1.

[276] Egert M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Venema K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*. 2006; 14: 86-91.

[277] Eidenberger T, Selg M, Fuerst S, Krennhuber K. 2014. *In-vitro* inhibition

of human lipase PS by polyphenols from kiwi fruit. Journal of Food Research. 3(4): 71-77.

[278] Ferguson AR, Ferguson LR. Are kiwifruit really good for you? In: Huang HW, editor. Proceedings of the Fifth International Symposium on Kiwifruit. 2003. 131-8.

[279] Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. Nat Rev Microbiol 6(2): 121-31.

[280] Fu CJ, Carter JN, Li Y, Porter JH, Kerley MS 2006. Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. Letters in Applied Microbiology 42(5): 490-494.

[281] Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A 2013. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. J Gastroenterol Hepatol 28(4): 613-9.

[282] Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. Diabetes. 2010; 59: 3049-57.

[283] Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Sulnier D, Loh G, MacFarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickmann R, Lenoir-Wijnkoop I, Walker C, Buddington R. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods, 7: 1-19.

[284] Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota

controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes.* 2014; 5: 3-17.

[285] Gostner A, Blaut M, Schäffer V, Kozianowski G, Theis S, Klingeberg M, et al. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 2006; 95: 40-50.

[286] Guidance for industry: irritable bowel syndrome – clinical evaluation of drugs for treatment. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM205269.pdf>

[287] Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Artigo revisado: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 27: 104-19.

[288] Hazenberg MP, van de Merwe JP, Pena AS, Pennock-Schroder AM, van Lieshout LM. Antibodies to *Coprococcus comes* in sera of patients with Crohn's disease. Isolation and purification of the agglutinating antigen tested with an ELISA technique. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology.* 1987; 23: 143-8.

[289] Herlemann DPR, Labrenz M, Juergens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME Journal.* 2011; 5: 1571-9.

[290] Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 39(1): 33-9.

[291] Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, et al. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in

inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *The Open Biochemistry Journal.* 2010; 4: 53-8.

[292] Hudcovic T, Kolinska J, Klepetar J, Stepankova R, Rezanka T, Srutkova D, et al. Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clinical and Experimental Immunology.* 2012; 167: 356-65.

[293] Husebye E, Hellström PM, Sundler F, Chen J, and Midtvedt T. 2001. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: G368-G380.

[294] Hunter DC, Skinner MA, Wolber FM, Booth CL, Loh JMS, Wohlers M, Stevenson LM, Kruger MC. 2012. Consumption of gold kiwifruit reduces severity and duration of selected upper respiratory tract infection symptoms and increases plasma vitamin C concentration in healthy older adults. *British Journal of Nutrition* 108: 1235- 1245.

[295] Jeffery IB, O'Toole PW, Ohman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, Simren M 2012. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61(7): 997-1006.

[296] Kalliomaki M, Satokari R, Lahteenoja H, Vahamiko S, Gronlund J, Routi T, Salminen S 2012. Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54(6): 727-32.

[297] L Kaur, SM Rutherford, PJ Moughan, L Drummond, and MJ Boland. 2010. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using

an *in vitro* digestion model, J. Agric. Food Chem. 58 (8): 5074-5080.

[298] Khalif IL, Quigley EMM, Konovitch EA and Maximova ID. 2005. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. Digestive and Liver Disease 37: 838-849.

[299] Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nature Medicine 19(5): 576-85.

[300] Kok RG, DeWaal A, Schut F, Welling GW, Weenk G, Hellingwerf KJ 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. Applied and Environmental Microbiology 62(10): 3668-3672.

[301] Kolida S, Gibson GR. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. The Journal of Nutrition, 137(11): 2503S-2506S.

[302] Kolida S, Meyer D, Gibson GR. A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. Eur. J. Clin. Nutr. 2007; 61: 1189-95.

[303] Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Backhed F 2011. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 Suplemento 1: 4592-8.

[304] Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Kubota H, Takada T, Kado Y, Asahara T, Takahashi T, Nomoto K 2015. Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* group in the Japanese population, as demonstrated by reverse transcription-quantitative PCR. PLoS One 10(5): e0126226.

[305] Leahy SC, Kelly WJ, Altermann E, Ronimus RS, Yeoman CJ, Pacheco DM, Li D, Kong Z, McTavish S, Sang C, Lambie SC, Janssen PH, Dey D, Attwood GT 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS One* 5(1).

[306] Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suplemento 1: 4615-22.

[307] Lepage P, Hasler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskas L, Dore J, Raedler A, Schreiber S 2011. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141(1): 227-36.

[308] Leung L, Riutta T, Kotecha J, Rosser W. 2011. Chronic constipation: An evidence-based review. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 24(4): 436-451.

[309] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI 2006. Microbial ecology - Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122): 1022-1023.

[310] Liu LWC. 2011. Chronic constipation: current treatment options. *Canadian Journal of Gastroenterology* 25(Suppl B): 22B-28B.

[311] Louis P, Flint HJ 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294(1): 1-8.

[312] Maccaferri S, Candela M, Turroni S, Centanni M, Severgnini M, Consolandi C, Cavina P, Brigidi P 2012. IBS-associated phylogenetic unbalances of

the intestinal microbiota are not reverted by probiotic supplementation. Gut Microbes 3(5): 406-13.

[313] Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. J. Clin. Gastroenterol. 2011; 45 Suprimento: S120-7.

[314] R Maddumage, NJ Nieuwenhuizen, SM Bulley, JM Cooney, SA Green, RG Atkinson. 2013. Diversity and relative levels of actinidin, kiwelin, and thaumatin-like allergens in 15 varieties of kiwifruit (Actinidia). J. Agric. Food Chem. 61: 728-739.

[315] Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, Brown DG, Neufeld JD. PANDAseq: PAired-eND Assembler for Illumina sequences. BMC Bioinformatics. 2012; 13:31.

[316] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. Appl Environ Microbiol 68(11): 5445-51.

[317] Metcalf AM, Phillips SF, Zinsmeister AR, MacCarty RL, Beart RW, Wolff BG. Simplified assessment of segmental colonic transit. Gastroenterology. 1987; 92: 40-7.

