

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FUNCIONAL À BASE DE FRUTA
TROPICAL ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME: POTENCIAL
EFEITO BENÉFICO NA SÍNDROME METABÓLICA**

RECIFE

2018

ANDREI FELIPE LOUREIRO DO MONTE GUEDES

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FUNCIONAL À BASE DE FRUTA
TROPICAL ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME: POTENCIAL
EFEITO BENÉFICO NA SÍNDROME METABÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), ponto focal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia em saúde.

Orientador: Prof Dr Manoel Adrião Gomes Filho

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

G924d Guedes, Andrei Felipe Loureiro do Monte.
Desenvolvimento de bebida funcional à base de fruta tropical enriquecida com farinha de inhame: potencial efeito benéfico na síndrome metabólica / Andrei Felipe Loureiro do Monte Guedes. – Recife, 2018.
84 f.: il.

Orientador(a): Manoel Adrião Gomes Filho.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2018. Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Inclui referências e anexo(s).

1. Síndrome metabólica 2. L. paracasei 3. Simbióticos
I. Gomes Filho, Manoel Adrião, orient. II. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:
ANDREI FELIPE LOUREIRO DO MONTE GUEDES

Desenvolvimento de bebida funcional à base de fruta tropical enriquecida com farinha de inhame: potencial efeito benéfico na síndrome metabólica.

BANCA EXAMINADORA:

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 28 de setembro de 2018.

Orientador:

Profa. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho (UFRPE)

Examinadores:

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto (UFRPE)

Profa. Dra. Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha (UPE-ICB)

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (UNICAP)

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara (UFRPE)

Suplentes:

Prof. Dr. Bruno de Melo Carvalho (UPE/ICB)

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força que me foi dada e pelas recompensas da vida.

Ao mestre Jesus Cristo, companheiro de todos os momentos de dificuldade, pela proteção realizada durante os períodos de longas viagens para realização dos experimentos.

Aos meus pais, Mércia e Flávio, por todo amor e apoio constante, principalmente nos momentos que precisamos dos cuidados com meus filhos. Só tenho a agradecer por tê-los em minha vida.

A minha amada esposa Cinthia, pelo apoio, companheirismo, carinho, amor e muito trabalho, obrigado por pensar e executar junto comigo este doutorado, sem você nada disto teria acontecido.

Aos amores de minha vida, Vinícius, Maria Luiza e Letícia, por serem a força que me impulsionava todos os dias a acreditar que poderia chegar ao final com êxito, obrigado por fazerem parte de minha vida.

A minha querida tia Sebastiana, por todo o tempo de dedicação que dispôs a me ajudar com meus filhos, obrigado ti-vó, sem sua dedicação jamais conseguiria este sonhado objetivo de vida profissional.

Ao meu irmão Rodrigo que de maneira espetacular me ajudou com a manipulação semanal requerida na experimentação com os animais, pela camaradagem e dedicação, obrigado!

Aos meus familiares e amigos pelos conselhos nos momentos em que mais precisei.

Ao meu orientador, Professor Manoel Adrião, obrigado por acreditar e me acolher como seu aluno, por oportunizar a realização de meu doutorado, pela dedicação e atenção prestados em todos os momentos.

Ao professor Bruno Carvalho, obrigado por abrir as portas do laboratório para a realização da experimentação com os animais, pela sua dedicação e orientação, muito obrigado.

As amigas do laboratório da UPE, Amanda Mota e Ana Maria, obrigado pela força e ajuda na realização do experimento com os animais, no cuidado e na execução de diversos procedimentos metodológicos, sem vocês não teria conseguido.

Ao professor José do Egito, por apresentar-me ao prof. Manoel Adrião e assim conseguir dar continuidade ao projeto de doutorado.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pelo suporte no desenvolvimento deste estudo.

Aos membros da banca que se dispuseram a participar das mais diversas etapas da elaboração deste trabalho.

Agradeço imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Síndrome Metabólica (SM) é um estado pré-diabético associado a um aumento significativo de risco cardiovascular. A síndrome é caracterizada por uma série de fatores de risco, relacionados a resistência à insulina e à deposição de gordura abdominal. A crescente busca pela implementação de alimentos funcionais na alimentação humana, em particular os probióticos, justifica-se pela gama de benefícios trazidos ao consumidor. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma bebida vegetal simbiótica e estudar seu efeito benéfico na SM. Para realização dos experimentos foi elaborada e caracterizada a farinha de inhame quanto suas propriedades físico-químicas, microbiológicas e sua estabilidade ao armazenamento. A bebida simbiótica foi desenvolvida com polpa de maracujá, enriquecida com a farinha de inhame e fermentada com *Lactobacillus paracasei*, avaliando-se composição centesimal e microbiológica. Foi determinada a resistência do micro-organismo a fluidos simulados do trato gastrointestinal e análise sensorial foi realizada através do teste de aceitabilidade e intenção de compra, bem como a sua vida de prateleira. O efeito benéfico foi avaliado em camundongos com síndrome metabólica, induzidos por dieta hiperlipídica por sete semanas. A bebida apresentou os seguintes parâmetros físico-químicos e microbiológicos: A análise microbiológica foi realizada para Coliformes a 45°C/NMP/g e Salmonella sp, nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias pós fermentação, afim de verificar a estabilidade biológica da bebida. No que diz respeito a composição centesimal os resultados apresentaram-se da seguinte forma em g/100g: umidade – 91,83; cinzas – 0,16; proteína – 0,33; lipídeo – 0,26, carboidrato – 7,21; fibra alimentar total – 2,45 e valor calórico total – 32,5. Os resultados para as análises microbiológicas foram de ausência para Coliformes a 45°C e para Salmonella sp em todos os tempos avaliados. No teste sensorial apresentou os seguintes resultados para o Índice de Aceitabilidade (IA%): aparência – 70; qualidade global - 71,83; cor - 75,21; sabor – 73,57 e odor – 72,39. Para o teste de sobrevivência a fluidos simulados do trato gastrointestinal, a bactéria mostrou-se adaptado à bebida e condições extremas que foram submetidas durante as simulações. Quanto aos resultados no modelo animal de obesidade induzida por dieta, a bebida simbiótica aumentou a sensibilidade a insulina e o HDL-c e reduziu níveis séricos de LDL. Desta forma, a bebida simbiótica mostrou boa alternativa para viabilização do *L. paracasei* em bebidas vegetais, bem como um efeito benéfico na SM.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. *L. paracasei*. Simbióticos.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (SM) is a diabetic state associated with a significant increase in cardiovascular risk. The syndrome is characterized by a number of risk factors related to insulin resistance and the deposition of abdominal fat. The increasing search for the implementation of functional foods in human food, in particular probiotics, is justified by the range of benefits brought to the consumer. The purpose of this study was to develop a symbiotic vegetable drink and study its beneficial effect on SM. For the experiments, the yam flour was elaborated and characterized by how much its physico-chemical, microbiological and its Storage stability. The symbiotic beverage was developed with passion fruit pulp, enriched with yam flour and fermented with *Lactobacillus paramarryi*, evaluating centesimal and microbiological composition. It was determined the resistance of the microorganism to simulated fluids of the gastrointestinal accident and sensory analysis was performed through the test of acceptability and intent to purchase, as good as its shelf life. The beneficial effect was evaluated in obese mice induced by diet diet for seven weeks. The beverage presented the following physico-chemical and microbiological parameters: Microbial analysis was performed for coliforms at 45 °c/NMP/G and *Salmonella* sp, in times 0, 7, 14 and 21 days after fermentation, in order to verify the biological stability of the beverage . As regards a composition centesimal the results were presented as follows in G/100g: Humidity – 91, 83; Ashes-0, 16; Protein-0, 33; Lipid-0, 26, carbohydrate – 7, 21; Total Food Fiber – 2, 45 and total caloric value – 32, 5. The results for as microbiological analyses out of absence for coliforms at 45 °c and for *Salmonella* sp at all times evaluated. No sensory test presented the following results for the acceptability index (ia%): appearance – 70; Overall quality-71, 83; Cor-75, 21; Flavour – 73, 57 and Odor – 72, 39. For the simulated fluid survival test of the gastrointestinal accident, a bacterium was adapted to the beverage and extreme conditions that were submitted during simulations. As for the results in the animal model of diet-induced obesity, a symbiotic beverage increased the sensitivity to insulin and HDL-C and reduced serum levels of LDL. In this way, a symbiotic drink showed a good alternative to making it possible for L. To marry into vegetable beverages as well as a beneficial effect on SM.

Keywords: Metabolic syndrome. *L. paracasei*. Symbiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática associando hipoadiponectinemia com resistência à insulina e desfechos clínicos adversos.....	19
Figura 2: Diagrama ilustrando mecanismos de ação potenciais ou conhecidos dos probióticos.....	26
Figura 3: Fluxograma de obtenção da bebida vegetal simbiótica.....	34
Figura 4: Variação do pH e contagem de <i>L. paracasei</i> (LogCFU.mL ⁻¹) durante o período de armazenamento.....	41
Figura 5: Resistência do <i>L. paracasei</i> a fluidos simulados do trato gastrointestinal <i>in vitro</i> ..	44
Figura 6: Evolução de peso dos animais.....	45
Figura 7: Glicemia em jejum dos animais por 12hs.....	46
Figura 8: Valores de glicemia mensurados nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 após início do teste, e da área sob a curva (ASC) obtidos no teste de tolerância a glicose (GTT).....	47
Figura 9: Índice de decaimento da glicose (KITT) dos grupos obesos e controles. A glicemia foi mensurada no tempo 0 (basal) e nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após injeção intraperitoneal de insulina regular.....	47
Figura 10: Perfil lipídico dos grupos controle e obesos pós-tratamento.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definições de síndrome metabólica com o uso mais frequente.....	17
Tabela 2: Análises microbiológicas realizadas na farinha de inhame.....	33
Tabela 3: Composição centesimal do inhame <i>in natura</i> convertido em farinha.....	39
Figura 4: Caracterização microbiológica da farinha de inhame armazenada por 180 dias.....	40
Figura 5: Umidade e atividade de água da farinha armazenada por 180 dias.....	41
Figura 6: Composição centesimal da bebida simbiótica no 28º dia de armazenamento.....	42
Figura 7: Índice de aceitabilidade e intenção de compra da bebida simbiótica.....	43

SUMÁRIO

	Pág
1 Introdução	11
2 Revisão da Literatura	14
2.1. Síndrome metabólica.....	14
2.2. Probióticos, prebióticos e simbióticos.....	21
2.3. Produtos simbióticos de origem vegetal.....	28
3 Objetivos.....	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4 Métodos.....	31
4.1. Obtenção da farinha de inhame.....	31
4.2. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de inhame.....	31
4.3. Estabilidade ao armazenamento.....	32
4.4. Formulação da bebida de maracujá.....	32
4.5. Ativação, viabilização e adição da cepa a bebida.....	33
4.6. Avaliação da vida de prateleira da bebida.....	33
4.7. Teste de aceitabilidade e intenção de compra da bebida.....	34
4.8. Análise da sobrevivência do <i>L. paracasei</i> a fluidos simulados do trato gastrointestinal.....	34

4.8.1.	Fase gástrica.....	34
4.8.2.	Fase entérica 1.....	35
4.8.3.	Fase entérica 2.....	35
4.9.	Determinação da composição centesimal da bebida simbiótica.....	35
4.10.	Análise estatística.....	35
4.11.	Caracterização dos animais.....	35
4.12.	Teste de tolerância a insulina (ITT).....	36
4.13.	Teste de tolerância a glicose (GTT).....	36
4.14.	Dosagem do perfil lipídico.....	37
5	Resultados.....	38
6	Considerações Finais.....	51
7	Referencias.....	52
	Anexo.....	67

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome Metabólica (SM) é um estado pré-diabético associado a um aumento significativo de risco cardiovascular e um prognóstico ruim na doença cardíaca estabelecida. Pelo menos três de cinco fatores de risco devem estar presentes para o diagnóstico da SM: obesidade abdominal, pressão arterial elevada, triglicérides elevados, colesterol HDL reduzido e glicose plasmática elevada em jejum (GOLDENBERG & PUNTHAKEE, 2013). Diversos autores têm sugerido que a presença de obesidade é um importante fator para o surgimento da SM (CASTRO et al., 2014).