[318] Millet S, Van Oeckel MJ, Aluwe M, Delezie E, De Brabander DL. Prediction of in vivo short-chain fatty acid production in hindgut fermenting mammals: problems and pitfalls. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2010; 50:605-19.

[319] Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran LG, Chatel JM, Sokol H, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. Current Opinion in Microbiology. 2013; 16: 255-61.

- [320] Monro JA, Mishra S, Venn B. 2010. Baselines representing blood glucose clearance improve *in vitro* prediction of the glycaemic impact of customarily consumed food quantities. *British Journal of Nutrition*, 103(2): 295-305.
- [321] Murata Y, Ohmori H, Ichikawa M, Harada A, Agari M, Fukuba H, Yamasaki M, Yasuzawa M, Takemoto M, Ikeda M, Matsumoto N, Tamura T, Sumimoto R, Namba K 2013. Fecal microbiota and fecal characteristics of patients with Parkinson's disease. *Journal of Intestinal Microbiology* 27(4): 211-215.
- [322] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology-Sgm* 148: 257-266.
- [323] Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility* 23(3): 255-64, e119.
- [324] NJ Nieuwenhuizen, R Maddumage, GK Tsang, LG Fraser, JM Cooney, HN De Silva, S Green, KA Richardson, RG Atkinson. 2012. Mapping, complementation, and targets of the cysteine protease actinidin in kiwifruit. *Plant Physiology* 158(1): 376-388.
- [325] Parkar SG, Rosendale D, Paturi G, Herath TD, Stoklosinski H, Phipps JE, et al. *In vitro* utilization of gold and green kiwifruit oligosaccharides by human gut microbial populations. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012; 67: 200-7.
- [326] Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *The British Journal of Nutrition*. 2012; 107: 601-13.
- [327] Paturi G, Butts CA, Bentley-Hewitt KL, Ansell J 2014. Influence of green and gold kiwifruit on indices of large bowel function in healthy rats. *J Food Sci* 79(8):

H1611-20.

- [328] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 217: 133-9.
- [329] Qin JJ, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464: 59-U70.
- [330] R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. .
- [331] RStudio. RStudio: Integrated development environment for R (Version 0.97.551) Computer software. Boston, MA. <http://www.rstudio.org/>. 2012.
- [332] Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011; 141: 1792-801.
- [333] Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014; 38: 996-1047.
- [334] Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition* 101(4): 541-550.
- [335] Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*. 2006; 127: 423-33.

- [336] Reid G 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 65(9): 3763-6.
- [337] Rhee SH, Pothoulakis C, and Mayer EA. 2009. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 6: 306-314.
- [338] Richardson AJ, Calder AG, Stewart CS, Smith A. 1989. Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 5-8.
- [339] Rigottier-Gois L. 2013. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME Journal* 7: 1256-1261.
- [340] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97(6): 1166-1177.
- [341] Rosendale DI, Maddox IS, Miles MC, Rodier M, Skinner M, Sutherland J. 2008. High-throughput microbial bioassays to screen potential New Zealand functional food ingredients intended to manage the growth of probiotic and pathogenic gut bacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12): 2257-2267.
- [342] Rumah KR, Linden J, Fischetti VA, Vartanian T 2013. Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS One* 8(10): e76359.
- [343] Rush EC, Patel M, Plank LD, Ferguson LR. 2002. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11(2): 164-168.

[344] Sanchez B, Champomier-Verges MC, Collado Mdel C, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, et al. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 6450-9.

[345] Sartor RB. Efficacy of probiotics for the management of inflammatory bowel disease. Gastroenterology & Hepatology. 2011; 7: 606-8.

[346] Saulnier DM, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. Curr. Opin. Biotechnol. 2009; 20: 135-41.

[347] Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R 2007. Lactobacillus reuteri (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. Pediatrics 119(1): e124-30.

[348] Schepers F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P 2014. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. Movement Disorders.

[349] Schloss PD, Schubert AM, Zackular JP, Iverson KD, Young VB, Petrosino JF. Stabilization of the murine gut microbiome following weaning. Gut Microbes. 2012; 3: 383-93.

[350] Seeram N. Associate Professor of Bioactive Botanical Research Laboratory, University of Rhode Island. Digestive Health Forum, NutraIngredients-USA, 25 September 2014.

[351] Singleton, Vernon L, Orthofer, Rudolf, Lamuela-Raventós, Rosa M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by

means of folin–ciocalteu reagent 299: 152.

[352] Skinner MA. 2012. Wellness foods based on the health benefits of fruit: gold kiwifruit for immune support and reducing symptoms of colds and influenza. *Journal of Food and Drug Analysis* 20(1): 261-264.

[353] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 16731-6.

[354] Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009; 15: 1183-9.

[355] Stonehouse W, Gammon CS, Beck KL, Conlon CA, Von Hurst PR, Kruger R. 2012. Kiwifruit: our daily prescription for health. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 91(6): 442-447.

[356] D Sun-Waterhouse, I Wen, R Wibisono, LD Melton, S Wadhwa. 2009. Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of green kiwifruit juicing. *International Journal of Food Science & Technology*. 44(12): 2644-2652.

[357] Taras D, Simmering R, Collins MD, Lawson PA, Blaut M. Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52: 423-8.

[358] Timm D, Willis H, Thomas W, Sanders L, Boileau T, Slavin J. The use of a wireless motility device (SmartPill(R)) for the measurement of gastrointestinal

transit time after a dietary fibre intervention. *The British Journal of Nutrition.* 2011; 105: 1337-42.

[359] Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides--a human volunteer study. *The British Journal of Nutrition.* 2001; 86: 341-8.

[360] Turnbaugh PJ, Baeckhed F, Fulton L, Gordon JI 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe* 3(4): 213-223.

[361] Udani J, Bloom D. 2013. Effects of kivia powder on Gut health in patients with occasional constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition Journal* 12(1): 78.

[362] Vaahtovuo J, Munukka E, Korkeamaki M, Luukkainen R, Toivanen P 2008. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 35(8): 1500-5.

[363] Vogt JA, Pencharz PB, Wolever TMS. L-Rhamnose increases serum propionate in humans. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2004; 80: 89-94.

[364] Walker AW, Duncan SH, McWilliam Leitch EC, Child MW, Flint HJ. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 3692-700.