O aumento da prevalência de SM tornou-se um problema de saúde pública. A síndrome é caracterizada por uma série de fatores de risco, relacionados a resistência à insulina e à deposição de gordura abdominal. Estes fatores de risco estão interligados por características bioquímicas, fisiológicas, clínicas e metabólicas e aumentam diretamente o risco de desenvolver Diabetes Mellitus 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV). A incidência da síndrome pode variar em diferentes populações dependendo da etnia, idade, sexo e região (urbana ou rural) e de acordo com os critérios de diagnósticos empregados (BHATT et al., 2015).

Segundo a International Diabetes Federation - IDF (2017), 425 milhões de pessoas possuem DM2, dos quais 76% possuem de 20-64 anos, com um acréscimo de 48% até 2045, valores preocupantes visto que a SM é um estado pré-diabético. Estima-se que atualmente o Brasil possui 14,6 milhões de pessoas com intolerância a glicose, com um aumento de 20% até 2045, pessoas com SM apresentam intolerância à glicose, determinado por quantidades elevadas de glicose sanguínea, mas não sendo suficiente para o diagnóstico de DM2, desta forma considera-se também um estado pré-diabético.

Populações em todo o mundo estão cada vez mais sedentárias e consomem quantidades crescentes de gorduras e açúcares, o que geralmente está ligado a alimentos processados industrialmente. A consequência disso foi uma transição rápida, manifesta como uma redução na desnutrição e no baixo peso e um aumento no excesso de peso/obesidade (BRASIL, 2014), contribuindo para o desenvolvimento da SM, que é uma anormalidade metabólica associada ao sobrepeso e obesidade (RIGBY, 2013).

A melhor estratégia contra a SM são dietas que consigam reduzir o peso corporal, diminuir a ingestão de gorduras saturadas e que sejam ricas em substâncias bioativas como: ácidos graxos insaturados, vitaminas e flavonóides (STECKHAN et al., 2016).

A crescente busca pela implementação de alimentos funcionais na alimentação humana, em particular os probióticos, justifica-se pela gama de benefícios trazidos ao consumidor, dentre os quais podemos citar a prevenção da disbiose (ZOPPI et al., 2001), a diminuição dos quadros de constipação e diarreia (VANDENPLAS & BENNINGA 2009; KRAMMER et al., 2011), além dos benefícios imunológicos (CALDER & KEW, 2002) e mais recentemente hipotetizado na prevenção da obesidade (SCARPELLINI et al., 2010; LECERF, 2011), um atual problema de saúde pública.

Apesar dos benefícios da inserção de alimentos probióticos na alimentação, sua aplicação prática não tem se concretizado de forma homogênea, uma vez que indivíduos com intolerância ou alergia ao leite, com restrições no consumo de colesterol ou mesmo vegetarianos acabam por não fazer uso desses alimentos, haja vista ser o leite o principal veículo desses micro-organismos benéficos (SCHMIDT & PEREIRA, 2011) e a adição de culturas probióticas em produtos não-lácteos ser ainda um grande desafio (PRADO et al., 2008). A formulação de bebidas de origem vegetal tem se mostrado uma alternativa viável para transpor tais dificuldades (YOON et al., 2006, RENUKA et al., 2008).

O desenvolvimento de *off-flavour* devido à fermentação é mais evidente em bebidas à base vegetal que nas produzidas com leite e seus derivados (LUCKNOW; DELAHUNTY, 2004). A escolha de um vegetal tecnologicamente capaz de mascarar tal efeito é um grande desafio. Segundo Lucknow e colaboradores (2006) uma das maneiras mais eficientes de mascarar o *off-flavour* é o uso de sucos de frutas tropicais com sabor marcante, caso do maracujá.

A fermentação de bebidas simbióticas à base de frutas traz ainda o desafio de manutenção da viabilidade e funcionalidade durante o tempo de estocagem (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Desta forma o uso de cepas probióticas deve ter um respaldo científico, higiênico e tecnológico (FARNWORTH, 2008), caso do gênero *Lactobacillus* que é considerado GRAS (*generally recognized as safe*) e em especial o *L. paracasei* que tem sido amplamente estudado para emprego em alimentos industrializados e vem se mostrando viável na produção de bebidas vegetais (SHEEHAN et al., 2007).

O inhame (*Dioscorea cayennensis Lam.*) é um alimento regional muito popular no Nordeste Brasileiro, sendo consumido por grande parte da população apresentando, portanto, boa aceitabilidade além de baixo custo e excelentes características nutricionais como alto valor energético e nutritivo (LEONEL et al., 2006). A análise de sua composição centesimal revela um considerável teor de fibras alimentares, o que sugere a perspectiva da presença de prebióticos em sua composição (TACO, 2011). Apesar do destaque ora apresentado existem poucos estudos a respeito das suas propriedades funcionais e tecnológicas.

Apesar de ainda pouco estudada, a farinha do inhame tem se revelado viável para o desenvolvimento de produtos para fins especiais como a doença celíaca, uma vez que não possui glúten (ATZINGEN et al., 2001), para o aumento do teor de fibras de preparações (MOORTHY, 2002) e ainda para conferir propriedades funcionais aos produtos (LIMA, 2002).

Portanto a combinação de alimentos regionais de viabilidade tecnológica e utilização de micro-organismos com segurança alimentar e reconhecidas características funcionais deve ser capaz de produzir uma bebida funcional viável para aplicação em grupos especiais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome metabólica

A SM foi originalmente denominada Síndrome Metabólica X e existe um grande número de critérios para o seu diagnóstico, incluindo o Grupo Europeu EGIR para o Estudo da Resistência à Insulina (1999), o AACE - Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos (2003) e o IDF (2006), mas a Primeira Diretriz Brasileira sobre a Síndrome Metabólica (IDBSM, 2005) escolheu os critérios do National Cholesterol Education Programme - Adult Treatment Panel III (2001). Estes critérios para o diagnóstico incluem os distúrbios da glicemia relacionados à resistência à insulina (RI); Índice de Massa Corporal elevado; triacilgliceróis elevados e HDL baixo (lipoproteína de alta densidade); e hipertensão arterial (GANHOU et al., 2015).

Foi descrita pela primeira vez em 1923 por Kylin et al. como uma associação de gota com hipertensão e hiperglicemia. Em 1947, Vague demonstrou a ligação entre a obesidade abdominal e desarranjos metabólicos no DM2 e doenças cardiovasculares (DCV). A importância da resistência à insulina (RI) no DM2 foi estabelecida por Reaven em 1988, enquanto ele nomeou o grupo de fatores de risco para DCV e síndrome do DM X. Alguns anos mais tarde, em 1992, a obesidade central foi adicionada como um componente central na definição e na entidade e foi renomeada como síndrome de resistência à insulina (IRS) (KAUR, 2014).

A SM tornou-se uma questão de saúde global de grande preocupação. Segundo os critérios da IDF, a prevalência nos Estados Unidos é de 33 a 39%, com um número significativo de mulheres, enquanto a Europa é marcada por considerável diversidade, a prevalência varia de 18 a 30% (AGUILAR et al. 2105; O'NEILL & O'DRISCOL, 2015), como também difere em gênero e idade, já que abaixo dos 50 anos é ligeiramente maior nos homens, revertendo-se após essa idade para mostrar uma preponderância feminina (PUCCI et al. 2017).

De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES) 2003-2006, a carga dessa condição é maior em homens que em mulheres antes dos 60 anos, com uma frequência de 41 e 34%, respectivamente; no entanto, a diferença de sexo diminui com o avanço da idade devido ao fato de que a proteção cardiometabólica diminui nas mulheres após

a menopausa, enquanto o papel dos hormônios sexuais nas mulheres diminui em relação à distribuição da gordura corporal (KUK & ARDEN, 2010).

A SM é o termo comumente utilizado para um conjunto de fatores clínicos e metabólicos que aumentam o risco de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular cerebral. Os fatores de risco inter-relacionados incluem obesidade central, dislipidemias, hipertensão e resistência à insulina (WEISS et al. 2013).

Em pessoas com SM, o risco de desenvolver DM2 é cinco vezes maior e o risco de acidente vascular cerebral (AVC) e infarto do miocárdio (IM) é três vezes maior do que em indivíduos normais/saudáveis (ALBERTI et al. 2005). Durante a última década, a SM também foi associada a outras condições clínicas, como esteatose hepática e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), hipogonadismo, síndrome dos ovários policísticos (SOP), apneia obstrutiva do sono, demência vascular, doença de Alzheimer e carcinomas, especialmente câncer de pâncreas e colorretal (GRUNDY, 2008; UZUNLULU et al. 2016).

Há consenso na literatura recente de que existem pelo menos cinco critérios que definem a presença de SM: obesidade, RI (glicemia de jejum > 100 mg/ dL) triglicerídeos elevados (> 150 mg/ dl) e HDL baixo (<40 mg/dL no sexo masculino ou <50 mg/dL no sexo feminino), hipertensão arterial (PA > 130-85 mmHg) e pró-inflamatório e pró estado trombótico. As pessoas que têm três ou mais dos critérios listados acima são consideradas portadoras da síndrome (BONOMINI et al. 2015; COFFMAN & RICHMOND-BRYANT, 2015).

Assim, atualmente a presença a SM é definida pela presença de três dos cinco critérios referidos na Tabela 1.

Tabela 1. Definições de síndrome metabólica com o uso mais frequente por diferentes instituições.

Parâmetro clínico	OMS (1998)	INCEP ATP III (2001)	IDF (2005)	AHA/NHLBI (2005)	Definição harmonizada (2009)
Resistência à insulina	IOG, EGJ, DM2 ou diminuição da sensibilidade à insulina	Não	Não	Não	Não
	e ≥ 2 dos seguintes	Associação de ≥ 3 dos seguintes		Associação de ≥ 3 dos seguintes	Associação de ≥ 3 dos seguintes
Obesidade	H: cintura/anca $\geq 0,90$	H: PA ≥ 102 cm	H europeus: PA ≥ 94 cm	H: PA ≥ 102 cm	Definição específica para cada país e população
	M: cintura/anca $\geq 0,85$ e/ou IMC > 30 Kg/m ²	M: PA ≥ 88 cm	M europeias: PA ≥ 80 cm e ≥ 2 dos seguintes	M: PA ≥ 88 cm	
Dislipidemia aterogênica		TG ≥ 150 mg/dl	TG ≥ 150 mg/dl ou sob terapêutica	TG ≥ 150 mg/dl ou sob terapêutica	TG ≥ 150 mg/dl ou sob terapêutica
	H: TG ≥ 150 mg/dl e/ou C- HDL < 35 mg/dl	H: C- HDL < 40 mg/dl	H: C- HDL < 40 mg/dl ou sob terapêutica	H: C- HDL < 40 mg/dl ou sob terapêutica	H: C- HDL < 40 mg/dl ou sob terapêutica
	M: TG ≥ 150 mg/dl e/ou C- HDL < 39 mg/dl	M: C- HDL < 50 mg/dl	M: C- HDL < 50 mg/dl ou sob terapêutica	M: C- HDL < 50 mg/dl ou sob terapêutica	M: C- HDL < 50 mg/dl ou sob terapêutica
Elevação tensional	$\geq 140/90$ mmHg	$\geq 130/85$ mmHg	TAS ≥ 130 mmHg ou TAD ≥ 85 mmHg ou sob terapêutica	TAS ≥ 130 mmHg ou TAD ≥ 85 mmHg ou sob terapêutica	TAS ≥ 130 mmHg ou TAD ≥ 85 mmHg ou sob terapêutica
Alteração metabolismo glicídico	IOG, EGJ, DM2	> 110 Mg/dl (incluindo DM2)	> 100 mg/dl ou sob terapêutica	> 100 mg/dl ou sob terapêutica	> 100 mg/dl ou sob terapêutica

C-HDL: colesterol HDL; DM2: *diabetes mellitus* tipo 2; EGJ: elevação da glicemia jejum; H: homens; IMC: índice de massa corporal; IOG: intolerância oral à glicose; M: mulheres; PA: perímetro abdominal; TAS: tensão arterial sistólica; TAD: tensão arterial diastólica; TG: triglicerídeos. Fonte: TIMOTEO, 2018.

A patogênese da SM é complexa, sendo a interação de múltiplas vias de interação, variações genéticas e fatores ambientais, incluindo a ingestão de uma dieta altamente calórica e a falta de exercício (KAUR, 2014). A etiologia exata da síndrome metabólica ainda não foi

completamente elucidada, mas vários estudos relataram uma forte associação de SM com resistência à insulina, estresse oxidativo, inflamação, obesidade, disfunção endotelial e doenças cardiovasculares (WISSE, 2004; WEN et al., 2015). No entanto, apesar da importância da obesidade, às vezes os pacientes com peso normal podem ser resistentes à insulina e ter a síndrome (KATZMARYK et al., 2003).