[365] Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJ, Holtrop G, Welling GW, Flint HJ 2008. The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environ Microbiol* 10(12): 3275-83.

[366] Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al.

Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. ISME Journal. 2011; 5: 220-30.

[367] Wang L, Christensen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA 2011. Low relative abundances of the mucolytic bacterium Akkermansia muciniphila and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. Applied and Environmental Microbiology 77(18): 6718-21.

[368] Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. ISME Journal 6(2): 320-9.

[369] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 5261-7.

[370] Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI 2012. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. mBio 3(1).

[371] Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. Gastroenterology. 2010; 139: 1844-54 e1.

[372] Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. Journal of Clinical Gastroenterology. 2006; 40: 235-43.

[373] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science. 2011;

334: 105-8.

[374] Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J 2010. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Current Microbiology* 61(1): 69-78.

[375] Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME Journal*. 2012; 6: 1535-43.

[376] Zoppi G, Cinquetti M, Luciano A, Benini A, Miner A, and Bertazzoni ME. 1998. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. *Acta Paediatrica* 87: 836-841.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição preparada a partir de kiwi ouro seco, **caracterizado** pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para aumentar os níveis de *Faecalibacterium prausnitzii* no trato digestivo de um indivíduo, em que o kiwi ouro seco é um kiwi *Actinidia chinensis* Zesy002 ou um derivado genético do mesmo.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é formulado para administração entérica, oral ou retal.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é formulado como um ou mais dentre um comprimido, cápsula, líquido, geleia ou sachê.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato que o medicamento é formulado para administração a uma dosagem de:

(i) 2000 a 4000 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo;

(ii) 250 a 2500 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo;

(iii) aproximadamente 2400 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo; ou

(iv) aproximadamente 600 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato que o medicamento é formulado para coadministração com um ou mais dentre:

(i) um auxiliar digestivo adicional;

(ii) uma ou mais composições probióticas, prebióticas ou simbióticas; ou

(iii) fibra e/ou uma enzima digestiva.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado**

pelo fato de que o medicamento é adicionalmente suplementado com polifenóis.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem um ou mais sintomas de constipação, irregularidade intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória do intestino ou câncer gastrointestinal.

8. Uso de uma composição preparada a partir de kiwi ouro seco, **caracterizado** pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para melhorar a diminuição dos níveis de *Faecalibacterium prausnitzii* no trato digestivo de um indivíduo, em que o kiwi ouro seco é um kiwi *Actinidia chinensis* Zesy002 ou um derivado genético do mesmo.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é formulado para administração entérica, oral ou retal.

10. Uso de acordo com a reivindicação 8 ou 9, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é formulado como um ou mais dentre um comprimido, cápsula, líquido, geleia ou sachê.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado** pelo fato que o medicamento é formulado para administração a uma dosagem de:

(i) 2000 a 4000 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo;

(ii) 250 a 2500 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo;

(iii) aproximadamente 2400 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo; ou

(iv) aproximadamente 600 mg de pó por dia ou um equivalente líquido do mesmo.

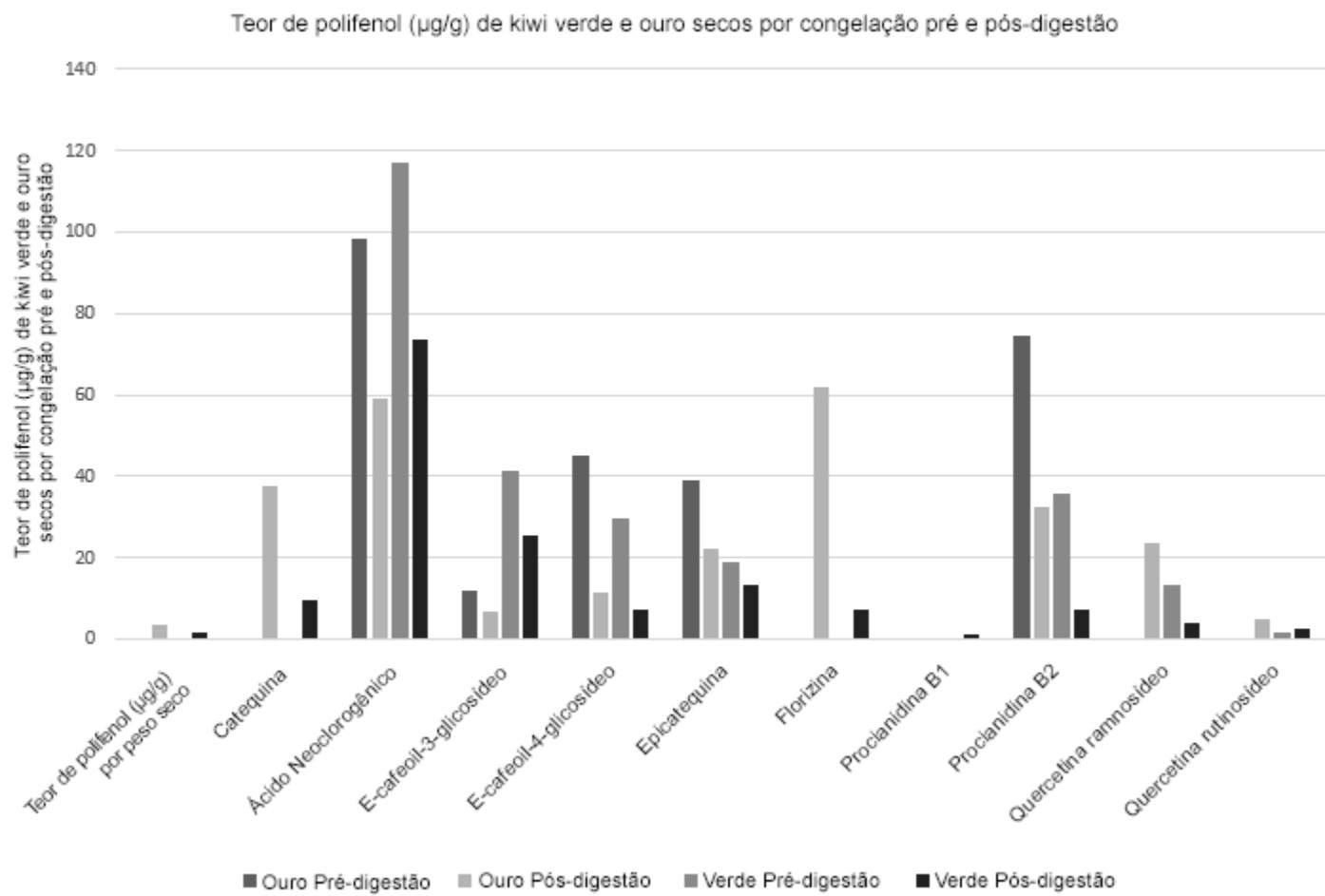
12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, **caracterizado** pelo fato que o medicamento é formulado para coadministração