O principal componente da SM é a resistência à insulina (IR), daí o nome alternativo de “síndrome da resistência à insulina”. A IR é a capacidade diminuída dos órgãos alvo, como o fígado, músculos esqueléticos e tecidos adiposos, de responder aos níveis normais de insulina (BUSE et al., 2003).

A insulina regula uma variedade de processos biológicos, agindo em seus receptores de superfície celular nos sítios sensíveis à insulina, enquanto a ligação do receptor de insulina inicia uma série de eventos que levam à fosforilação do receptor de insulina, seguido por proteínas de substrato receptor de insulina (IRS) e ativação de duas importantes vias de transdução pós-receptor, PI3K (fosfatidilinosítido 3 quinase) Akt (proteína quinase B) mTOR (alvo molecular para rapamicina) e Ras-MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) sinalizando a cascata (BOUCHER et al., 2014).

A Akt ativada é responsável pela translocação de transportadores de GLUT4, captação de glicose pelas células e inativação da enzima glicogênio sintase quinase, um potente inibidor da enzima glicogênio sintase, promovendo a síntese de glicogênio nas células (IJUIN; TAKENAWA, 2012).

Essa cascata de eventos leva a ação hepática deficiente de insulina, atividade transcricional alterada dos fatores nucleares, aumento na produção hepática de glicose e síntese de triacilgliceróis e citocinas pró-inflamatórias (NAIMI et al., 2007). A RI do tecido adiposo resulta em supressão prejudicada da lipólise na presença de altos níveis de insulina com aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL) no sangue, o que favorece a gliconeogênese hepática e a intolerância à glicose (GINSBERG et al., 2005; GASTALDELLI et al., 2017).

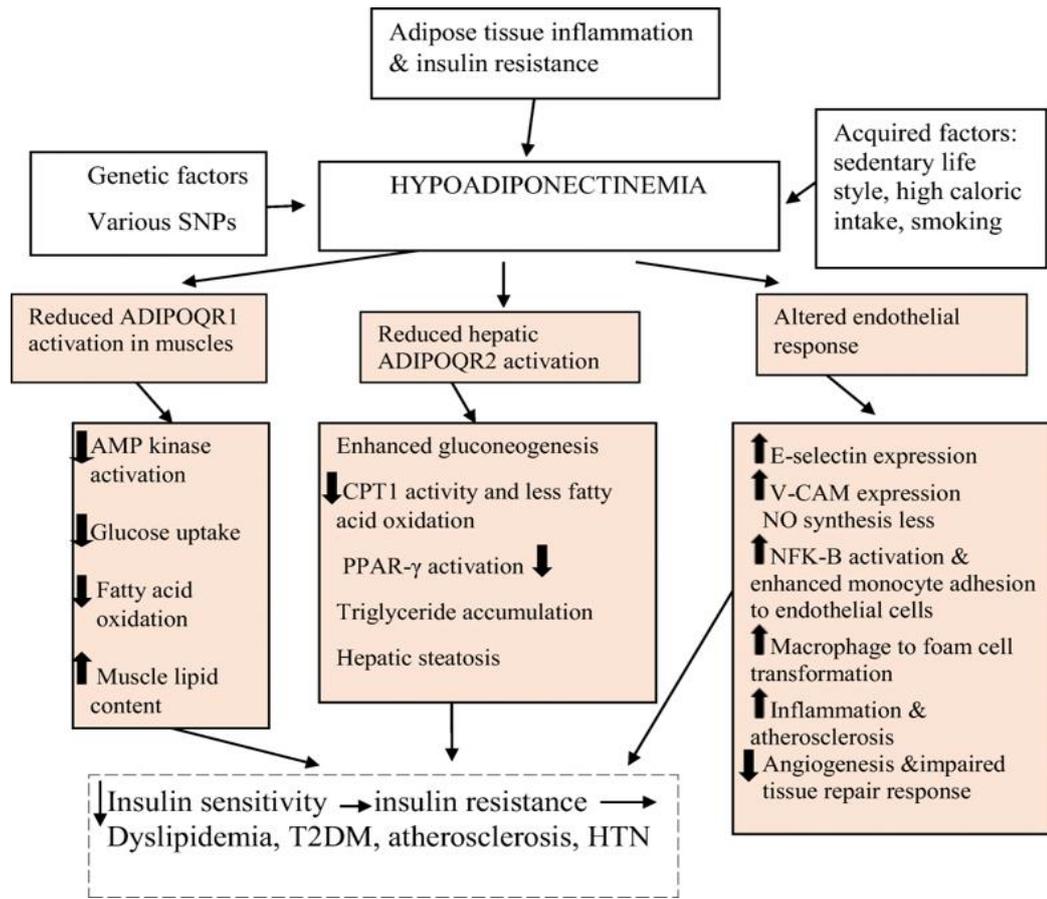
O tecido adiposo é um órgão envolvido diretamente na homeostase dos lipídios corporais e que é metabolicamente flexível, podendo passar de um estado de armazenamento de ácidos graxos para um estado de liberação destes, de acordo com as necessidades metabólicas. Com efeito, o tecido adiposo subcutâneo é considerado “saudável” e o tecido

adiposo visceral, pelo importante componente inflamatório associado, com produção de citocinas e adipocinas, condiciona todo um estado desregulado sistêmico responsável por muitas das complicações da SM (CAMARGO et al., 2014).

O tecido adiposo é o órgão endócrino metabolicamente ativo mais abundante no corpo e uma fonte de hormônios como adiponectina, IL-6 e TNF- α . Entre estes, a adiponectina, codificada pelo gene ADIPOQ, exerce um potente efeito sensibilizador de insulina, enquanto as citocinas pró-inflamatórias, interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), contribuem para o desenvolvimento de inflamação em indivíduos obesos (USMAN; JAFRI, 2014; ABU-FARHA et al., 2014).

Como a SM está associada à obesidade central e à disfunção adiposa, as adipocinas são fortes candidatas para prever o futuro desenvolvimento de RI, DM2 e conseqüentemente da síndrome (UZMA et al., 2018).

A adiponectina está envolvida no metabolismo da glicose, na gliconeogênese hepática, na oxidação de ácidos graxos e na síntese de óxido nítrico, atuando através do receptor 1 ADIPOQ (R1), aumenta a ativação de AMP e translocação de transportadores de GLUT 4, favorecendo a captação de glicose pelos músculos esqueléticos (YAMAUCHI et al. 2007), também promove o reparo vascular melhorando a função e o número de células progenitoras endoteliais (YOON et al. 2006), a secreção de adiponectina é reduzida na SM devido a RI, estresse oxidativo, adiposidade excessiva e inflamação (FISMAN & TENENBAUM, 2014), como é demonstrado na figura 1.



Fonte: ZAFAR et al. 2018

ADIPOQR, receptor de adiponectina; AMP, monofosfato de adenosina; CPT1, carnitina-palmitoiltransferase; NFK-B, fator nuclear kappa B; NO, óxido nítrico; PPAR- γ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; V-CAM, molécula de adesão celular vascular.

Figura 1. Ilustração esquemática associando hipoadiponectinemia com resistência à insulina e desfechos clínicos adversos.

Se a capacidade de armazenamento é excedida, surgem depósitos em localizações ectópicas e que condicionam a resistência periférica à insulina, um dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SM. A resistência à insulina, por sua vez, causa hiperglicemia com consequente glicosilação de diversas proteínas vulneráveis, entre elas as apolipoproteínas, e motiva perturbações da sua função e alterações dos níveis lipídicos sistêmicos (SENEFF, 2011).

Esta síndrome representa uma importante combinação fisiopatológica do metabolismo humanos e para estudos em modelos animais. A presença de SM leva a um aumento do risco de diabetes tipo 2 e doença cardiovascular, na forma de aterosclerose coronária ou periférica e

insuficiência cardíaca. Além disso, está associada a algumas outras complicações sistêmicas que afetam diferentes órgãos e sistemas, como esteatose hepática e câncer. Os pacientes com SM aumentaram a mortalidade por todas as causas e reduziram o tempo de vida em comparação com a população geral (GUIZE et al. 2007; ZAMBON et al. 2009).

Assim, é reconhecido que a SM está associada ao envelhecimento precoce (NUNN et al. 2009), que é de importância predominante considerando a crescente epidemia mundial de síndrome metabólica (HAFFNER & TAEGTMEYER, 2003). Desta forma, a descrição dos mecanismos bioquímicos que ligam as alterações da síndrome metabólica ao tempo de vida é importante.

O processo de envelhecimento é alterado ou acelerado quando doenças metabólicas e cardiovasculares estão presentes e o risco de doenças aumenta com a idade. Muitas condições predisponentes que aumentam a prevalência durante o envelhecimento, como obesidade, resistência à insulina, inflamação, alterações na atividade do eixo supra-renal do hipotálamo-hipófise, estresse e hipertensão também contribuem para aumentar a prevalência da síndrome metabólica. Envelhecimento, o desenvolvimento de resistência à insulina e doença cardiovascular parece ser acelerado na síndrome metabólica (GUARNER et al. 2005; FADINI et al. 2011; REN et al. 2010).

Em um estudo, observou-se o papel do estresse oxidativo nas interações fisiopatológicas entre os fatores constituintes da SM. No entanto, embora algumas das características constituintes da síndrome sejam conhecidas por compartilhar mecanismos patogênicos comuns de danos, o impacto da predisposição hereditária e a regulação da expressão gênica, bem como o papel do ambiente e do hábito alimentar na determinação da oxidação desencadeada pelo processo inflamatório parecem ser determinantes no aparecimento da síndrome (SAHAF et al. 2005).

Alguns estudos demonstraram que o consumo de dietas ricas em grãos refinados é capaz de induzir hiperglicemia aguda a curto prazo e desencadear a liberação de citocinas inflamatórias. Em contrapartida, dietas ricas em grãos integrais podem diminuir o aparecimento de radicais livres e citocinas inflamatórias como a IL-6, IL-8 e TNF- α (GIUGLIANO et al. 2006). Estudos de intervenção encontraram uma diminuição nos marcadores inflamatórios quando foram incluídos o consumo de dietas do mediterrâneo, baseada no consumo de alimentos frescos e naturais, ou na adesão de diretrizes dietéticas quando a SM estava envolvida (AHLUWALIA et al. 2013).

Do contrário, dietas pobres em antioxidantes naturais e fibras de frutas, legumes e grãos integrais, podem causar a produção excessiva de citocinas inflamatórias, parecendo provável que a dieta tem potencial para mediar um grande efeito na SM (STECKHAN et al. 2016).

O TNF- α e a IL-6 são citocinas com atividades endócrinas, autócrinas e parácrinas e cuja expressão gênica está aumentada em adipócitos, macrófagos e linfócitos nos indivíduos obesos (MOHAMMADI et al. 2017). A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, envolvida no desenvolvimento da hiperinsulinemia e na SM, pois desempenha papel importante no metabolismo de carboidratos e lipídios por aumentar a lipólise, com inibição da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol, e redução da expressão do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e GLUT-4 nos tecidos muscular e hepático. Em mulheres com IMC $> 28,3 \text{ kg/m}^2$, níveis deste marcador foram quatro vezes maior que o de mulheres com IMC inferior, levando a risco relativo quatro vezes para a hiperinsulinemia (REXRODE et al. 2003).

O TNF- α atua localmente nos adipócitos e reduz a sensibilidade à insulina por diferentes mecanismos, incluindo (a) inibição da ativação do substrato-1 do receptor de insulina, (b) diminuição da expressão de PPAR- γ nos adipócitos e (c) diminuição da afinidade desses receptores para uma classe de medicamentos chamados tiazolidinedionas (DALZIEL et al. 2002; NAVARRO-GONZALEZ & MORA-FERNANDEZ, 2008)). O TNF- α diminui a vasodilatação mediada por óxido nítrico e está envolvido na patologia vascular da síndrome metabólica, na aterosclerose e na doença arterial coronariana (PICCHI et al. 2006; VIKRAM et al. 2011).