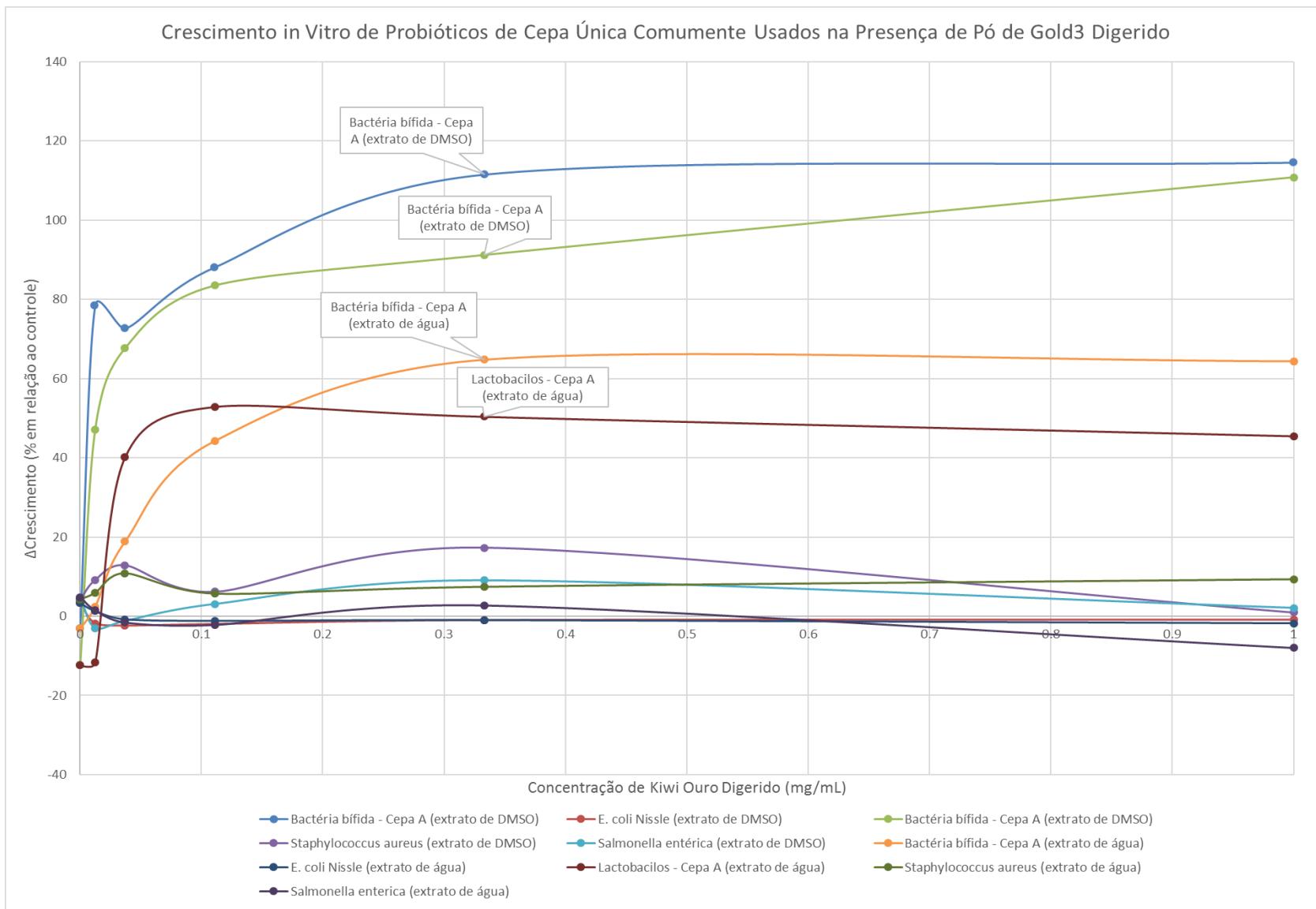
com um ou mais dentre:

- (i) um auxiliar digestivo adicional;
- (ii) composições probióticas, prebióticas ou simbióticas; ou
- (iii) fibra e/ou uma enzima digestiva.

13. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é adicionalmente suplementado com polifenóis.

14. Uso de acordo com a reivindicação 3 ou 10, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é formulado como uma cápsula de gel.

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

Δ Médio de Acetato, Butirato e Propionato versus Controle

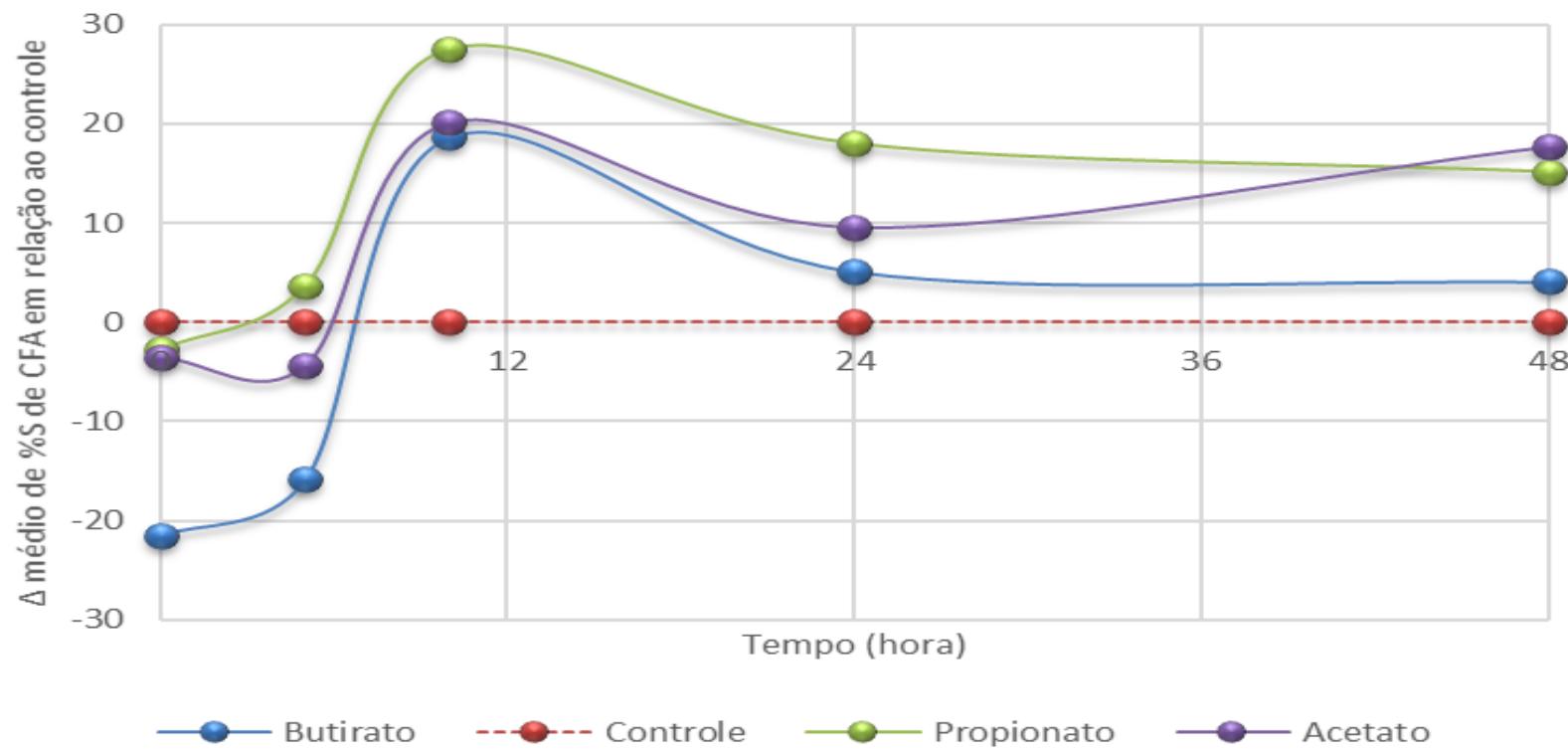