Um estudo com indivíduos saudáveis demonstrou correlação entre a IL-18 e os componentes da SM: glicemia, circunferência da cintura, níveis séricos de triacilgliceróis e de HDL, pressão sistólica, pressão diastólica, além dos níveis séricos de insulina, IMC e os marcadores inflamatórios IL-6 e PCR ($p < 0,001$). Neste estudo, quanto mais componentes da SM os indivíduos apresentaram (0, 1, 2 e > 3), maiores eram os valores da IL-18 (255, 279, 315, 356 $\mu\text{g/L}$), respectivamente ($p < 0,001$). Desse modo, níveis elevados de IL-18 são associados com a SM de uma forma independente da obesidade e da RI (HUNG et al. 2005).

Considerando a importância do controle dos fatores de risco e da estratificação desses fatores de risco em termos de associações entre os componentes da SM, é importante delinear fatores prognósticos, adotando-os como uma ferramenta de uso diário na prevenção de DCV.

Além da análise dos parâmetros tradicionais antropométricos, bioquímicos e de estilo de vida, deve-se levar em consideração marcadores inflamatórios. Esses marcadores estão associados à morbidade cardiovascular e possui associações robustas com muitos componentes da SM. Também deve-se considerar que a adoção de medidas de intervenção deve começar na infância, para que novos hábitos durem até a idade adulta, aumentando assim não só a expectativa de vida, mas também a qualidade de vida (BARBALHO et al. 2015).

2.2 Probióticos, prebióticos e simbióticos

Probiótico é uma palavra derivada do grego que significa “em favor de vida”. São considerados probióticos, micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (HARDY et al., 2013; ANVISA, 2018).

Não bastando ser um micro-organismo vivo, o probiótico deve ainda possuir as seguintes características: a. estabilidade ao ácido gástrico e aos sais biliares; b. capacidade de aderência à mucosa intestinal; c. capacidade de colonização do TGI humano; d. capacidade de produção de compostos antimicrobianos; e. desempenho de atividade metabólica no intestino humano (RAIZEL et al., 2011).

Apesar de se apresentarem 16 espécies de micro-organismos com capacidade probiótica, apenas possuem alegação de propriedade funcional aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os que seguem: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. É uma recomendação do mesmo órgão que o consumo desses probióticos esteja associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 2008).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* estão distribuídas em várias cavidades do trato gastrointestinal e integram uma importante parte da microbiota; a sua utilização é afetada por diversos fatores ambientais como: pH, disponibilidade de oxigênio, nível de substrato específico, presença de secreções e interações bacterianas. Como possuem propriedades potencialmente probióticas, uma das bactérias desse gênero, a *L. acidophilus* e *L. casei*, tem sido abundantemente usada pelos laticínios para a produtividade de leites fermentados e

outros derivados lácteos. Esse gênero degrada amidalina, celobiose, frutose, galactose, lactose, glicose, maltose e manose (RAIZEL et al., 2011).

Algumas espécies de *Lactobacillus*, dentre elas *L. paracasei*, foram isoladas de subprodutos de processamento de polpa de frutas, apresentando tolerância a diferentes condições ácidas, concentrações de sais biliares, bom crescimento em meios de crescimento laboratorial e comestível, bem como capacidade de inibir bactérias patogênicas distintas (GARCIA et al. 2016).

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como o *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium*, os quais são os mais utilizados pelas indústrias, estão de modo direto associados como impulso da resposta imune pelo crescimento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T, produção de interferon e outros benefícios (VARALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Com efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos para o organismo, vários mecanismos de ação têm sido propostos para a atuação dos probióticos em benefício do hospedeiro. Esses agentes demonstraram eficácia na prevenção e no tratamento de diversas condições médicas, particularmente no tratamento das patologias gastrointestinais, além da prevenção e tratamento de outras aplicações clínicas (OLIVEIRA et al. 2017).

Dentre estas aplicações clínicas podemos citar o controle do colesterol sanguíneo, onde os probióticos podem reduzir em 1% a concentração de colesterol sérico e está vinculado com redução estimada em 2 a 3% do risco de coronariopatias. Os mecanismos propostos da atividade hipocolesterolêmica das bactérias lácticas são: a inibição da absorção exógena de colesterol pelo intestino delgado, supostamente pela associação deste composto e dos ácidos biliares à parede celular bacteriana; a separação dos ácidos biliares por ação bacteriana, anulando a reabsorção deste composto; e a reação de desconjugação, a qual libera aminoácidos no meio e ácidos biliares, que reduzem a absorção de colesterol pelo aumento da excreção fecal destes (ANTUNES et al., 2007).

Haja vista que a hipercolesterolemia está diretamente ligada aos problemas de doenças como infarto e aterosclerose, e que o excesso de LDL-colesterol na circulação sanguínea lesiona os vasos após oxidação pelos radicais livres, facilita o depósito de lipídios nesses canais aumentando o risco de doenças cardiovasculares (MOROTI et al., 2009).

Com relação a doenças inflamatórias crônicas do intestino e outras situações gastroenterológicas, como a doença de Crohn, a colite ulcerosa e para a inflamação crônica da bolsa ileal; obtêm-se resultados satisfatórios com o uso de probióticos na síndrome do intestino curto e na alergia alimentar, supostamente pela redução da permeabilidade intestinal e pelas suas características anti-inflamatórias (VARALLO et al. 2008).

Quando ocorre um desequilíbrio na microbiota intestinal normal, por meio de doenças ou da má alimentação, as condições de competição desaparecem e modifica-se o ambiente, criando um meio que propicia a proliferação de microrganismos transitórios e outros patogênicos sobreviventes. Esse desequilíbrio da microbiota intestinal é chamado de disbiose, uma condição de competição bacteriana, ocorrendo um aumento das bactérias patogênicas e a diminuição das benéficas (SANTOS & VARAVALLO, 2011).

A disbiose é um problema grave, por isso deve ser muito bem investigada e tratada (ALMEIDA et al., 2009). Muitos fatores afetam a composição da microbiota intestinal, entre eles, a idade do indivíduo, requerimento nutricional e estado imunológico, pH estomacal, estresse, uso de antibióticos, drogas imunossupressoras, anti-inflamatórios, pílulas anticoncepcionais, laxantes, tempo de trânsito intestinal, interações entre os componentes da microbiota intestinal e presença de material fermentável no intestino (SARON et al., 2005; FAGUNDES, 2010).

A disbiose intestinal tem tratamento, que consiste em uma reeducação alimentar e suplementação com o uso diário de probióticos, que terão um papel importante na composição da microbiota intestinal, diminuindo e até eliminando os sintomas do desequilíbrio das bactérias intestinais (CONRADO et al. 2018).

Pesquisadores demonstraram que a bactéria probiótico *Lactobacillus ramosos* (10^7 UFC) foi eficaz na alteração de efeitos colaterais associados a antibióticos, à distensão abdominal e à flatulência. Em voluntários saudáveis, 16 tomaram aleatoriamente eritromicina com ou sem *L. ramosos* durante um período de uma semana, e houve redução significativa da diarreia no grupo que ingeriu o probiótico. Ainda que o mecanismo pelo qual os probióticos têm ação no câncer do cólon ainda não tenha sido esclarecido, algumas hipóteses seriam: supressão do carcinógeno pró-carcinógeno por ligação; diminuição do pH intestinal, variando a atividade da microbiota e a solubilidade da bile; variações do tempo de trânsito intestinal, retirando substâncias mutagênicas mais eficientemente; estimulação do sistema

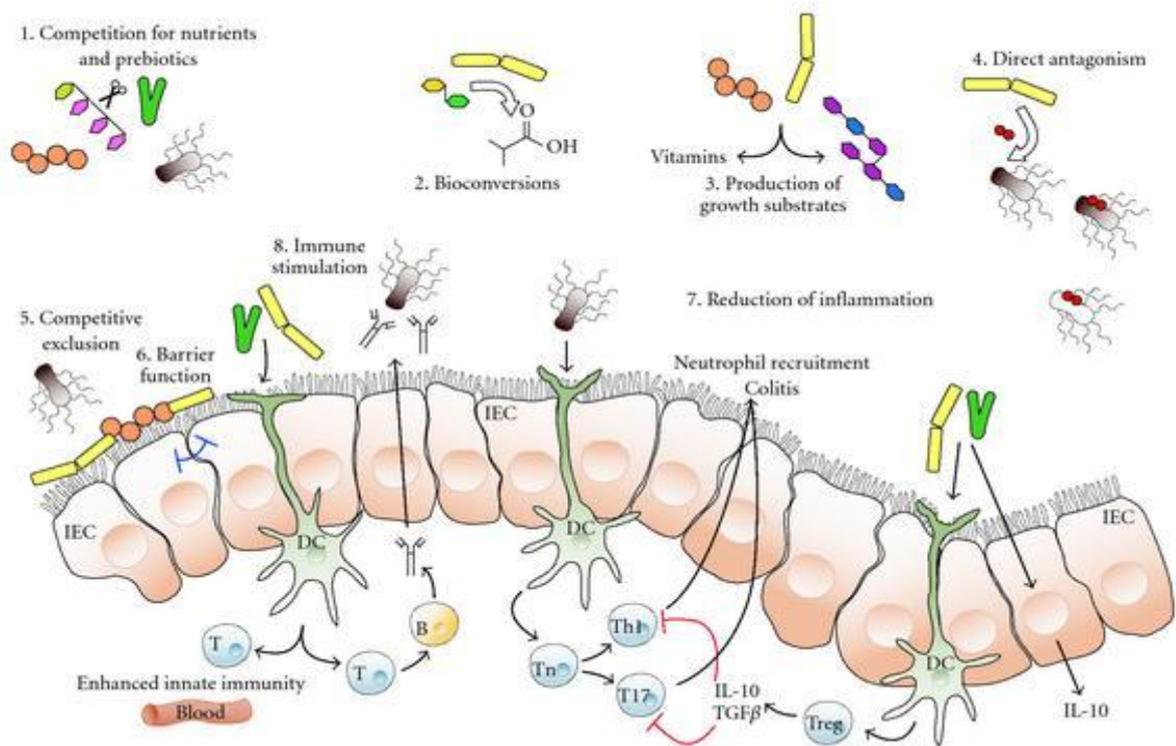
imune; bloqueio ou remoção; supressão de bactérias com atividade enzimática (PIMENTEL, 2011).

Muitos benefícios à saúde têm sido associados ao consumo do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, incluindo atividade antimicrobiana, propriedades antimutagênicas, anticancerígenas e antioxidante, além da estimulação do sistema imunológico (PIMENTEL, CRUZ; PRUDENCIO, 2013).

Um estudo demonstrou que *L. paracasei* produziu efeito antiproliferativo contra células HT29 e CT26, modelos *in vitro* para adenocarcinoma, demonstrando que seus produtos de fermentação são importantes no tratamento de câncer de colo retal (CHIA-YUAN & TZU-MING, 2018).

Bertazzoni Minelli et al. (2004) demonstraram a alta resistência de cepas de *L. paracasei* ao estresse gastrointestinal e, adicionalmente, constataram a sua capacidade de aderência às células do epitélio intestinal. Estudos *in vivo* apontaram para as possíveis atividades de imunomodulação e modulação do colesterol atribuídas ao *L. paracasei*. Lin et al. (2004) e Chiu et al. (2006) relataram que este mesmo probiótico reduziu os níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos. Medici et al. (2004) estudou a capacidade imunomoduladora do *L. paracasei* incorporado em queijo fresco, demonstrando que este micro-organismo foi capaz de aumentar o número de células produtoras de imunoglobulina A em camundongos.

A Figura 2 demonstra alguns mecanismos de ação dos probióticos no ambiente intestinal. Esses mecanismos incluem (1) competição por ingredientes alimentares usados como substratos de crescimento, (2) bioconversão de, por exemplo, açúcares em produtos de fermentação com propriedades inibitórias, (3) produção de substratos de crescimento, por exemplo, EPS ou vitaminas, para outras bactérias, (4) antagonismo direto por bacteriocinas, (5) exclusão competitiva para sítios de ligação, (6) melhora na função de barreira, (7) redução da inflamação, alterando, portanto, as propriedades intestinais para facilitar a colonização e permanência, e (8) estimulação da resposta imunológica inata (mecanismos subjacentes desconhecidos). CEI, células epiteliais; CD, células dendríticas; T, células-T (O'TOOLE; COONEY, 2008).



Fonte: ilsı.org

Figura 2: Diagrama ilustrando mecanismos de ação potenciais ou conhecidos dos probióticos

A terminologia Prebiótico foi introduzida pelos cientistas Gibson e Roberfroid em 1995 no artigo intitulado “*Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics*” publicado no reconhecido *The Journal of Nutrition* (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Desde então, vários estudos a fim de se identificar novas matérias primas prebióticas vêm sendo conduzidos (SABATER-MOLINA et al., 2009; CAMPOS et al., 2012).