FIGURA 3

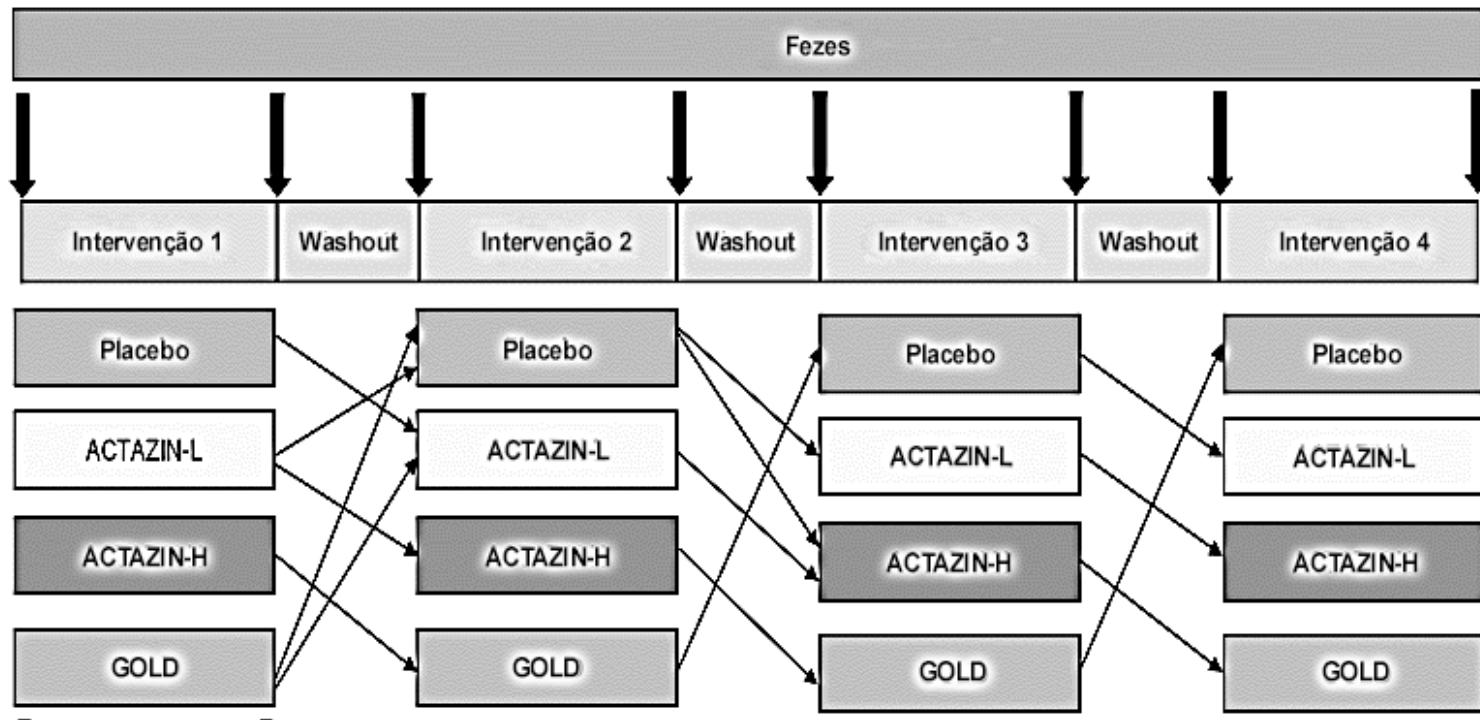


FIGURA 4

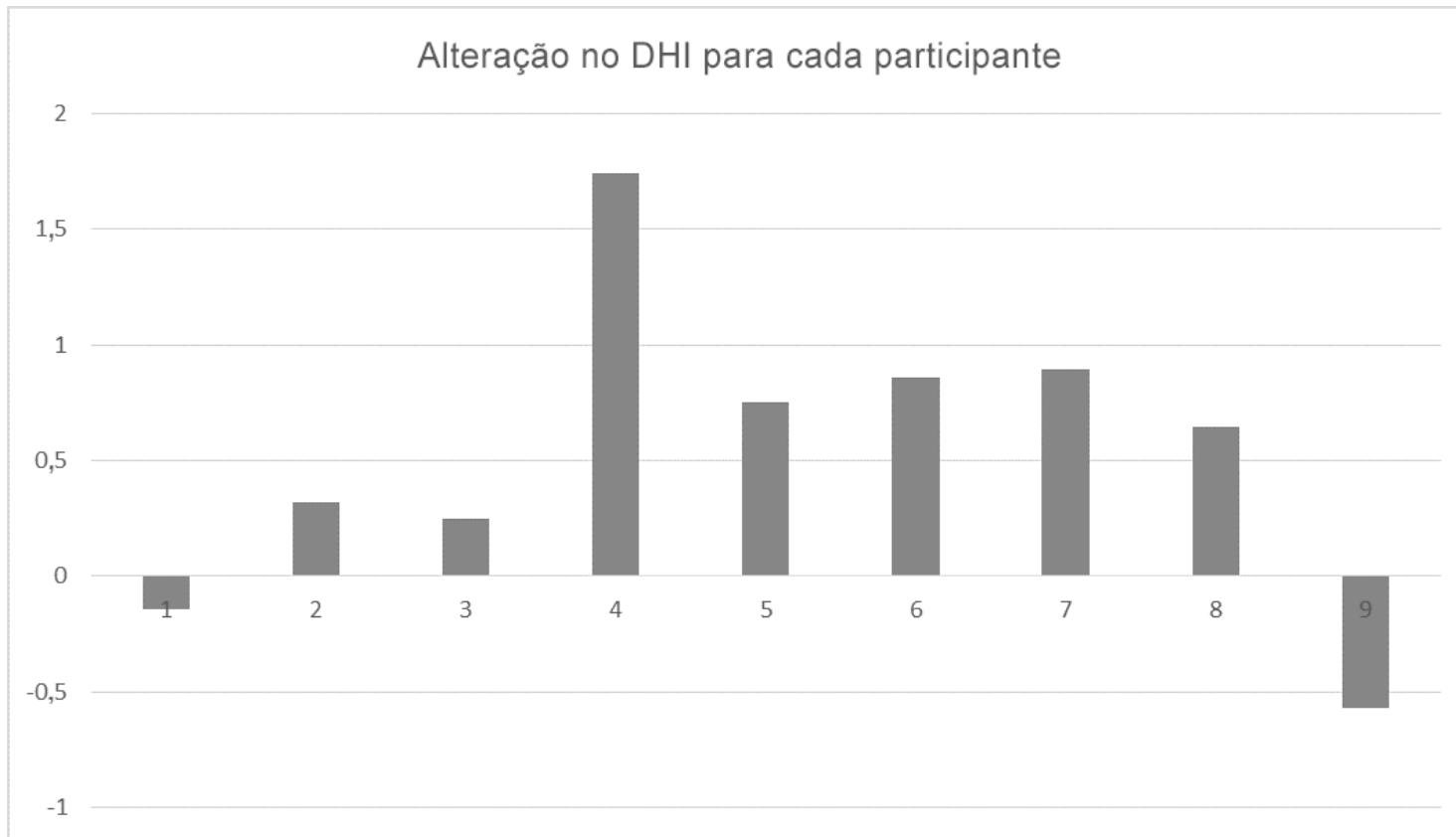


FIGURA 5

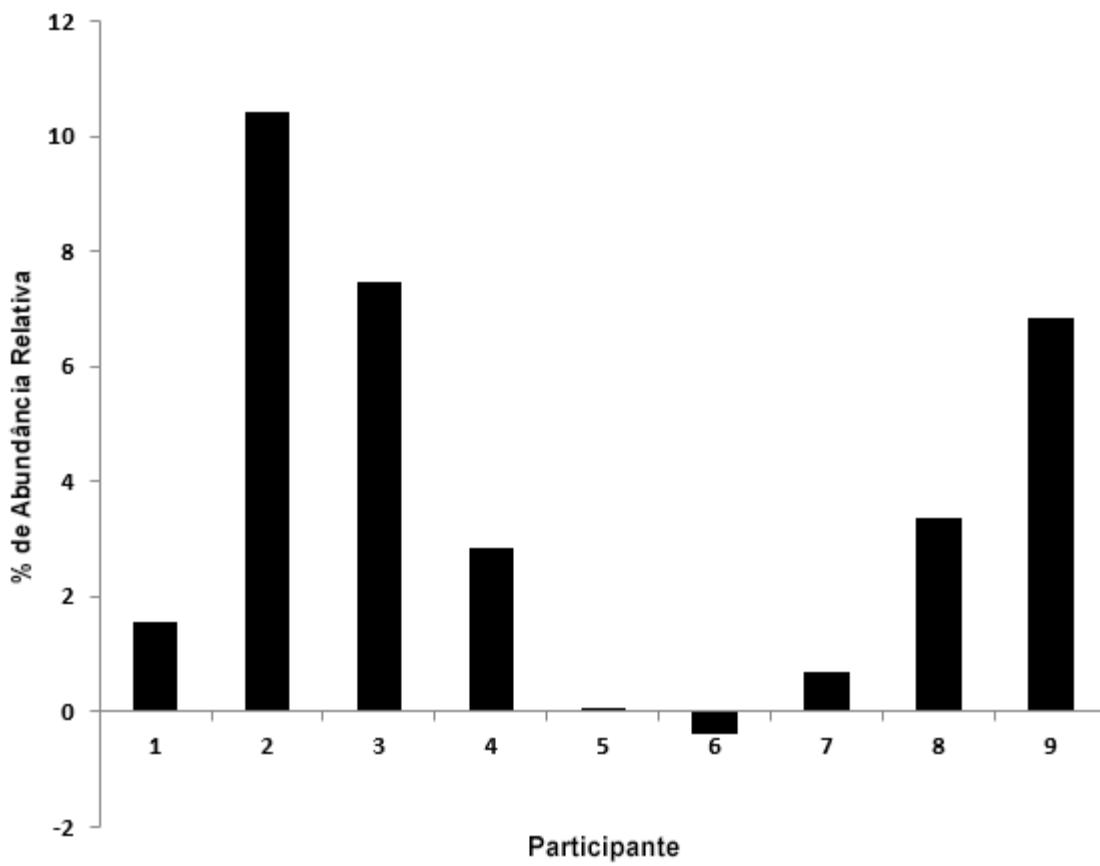


FIGURA 5B

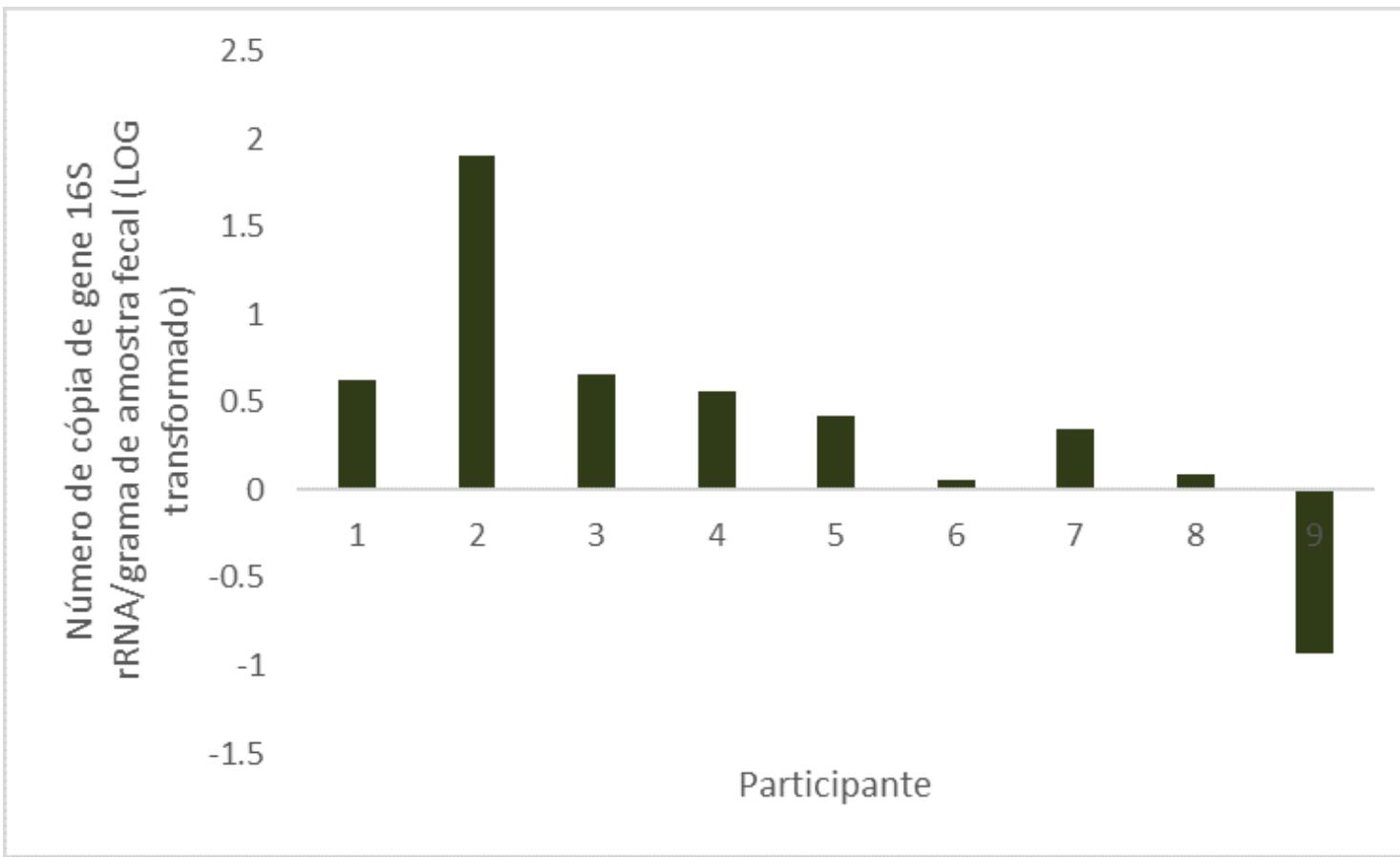
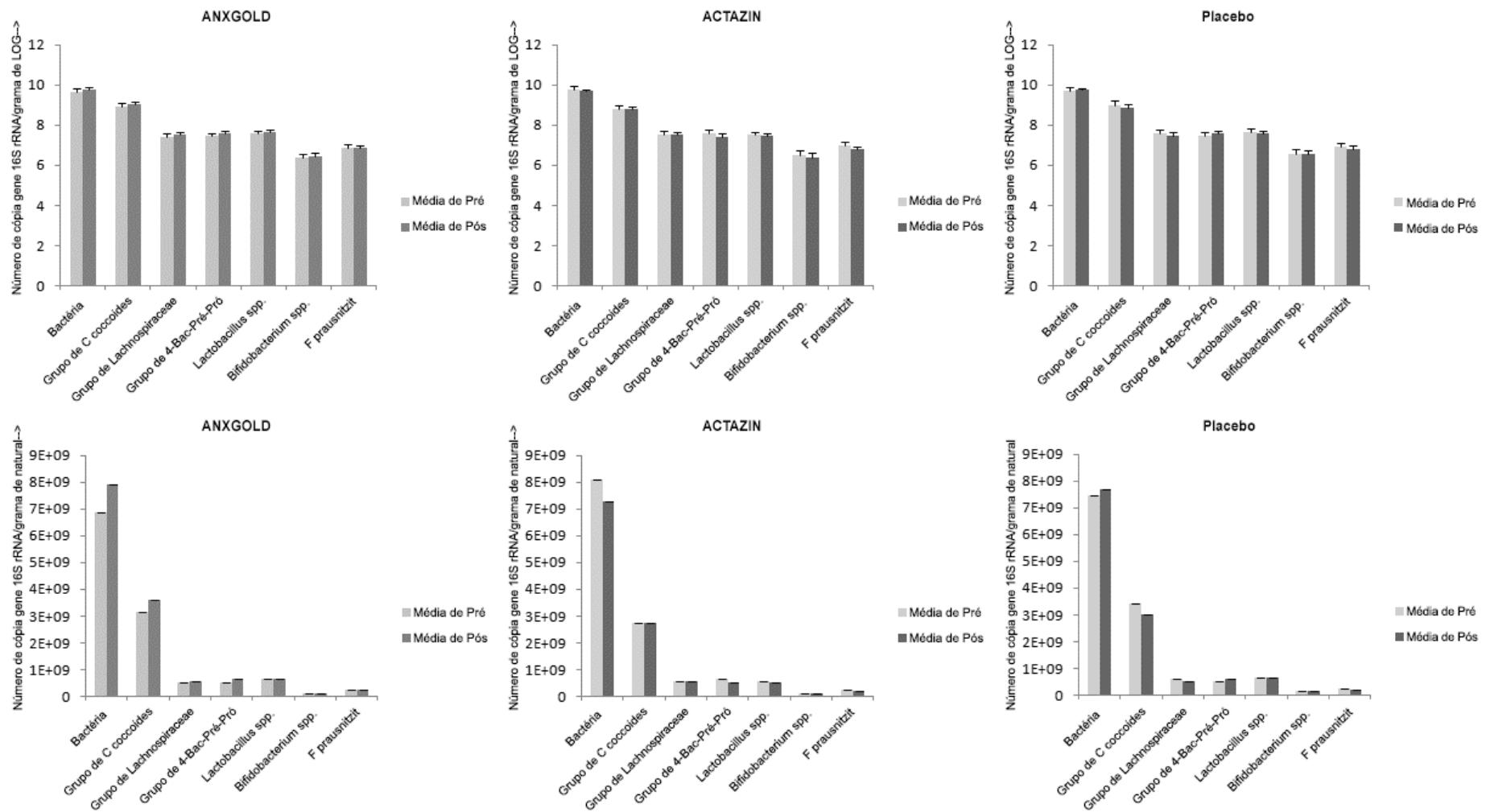