A ação primária é estimular seu crescimento e/ou ativar o metabolismo de algum grupo de bactérias benéficas no trato intestinal. Assim, os prebióticos atuam intimamente relacionados aos probióticos como "alimento" das bactérias probióticas (DENIPOTE et al., 2010).

De maneira geral, não deve ser metabolizado ou absorvido durante sua passagem pelo trato digestivo superior; deve servir como substrato para uma ou mais bactérias intestinais benéficas (estas são estimuladas a crescer e/ou a tornarem-se metabolicamente ativas); possuir a capacidade de alterar a microflora intestinal de uma maneira favorável à saúde do

hospedeiro; induzir lúmen sistêmico ou intestinal dos efeitos benéficos do hospedeiro (FLESCH et al., 2014).

Usualmente são usados três critérios para a determinação de um prebiótico: 1. Resistência à acidez gástrica, à hidrólise enzimática do TGI humano e à absorção gastrointestinal; 2. Possibilidade de fermentação pela microflora intestinal; 3. Estimulação seletiva do crescimento e atividade das bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem-estar (ROBERFROID, 2007).

Alguns açúcares não absorvíveis, fibras, oligossacarídeos e álcoois de açúcar são classificados como prebióticos. Destes, os fruto-oligossacarídeos são polissacarídeos que demonstraram bons efeitos prebióticos, servindo como substrato específico de algumas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, reduzindo assim a quantidade de outras bactérias como *Bacteroides*, *Clostridium* e coliformes (DENIPOTE et al. 2010).

Prebióticos podem ser encontrados naturalmente em sementes e raízes de algumas plantas, como chicória, cebola, alho, alcachofra, espargos, cevada, centeio, soja, grão-de-bico e tremoço. Também pode ser extraído por cozimento ou por ação enzimática ou alcoólica. Existem também oligossacarídeos sintéticos obtidos por polimerização direta de dissacarídeos, alguns polissacarídeos da parede celular de levedura e fermentação (USAMI et al. 2011).

As substâncias prebióticas estimulam o crescimento do número de bactérias intestinais benéficas, cujo metabolismo também atua reduzindo o pH, aumentando a quantidade de ácidos orgânicos. Especula-se que os oligossacarídeos também possam atuar estimulando o sistema imune pela redução indireta da translocação intestinal por patógenos, o que determinaria infecções após atingir a corrente sanguínea (PARK & FLOCH, 2007).

Simbióticos são alimentos que possuem em sua formulação componentes prebióticos e probióticos simultaneamente. No intestino humano a interação entre as bactérias e hospedeiro caracteriza uma relação simbiótica, que pode ser otimizada mediante intervenção nutricional ou farmacológica com o uso de probióticos ou prebióticos (RAIZEL et al., 2011).

A associação destes dois ingredientes funciona como um fator multiplicativo, resultando numa ação sinérgica e mais eficiente que culmina numa melhor colonização do trato intestinal e, portanto, no aumento dos benefícios esperados. A adaptação do micro-

organismo probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo, garante a excelência da formulação (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001; BIELECKA et al., 2002).

Entre as funções das cepas simbióticas, o aumento da resistência contra patógenos é o mais bem caracterizado. O uso de culturas probióticas exclui micro-organismos potencialmente patogênicos que são inibidos pelo crescimento da produção de ácidos orgânicos (lactato, propionato, butirato e acetato) e bacteriocinas, potencializando os mecanismos naturais de defesa. A modulação da microbiota intestinal por micro-organismos probióticos ocorre por meio do mecanismo denominado "exclusão competitiva" e as cepas que influenciam benéficamente nesses casos são *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus plantarum* (GIL & BENGMARK, 2006).

Outro fator relevante é a barreira intestinal clínica, uma vez que pacientes desnutridos geralmente apresentam perdas no equilíbrio da barreira intestinal. A microflora intestinal é um importante constituinte da defesa da barreira intestinal, promovendo resposta imune local e nível sistêmico, com intensa resposta inflamatória. O uso de simbiótico otimiza o sistema imune intestinal e promove o controle da flora, diminuindo a incidência de infecção por probióticos, aumentando os linfócitos circulantes e as citocinas, que estimulam a fagocitose. Os prebióticos, por sua vez, aumentam a liberação de altos níveis de ácido láctico e, conseqüentemente, promovem a redução do pH do cólon (FOOKS & GIBSON, 2002).

O uso de simbióticos, entre outros benefícios, pode aumentar o número de bifidobactérias, controle glicêmico, redução do colesterol sanguíneo, equilíbrio da flora intestinal saudável que auxilia na redução da constipação e/ou diarreia, melhora a permeabilidade intestinal e estimula o sistema imunológico (WILLIAN et al. 2006)

2.3 Produtos simbióticos de origem vegetal

Sabe-se que o alimento simbiótico é aquele que contém em sua formulação a adição de componentes prebióticos e probióticos. A maioria dos produtos obtidos com essa característica é de origem láctea, entretanto estudos recentes vêm trazendo uma nova perspectiva de aplicação que inclui dentre outros, o uso de bebidas à base de frutas e vegetais (SOCCOL et al., 2007; CÉSPEDES et al., 2013).

O uso de alimentos de origem vegetal justifica-se, dentre tantos benefícios, pela possibilidade de atender a distintos grupos populacionais como os vegetarianos e indivíduos intolerantes ou alérgicos a componentes lácteos, como também a possibilidade de oferta de uma bebida isenta de colesterol e rica em vitaminas e minerais, inerentes do próprio fruto (SOCCOL et al., 2010).

Outras razões que apontam para o desenvolvimento de bioprodutos de origem vegetal são os reconhecidos benefícios do consumo regular de frutas e verduras e ainda por questões econômicas e sazonais, otimizando o consumo regular ao longo do ano, ao passo que se aproveita toda matéria prima que poderia ser perdida se não houvesse processamento (SCHMIDT; PEREIRA, 2011).

Sucos e néctares podem ser adicionados de ingredientes prebióticos e probióticos, sendo possibilitada ainda a formulação de uma terceira classe de produtos: o simbiótico. Achados recentes demonstram que a fermentação induzida pelos micro-organismos probióticos, tende a modificar em demasia a característica organoléptica do suco (*off-flavour*), o que sugere o reconhecimento da formulação de um novo produto à base vegetal e não a manutenção das terminologias “suco, ou néctar” (LUCKOW et al., 2006; SCHMIDT; PEREIRA, 2011).

O inhame (*Dioscorea* sp.) apresenta características alimentares importantes, pois trata-se de um alimento rico em carboidratos, apresentando um excelente valor energético. Possui ainda baixo índice glicêmico e bom teor de fibras, bem como, é fonte de vitaminas e minerais (FOSTER-POWELL et al., 2002; LEONEL et al., 2006; TACO, 2011).

Estudos demonstraram que o inhame é fonte de diversos componentes funcionais, como a mucina, a alantoína, a colina, fitoesteróis e polifenoloxidasas, além de alcalóides como a dioscorina. A dioscorina é componente funcional com atividade antioxidante e imunomoduladora (HOOKER, 2004; JHENG et al., 2012; HAN et al., 2013). A presença de saponinas esteroidais como a diosgenina e a protodioscina também tem mostrado o inhame com possível efeito anti-hiperlipidêmico (KWON et al., 2003; SON et al., 2007; PAN et al., 2013).

A cultura do inhame também é de extrema importância para o Brasil, que produz quase 100 toneladas do tubérculo por ano, com destaque para as regiões Sudeste e Nordeste (IBGE, 2009). Dados do Censo Agropecuário Brasileiro do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam que no Nordeste Brasileiro a produção ultrapassa de 39 mil toneladas por ano, sendo, portanto, um negócio agrícola promissor, visto ainda a perspectiva

de exportação, que hoje engloba menos de 1% da produção total. (SANTOS; 1996, IBGE, 2009).

O maracujá (*Passiflora edulis Sims*) é reconhecido popularmente por apresentar propriedades calmantes. O fruto maduro é consumido principalmente na forma de suco, entretanto é um fruto bastante usado para confecção de compotas e geleias. A fruta é bastante apreciada devido ao seu sabor e aroma agradáveis, além de ser uma boa fonte de vitaminas A e C (EMBRAPA, 1994; 2013; FAO, 2013).

O grande desafio na formulação de bebidas vegetais simbióticas encontra-se, portanto na dificuldade de agregar a funcionalidade à manutenção do sabor culturalmente reconhecido como agradável dos sucos de fruta. Estratégias para driblar tal dificuldade seriam segundo Luckow e colaboradores (2006), mascarar o sabor indesejável com o uso de sucos de sabor marcante; b. Estimular o consumo frequente da bebida pelo consumidor, o que possivelmente acarretaria numa adaptação ao novo sabor; c. Incutir no consumidor a mudança do sabor à agregação funcional, que culmina em benefícios à saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver bebida vegetal funcional e estudar efeito benéfico na síndrome metabólica.

3.2 Específicos

- Elaborar e determinar as características físico-químicas e microbiológicas da farinha do inhame (FI);
- Avaliar a estabilidade ao armazenamento da FI;
- Elaborar bebida simbiótica à base de polpa de maracujá, adicionadas da FI e fermentada com *Lactobacillus paracasei*;
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas da bebida funcional;
- Determinar a resistência dos micro-organismos a fluidos simulados do trato gastrointestinal;
- Realizar teste de aceitabilidade e intenção de compra da bebida simbiótica;
- Estudar o tempo de vida em prateleira da bebida simbiótica;
- Induzir Síndrome metabólica em camundongos obesos devido à dieta hiperlipídica.
- Avaliar a atuação da bebida simbiótica em camundongos com síndrome metabólica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da farinha do inhame

Para a obtenção da farinha do inhame foi usada a metodologia descrita por Ventura e Fontoura (1994) com algumas modificações. As etapas de obtenção foram: seleção, lavagem, sanitização, descascamento, fatiamento, resfriamento, branqueamento, secagem, trituração, pulverização, tamização e armazenamento. Após seleção, os tubérculos foram pesados, medidos e então submetidos à lavagem com abrasão em água corrente com o intuito de retirar as sujidades. Seguiram pelo processo de sanitização e então descascados. Após fatiamento (1-2 mm) e resfriamento (10-12°C), as fatias foram branqueadas em água à 90-95°C por 3 minutos e seguiram pelos processos de secagem a 70°C por 4 horas, trituração e pulverização em moinho a uma velocidade de 17.000-19.000 rpm. A tamização foi realizada em peneiras com abertura das malhas a 80 mesh acopladas a um vibrador e agitadas, e a farinha foi então armazenada.

4.2 Caracterização físico-química e microbiológica da farinha

As análises físico-químicas foram realizadas segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e compreenderam: umidade, acidez, pH, cinzas, extrato etéreo, proteínas, glicídios totais, amido e fibra alimentar total. A atividade de água foi obtida por medição direta em analisador de atividade de água (LabTouch-aw – Novasina). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores médios obtidos expressos em g/100g.

O valor energético total (VET) foi calculado através do somatório das calorias oferecidas pelos macronutrientes, a saber, 4 Kcal/g para carboidratos (C) e para proteínas (P) e 9 Kcal/g para lipídios (L). Para tanto foi usada a seguinte equação:

$$\text{VET} = (\text{C} \times 4) + (\text{P} \times 4) + (\text{L} \times 9)$$

Adequando-se à legislação vigente para padrões microbiológicos de alimentos (BRASIL, 2001) foram realizadas as análises microbiológicas descritas na Tabela 2, de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

Tabela 2 – Análises microbiológicas realizadas na farinha de inhame.

Análise	Referência AOAC, 2002	Técnica	Expressão dos resultados
Coliformes a 45°C	966.24	Tubos múltiplos	NMP/g
<i>Estafilococos</i> coagulase positiva	965.55	Enumeração, isolamento e confirmação.	UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	980.31	Enumeração, isolamento e confirmação	UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	967.26	Enriquecimento seletivo, isolamento e identificação bioquímica	Presença/ausência

4.3 Estabilidade de armazenamento

A farinha de inhame, armazenada em potes esterilizados de vidro com tampas rosqueadas, foi mantida em ausência de luz e em sala em temperatura ambiente (35°C) por até 180 dias. Nos tempos 0 – 30 – 60 – 90 – 120 – 150 – 180 as amostras foram coletadas de forma aleatória e então submetidas ao controle microbiológico e químico, que consistiu das análises de coliformes a 45°C/g, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positiva/g, *Salmonella* sp/25g, *Bacillus cereus*/g, umidade e atividade de água (Aw),

4.4 Formulação da bebida simbiótica

A bebida de maracujá, onde a concentração da polpa obedeceu aos critérios determinados pela Legislação Brasileira para sucos tropicais no que diz respeito a adequação ao limite dos sólidos solúveis (°Brix) preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em sua Instrução Normativa nº12 de 2003, que prevê o valor mínimo de 6 °Brix, utilizando-se um refratômetro, obtendo-se um percentual de 31% de polpa de fruta e 69% de água, sem adição de açúcar. A bebida vegetal foi submetida a um tratamento térmico de 72°C por 5 minutos, logo depois seguiu imediatamente para um banho de gelo a 10°C, com a finalidade de resfriar a bebida até 35°C.

O fluxograma seguido para a elaboração das bebidas funcionais pode ser visualizado na Figura 3.

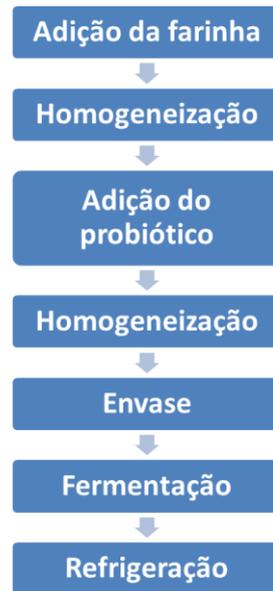


Figura 3. Fluxograma de obtenção da bebida vegetal funcional.

4.5 Ativação, viabilização e adição da cepa a bebida

L. paracasei foram adquiridos do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, e inoculados em meio BHI para serem ativados. Para verificar a viabilidade das cepas foi realizada a contagem em meio Ágar rogosa e em seguida as cepas foram mantidas em estufa à temperatura à 37°C por 48 horas (BALDUÍNO et al. 1999). A cultura iniciadora de *L. paracasei* foi adicionada à bebida na concentração de 8 log UFC. mL⁻¹ (10⁸), segundo critérios designados pelo regulamento técnico da ANVISA (2008). Após a fermentação, as bebidas foram acondicionadas em geladeira a 4°C.

4.6 Avaliação da vida de prateleira da bebida funcional

A bebida foi submetida à avaliação do número de bactérias viáveis, pH e acidez após 0, 7, 14, 21 e 28 dias da sua fermentação. Para análise de bactérias viáveis as amostras foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl, pH 7,0) em série até 10⁻⁶ e alíquotas de 100µl e inoculadas em placas de Petri estéreis e adicionadas de Ágar rogosa. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, as colônias contadas e os resultados expressos em log

UFC.mL⁻¹. As análises de pH e acidez seguiram as determinações das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.7 Teste de aceitabilidade e intenção de compra da bebida simbiótica

Foi realizado o teste de aceitabilidade da bebida utilizando-se a escala hedônica de 9 pontos cujos limites seguiram a seguinte classificação: 01 para “desgostei extremamente” e 09 para “gostei extremamente”. As amostras foram apresentadas em painel sensorial de forma aleatória e codificadas a um mínimo de 50 provadores não treinados (MEILGARD, 1988). E para o teste de intenção de compra foi utilizado uma ficha resposta com escala estruturada de 5 pontos, oscilando de 1= certamente compraria a 5= certamente não compraria (ABNT, 1998).

No que diz respeito aos aspectos éticos para realização dos testes do projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e obteve aprovação através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número: 15312113.2.0000.5208. Todos os provadores voluntários foram esclarecidos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.8 Análise da sobrevivência do *L. paracasei* a fluidos simulados do trato gastrointestinal

Após o processo desenvolvimento da bebida, a sobrevivência do probiótico na bebida simbiótica após análise sensorial foi avaliada através de simulações das fases da digestão (gástricas e entéricas), de acordo com as metodologias descritas por Liserre et al., 2007 e Santos et al., 2011, com modificações.

4.8.1 Fase Gástrica (1ª Etapa)

Amostras das bebidas foram tratadas com HCl (1N) e o pH ajustado para 1,4-1,9. Soluções de pepsina e lipase foram adicionadas às amostras e os frascos foram incubados a 37°C, com agitação de cerca de 150 rpm, durante 2 h.

4.8.2 Fase Entérica 1 (2ª Etapa)

O pH das amostras foi ajustado para 4,3-5,2 com o uso de uma solução alcalina, produzida com 150ml de 1 N NaOH, 14 g de PO₄H₂Na₂H₂O (Synth) e água destilada até 1L.

Bile e pancreatina foram adicionadas, e as amostras foram incubadas a 37°C por 2h sob agitação.

4.8.3 Fase Entérica 2 (3ª Etapa)

O pH foi aumentado para 6,7-7,5 usando a mesma solução alcalina da fase anterior. As concentrações de bile e pancreatina foram ajustadas e as amostras foram incubadas novamente a 37°C por 2h sob agitação.

A contagem do *L. paracasei* em triplicata nos tempos 30, 120, 240, 360 minutos. Todos os resultados foram apresentados com log UFC/g.

4.9 Determinação da composição centesimal da bebida simbiótica

Para a determinação da composição centesimal da bebida simbiótica foram realizadas as análises descritas no item 4.2 no 28º dia de armazenamento da bebida.

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados com o programa SPSS *for Windows Evaluations Edition-14.0* (SPSS. INC., 2005) por análise de variância (ANOVA) e foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey. Para os gráficos dos testes de tolerância a glicose, tolerância a insulina e perfil lipídico, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5 *for Windows* por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.11 Caracterização dos animais

Camundongos *Swiss* machos com idade entre 04 e 08 semanas foram alocados em ambiente controlado com ciclo claro: escuro (12h/12h), temperatura controlada em cerca de 22°C e alimento e água *ad libitum*.

Os animais passaram por um período de adaptação de 4 semanas, e em seguida foram alocados em quatro grupos diferentes de dieta sem tratamento. O grupo “A” e “B” receberam ração padrão para roedores (carboidratos: 80%; proteínas: 15,5%; lipídeos: 4,5%) e água, e os grupos “C” e “D” receberam dieta rica em gordura (carboidratos: 49,5%; proteínas: 15,5%;

lipídeos: 35%) pelo mesmo período de tempo, a fim de que se tornem camundongos obesos e resistentes a insulina.

Após 4 semanas em dieta padrão e dieta hiperlipídica os grupos A, B, C e D foram tratados da seguinte maneira:

Controle sem bebida (SB): grupo controle sem tratamento (eutróficos): n=14

Controle com bebida (CB): grupo controle com bebida simbiótica (eutróficos): n=14

Obesos sem bebida (SB): grupo obeso sem tratamento: n=15

Obesos com bebida (CB): grupo obeso com bebida simbiótica: n=15

As bebidas simbióticas foram trocadas semanalmente e agitadas 3x por semana em dias alternados.

Este experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais sob número 01/14 CEUA/UPE, os animais foram anestesiados com tiopental (10µl/g) por via intraperitoneal para realização de laparotomia total, seguindo-se a eutanásia com deslocamento cervical.

4.12 Teste de tolerância a insulina (ITT)

Após 08 horas de jejum, foi obtida a glicemia de jejum dos animais avaliados. Logo após a insulina (1,5 U/Kg) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela veia da cauda dos animais nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicemia, utilizando glicosímetro (Optium Xceed, Abbott, Libertyville, IL, USA). A velocidade constante do decremento da glicose (KITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

4.13 Teste de tolerância a glicose (GTT)

Após 08 horas de jejum, os camundongos receberam injeção intraperitoneal de uma solução de glicose (1 g/Kg) e a glicemia foi medida antes da injeção e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos a partir de amostras de sangue coletados a partir da veia da cauda de cada camundongo, utilizando glicosímetro (Optium Xceed, Abbott, Libertyville, IL, USA).

4.14 Dosagem do perfil lipídico

Determinou-se as concentrações de colesterol total, triglicerídeos e colesterol-HDL, do plasma dos camundongos através do método enzimático colorimétrico por kit comercial (Labtest – Brasil), e os valores do LDL-colesterol foram obtidos por meio da equação de Friedewald (1972) ($LDL-C = ColT - HDL-C - \{Trig/5\}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de seleção do inhame para desenvolvimento da farinha, foi utilizado uma maior uniformidade do tubérculo com média de comprimento, circunferência e peso de 30,5 cm, 28,4 cm e 2,05 Kg, respectivamente. As amostras foram adquiridas na Central de Abastecimento de Alimentos de Maceió (CEASA/AL), sendo recebido de diferentes municípios alagoanos, dentre eles: Arapiraca, Viçosa e Chã Preta.

A média dos resultados das análises do inhame *in natura* e da farinha obtida mostram uma redução da umidade do tubérculo, concentrando os valores dos nutrientes presentes em 100 gramas da matéria prima (Tabela 3).

A farinha de inhame apresentou excelente composição nutricional. Observa-se que é rica em carboidratos, apresentando um alto teor de amido e fibras. Também é evidente um alto valor energético, sendo pobre em lipídios.

Tabela 3: Composição centesimal do inhame *in natura* convertido em farinha.

Análises	Inhame <i>in natura</i>	Farinha de inhame
	g.100 g ⁻¹	g.100 g ⁻¹
Umidade	81,47	3,28
Cinzas	0,42	4,51
Proteína	0,77	8,55
Lipídio	0,17	0,59
Carboidrato	17,18	81,50
Fibra Alimentar Total	2,24	10,4
Amido	15,58	75,1
Açúcares - totais e redutores	-	Tr*
Valor Energético Total (Kcal)	73,33	365,51
pH	6,29	5,83
Acidez	0,73	2,19

* Traços

A avaliação da vida de prateleira da farinha foi realizada para garantir a segurança de sua utilização na bebida vegetal simbiótica de maneira a não existir uma possível contaminação que dificultaria a fermentação do probiótico.

A análise dos resultados obtidos até 180 dias de experimento demonstrou que a farinha de inhame atendeu todos os critérios dispostos pela RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA, indicando um controle eficiente da contaminação durante o processamento da farinha, além de fornecer garantia quanto a qualidade higiênico-sanitária do produto (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização microbiológica da farinha de inhame armazenada por 180 dias.

Análises Microbiológicas	Resultados							Valores de referência (RDC 12 de 2 de janeiro de 2001)
	Dias							
	0	30	60	90	120	150	180	
Coliformes a 45°C/ NMP/g	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	10 ²
Bolores e Leveduras	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	*
UFC/g								
Estafilococos coagulase positiva/g	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	*
<i>Salmonella sp/25g</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Bacillus cereus/g</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	3 x 10 ³

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônia por grama.

NMP/g: Número Mais Provável por grama.

* Não é exigido pela legislação

As características da farinha de inhame durante o armazenamento podem ser visualizadas na Tabela 5, que demonstram a estabilidade da mesma. O resultado dos valores médios de umidade e atividade de água da farinha durante 180 dias de armazenamento, demonstrando que foi atendido a legislação brasileira para os padrões de armazenagem, que preconiza o máximo de 14% como limite superior para o resultado de umidade (BRASIL, 1978; BRASIL, 2011).

Tabela 5: Umidade e atividade de água da farinha armazenada por 180 dias.

Análises	Dias						
	0	30	60	90	120	150	180
Umidade %	3,31	3,41	5,49	5,58	5,71	5,88	5,94
Atividade de água (Aw)	0,304	0,359	0,364	0,371	0,388	0,392	0,407

Umidade e Atividade de água, relacionam-se com o teor de água disponível para crescimento de micro-organismos deteriorantes e patógenos, desta forma justifica-se a utilização dos métodos para avaliação da estabilidade a longo prazo. Assim, a farinha de inhame mostrou-se fisicamente estável durante o armazenamento de 180 dias.

Cabe ressaltar que todas as análises foram avaliadas comparativamente ao que está estabelecido para farinha de mandioca, por também tratar-se de um tubérculo e devido a FI não apresentar legislação própria

Após fermentação da bebida simbiótica foram realizadas as análises de vida de prateleira, com os resultados apresentados na Figura 4.