FIGURA 5C

**FIGURA 6**

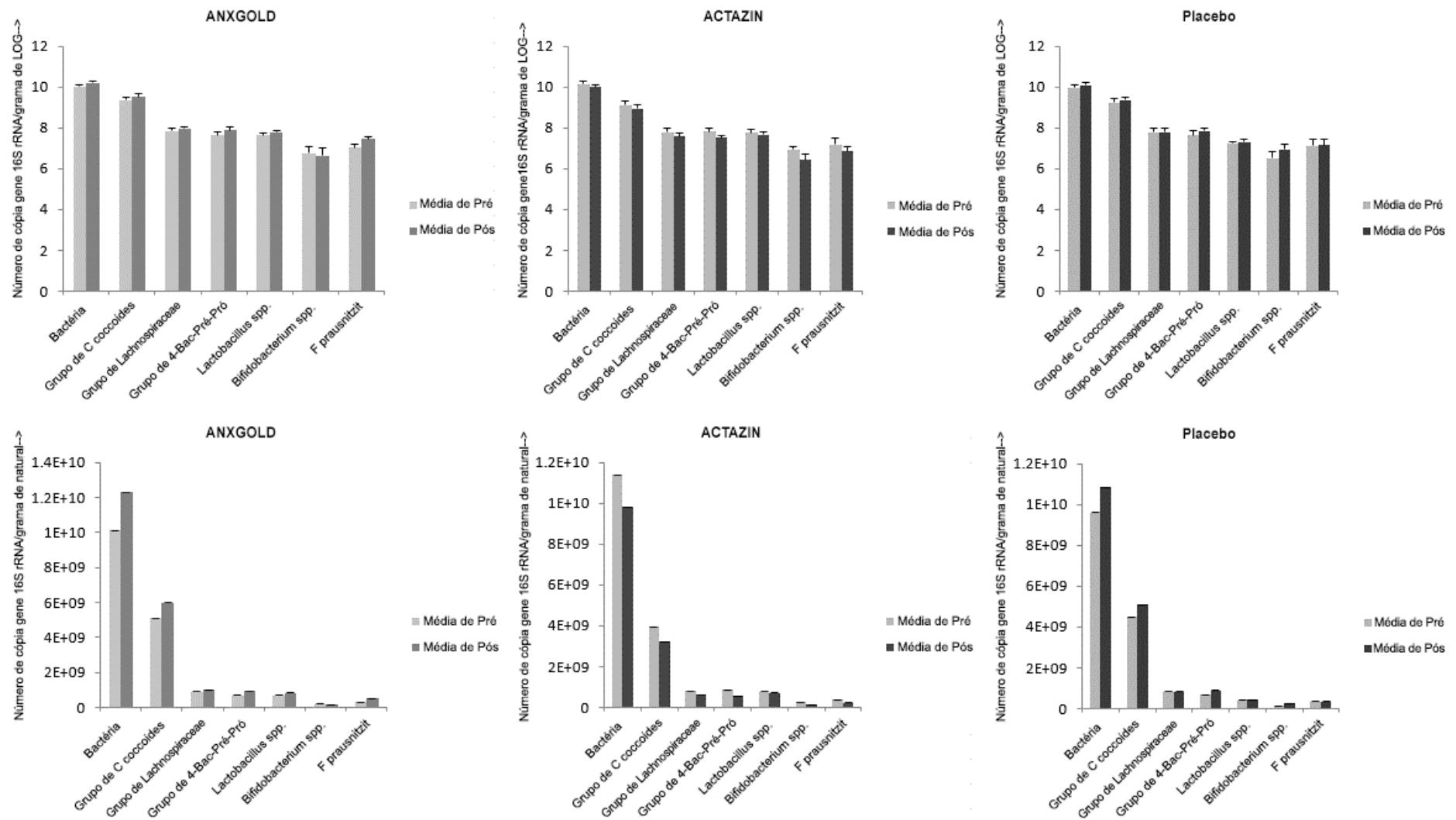


FIGURA 7