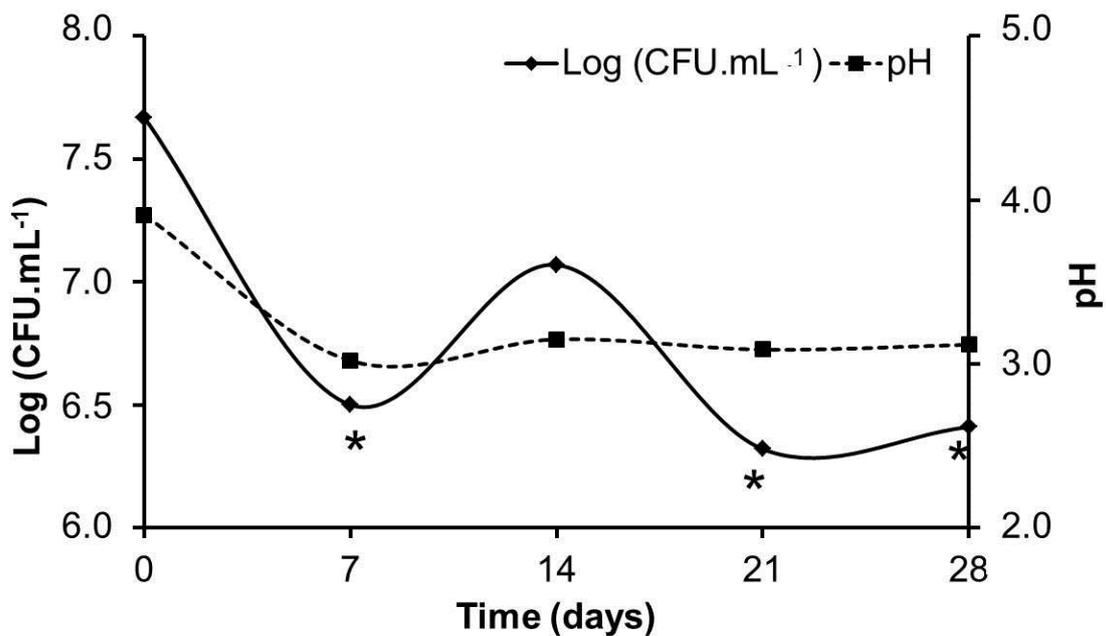


Figura 4. Variação do pH e contagem de *L. paracasei* (LogCFU.mL⁻¹) durante o período de armazenamento. Os valores em asteriscos (*) não indicaram diferença estatística no teste de Tukey (p>0,05).

Pode-se observar a variação do pH da bebida simbiótica com aumento progressivo da acidez até o tempo 7 dias, seguindo-se de uma maior estabilidade desta acidificação de forma a não apresentar diferença estatística no decorrer do tempo (14, 21 e 28), permanecendo quase que constante. Na curva de crescimento apresentada na figura acima podemos observar que não houve diferença estatística dos valores de bactérias viáveis, 7,61, 6,49, 7,03, 6,38 e 6,46 LogUFC.mL⁻¹, respectivamente. Mostrando um efeito positivo no crescimento do *L. paracasei* na bebida simbiótica durante o período de armazenamento, apresentando valores muito próximos entre os tempos 7 e 28 (UFC > 10⁶.mL⁻¹). A curva enfatiza que a bactéria apresentou excelente estabilidade ao meio ácido durante todo o período, bem como o número de micro-organismos viáveis para exercer efeitos positivos no hospedeiro, características essenciais dos probióticos (FOOKS & GIBSON, 2002; SHEEHAN et al. 2007).

A composição centesimal da bebida simbiótica apresentou-se de acordo com a Tabela 6. Podemos observar que a bebida simbiótica apresentou um bom teor de fibra alimentar, 10,4%, de acordo com Brownawell e colaboradores (2012), para que um alimento seja considerado uma boa fonte de fibra deve fornecer no mínimo 10% da fibra dietética recomendada. Além disso observa-se um baixo teor lipídico, demonstrando seu potencial para utilização em dietas com teor reduzido de gordura.

Tabela 6: Composição centesimal da bebida funcional no 28º dia de armazenamento.

Análises	Bebida funcional (g/100g)
Umidade	3,28
Cinzas	4,51
Proteína	8,55
Lipídio	0,59
Carboidrato	81,50
Fibra Alimentar Total	10,4
Valor Energético Total (Kcal)	365,51

O índice de aceitabilidade e o teste de intenção de compra estão descritos conforme a Tabela 7. Foram feitos por 50 provadores não treinados, com 80% correspondendo ao sexo masculino, seguindo-se o recrutamento de forma aleatória e por conveniência.

Tabela 7: Índice de aceitabilidade e intenção de compra da bebida funcional sabor maracujá enriquecida de farinha de inhame.

atributos	Índice de aceitabilidade (%)
Cor	75,21
Aparência	70
Aroma	72,39
Sabor	73,57
Qualidade global	71,83
Intenção de compra	66,4

De acordo com os resultados apresentados pode-se observar que o produto apresentou boa aceitação global, pois apresentou valor acima de 70% de IA, os voluntários relataram através de observações nos formulários de avaliação que se mostraram surpresos pelas características apresentadas tendo em vista que a proposta da bebida ser atípica no mercado, afirmando que houve uma surpresa positiva. Outras bebidas vegetais como bebida de frutas mistas, caju e maçã têm sido consideradas como uma boa alternativa para o desenvolvimento de bebidas simbióticas (CHAMPAGNE & GARDNER, 2008; PEREIRA et al, 2011; ELLENDERSEN et al. 2012). No que diz respeito a intenção de compra o resultado obtido dos 50 provadores foi de 66,4%, demonstrando que a bebida possui potencial de venda em uma projeção para o mercado consumidor.

A avaliação de sobrevivência *in vitro* a fluidos simulados do trato gastrointestinal estão apresentados conforme a Figura 5.

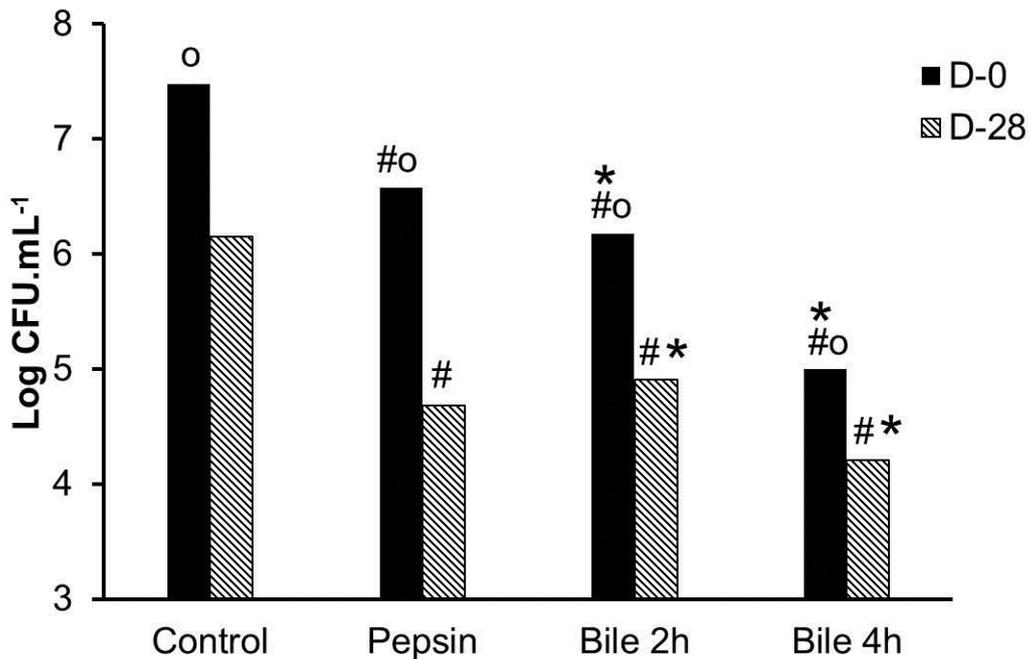


Figura 5: Resistência do *L. paracasei* a fluidos simulados do trato gastrointestinal *in vitro*.

As contagens médias de *L. paracasei* obtidas nos tempos 0 e 28 dias foram os seguintes: 7,48, 6,57, 6,18 e 5,00 LogUFC.mL⁻¹ para tratamentos de Controle, Pepsina, Bile 2h e Bile 4h na preparação de bebidas (D-0), respectivamente, e 6,15, 4,68, 4,90 e 4,20 LogUFC.mL⁻¹ para tratamentos de Controle, Pepsina, Bile 2h e Bile 4h no 28º dia de armazenamento (D-28), respectivamente. A análise estatística mostrou que todos os tratamentos em ambos os períodos diferiam significativamente do controle (#), o mesmo aplica-se para a bÍlis 2h e 4h (*) tratamentos. A contagem em d-28 foi menor do que na d-0 para todos os tratamentos (o) ($p < 0, 5$).

A maioria dos produtos fermentados demonstram baixa viabilidade celular após a administração oral, porque as bactérias não sobrevivem ao ambiente ácido do estômago (KLAYRAUNG et al., 2009). A bÍlis liberada no intestino delgado também dificulta a viabilidade dos probióticos porque a sua membrana celular rica em lipídios é destruída. Apesar da diminuição das células viáveis de *L. paracasei*, mostrou-se adaptado à bebida e condições extremas que foram submetidas durante as simulações.

Para a avaliação do ganho de peso dos animais, a pesagem foi realizada semanalmente como demonstra a Figura 6.

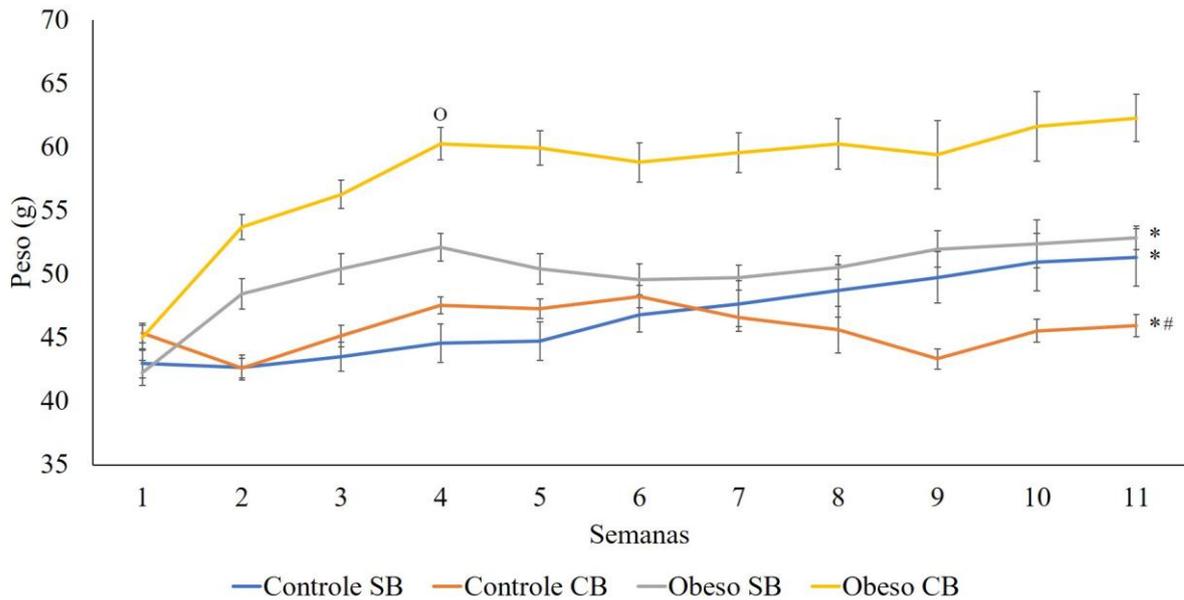


Figura 6. Evolução de peso dos animais durante o experimento. (o) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle SB, antes do tratamento. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao obeso CB. (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao obeso SB no teste de Tukey, após o tratamento.

A evolução dos pesos dos animais foi monitorada semanalmente após oferta da dieta hiperlipídica. De acordo com o gráfico observa-se que os grupos que receberam a dieta hiperlipídica tiveram um maior ganho de peso a partir da segunda semana, com diferença significativa ($p < 0,05$) a partir da quarta semana entre obeso CB e o controle SB, antes mesmo de iniciar a oferta da bebida simbiótica. Ao final do experimento, após a oferta da bebida, o ganho de peso dos grupos obesos continuou sendo maior que os controles, com diferença significativa entre o grupo obeso CB e os demais.

White e colaboradores (2013) também observaram o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos *Swiss*, em 10 semanas de consumo. Pietro et al. (2018) também obtiveram um maior peso corporal dos camundongos quando utilizaram dietas ricas em gordura por um período de 12 semanas. A ingestão de gordura dietética desempenha um papel bem reconhecido no risco cardiovascular e no desenvolvimento de doenças cardio-metabólicas, como aquelas incluídas no conceito de síndrome metabólica (SEGARRA et al., 2011).

Ao final da 4ª, início da oferta da bebida simbiótica, e da 11ª semana, foram realizados os testes de tolerância a glicose (GTT) e insulina (ITT) e da glicemia em jejum (GJ). A figura 7 apresenta o resultado da glicemia em jejum.

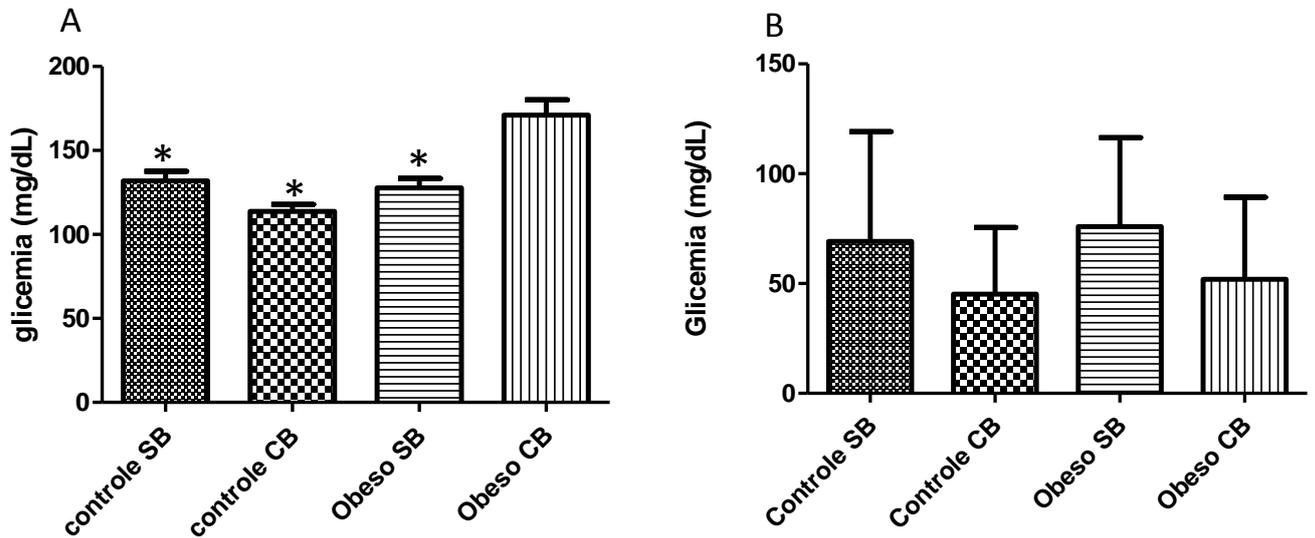
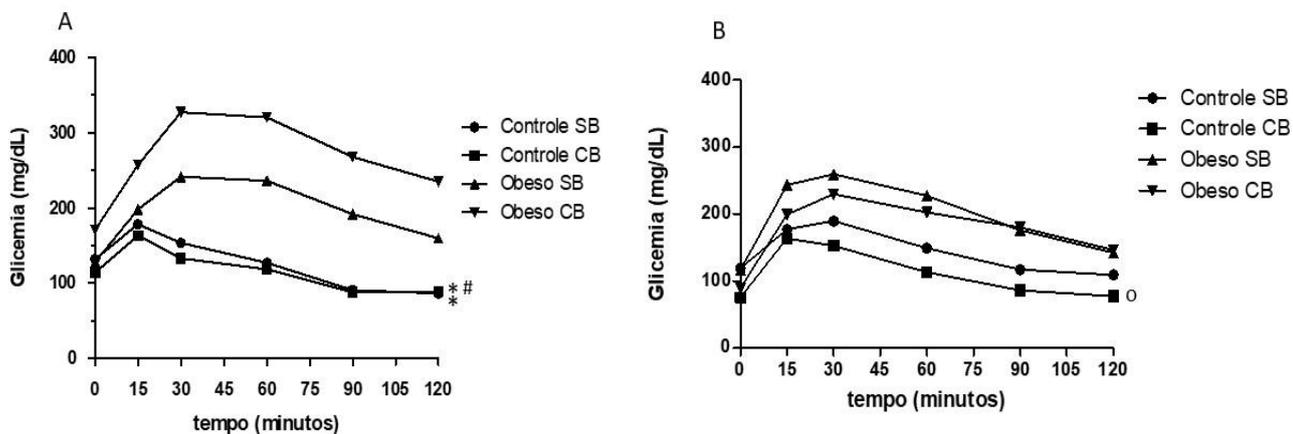


Figura 7. Glicemia em jejum dos animais por 12hs. Em **A** apresentam-se os valores de glicemia na 4ª semana e **B** no final do tratamento. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao obeso CB no teste de Bonferroni.

A Figura 8 apresenta o gráfico do teste de tolerância a glicose (GTT) realizado após jejum de 12hs, na 4ª e 11ª semana, e suas respectivas áreas sob a curva.



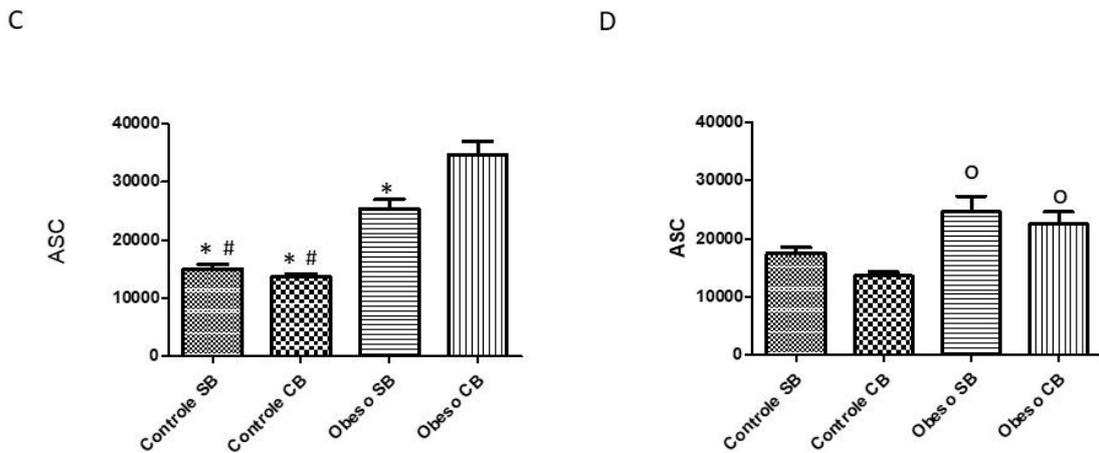


Figura 8. Valores de glicemia mensurados nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 após início do teste, e da área sob a curva (ASC) obtidos no teste de tolerância a glicose (GTT). Em **A**, (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) do obeso CB com os controles e (#) indica diferença entre o obeso SB e o controle CB, dos resultados da 4ª semana. Em **B**, (o) indica diferença significativa entre o obeso SB e o controle CB. Em **C**, (*) indica diferença significativa do CB com os demais grupos, e (#) indica diferença entre o obeso SB e os grupos controle, resultados da 4ª semana. e **D**, (o) indica diferença significativa entre os obesos no teste de Bonferroni, no final do tratamento.

A figura 9 apresenta o resultado da taxa de decaimento da glicose (KITT), resultante dos testes de tolerância a insulina curto (ITT de 30') realizados na 4ª e 11ª semana, nos animais em jejum de 12hs.

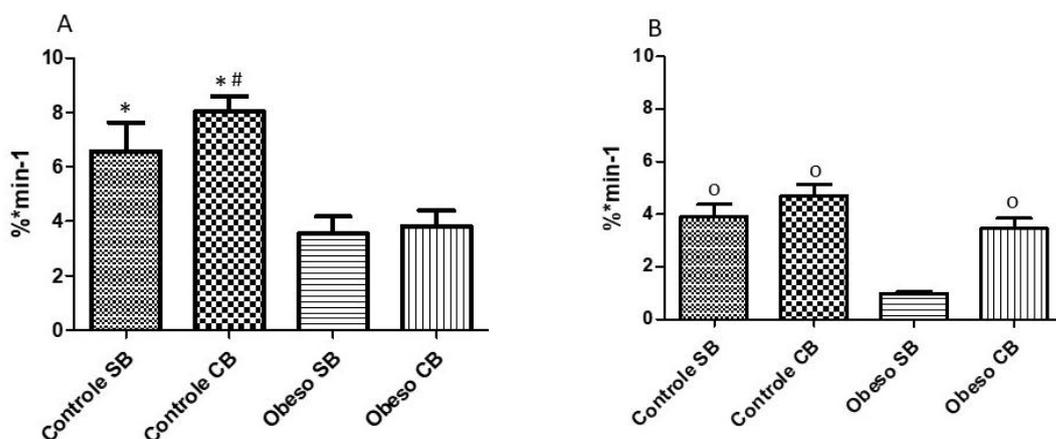


Figura 9. Índice de decaimento da glicose (KITT) dos grupos obesos e controles. A glicemia foi mensurada no tempo 0 (basal) e nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após injeção intraperitoneal de insulina regular. Em A, (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo obeso CB e os grupos controles, e (#) indica diferença significativa entre o obeso SB e o controle CB, resultados obtidos na 4^a semana, no teste de Bonferroni. Em B, (o) indica diferença significativa entre o obeso SB e o controle CB, na 11^a semana, no teste de Bonferroni.

Outros parâmetros avaliados no presente estudo reforçam o desenvolvimento da SM, além do peso corporal dos animais, como a hiperglicemia em jejum, intolerância à glicose e a resistência à ação da insulina, de acordo com os gráficos 7, 8 e 9, respectivamente. No que concerne a glicemia de jejum, é bem estabelecida a relação entre a obesidade e o aumento dos níveis glicêmicos após indução por dieta hiperlipídica (BUETTNER et al., 2006; FRALOUB et al., 2011). White e colaboradores (2013) observaram que 10 semanas de indução por dieta hiperlipídica em camundongos foram suficientes para determinação da obesidade associada a hiperglicemia de jejum, intolerância à glicose e resistência à insulina.

Estudos com camundongos mostraram intolerância à glicose e resistência à insulina após tratamento com dieta hiperlipídica durante 5 meses (GALLOU-KABANI et al., 2007), enquanto que no presente estudo tanto a resistência a insulina quanto a intolerância à glicose estão presentes no primeiro mês de dieta hiperlipídica, de acordo com as Figuras 8A, 8C e 9A, respectivamente.

A inflamação pode provocar prejuízo na sinalização da insulina celular, contribuindo com a resistência à insulina e desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Tal alteração no metabolismo passa a ter influência sobre o tecido adiposo, relacionando-a com o desenvolvimento da obesidade (WOTING; BLAUT, 2016).

Em modelos animais de obesidade, o fenômeno de resistência a ação da insulina e intolerância a glicose tem sido bem caracterizado, com uma íntima associação entre resistência e a gênese da obesidade (VELLOSO, 2006). O que também foi evidenciado no presente estudo quando avaliamos a curva do GTT e a área sob a curva do KITT na 4^a semana, demonstrando uma maior resistência a insulina dos grupos obesos quando comparados aos controles (Fig.9A) e pela intolerância à glicose (Fig. 8A).

A dieta tem uma influência marcante na microbiota intestinal, gerando diferentes enterotipos (ARUMUGAM et al., 2011) com uma composição previsível (FAITH et al., 2011) de acordo com o tipo de dieta consumida. Scott e colaboradores (2013) demonstraram que a ingestão de gordura na dieta é um fator importante que influencia o padrão da microbiota intestinal, afetando o balanço energético corporal, levando ao desenvolvimento da obesidade, inflamação associada a obesidade e resistência a insulina, fatores associados a SM. O presente estudo demonstrou, com a oferta da bebida simbiótica, enriquecida com farinha de inhame e *L. paracasei*, uma melhora significativa na sensibilidade a insulina do grupo obeso CB quando comparado ao obeso SB (Fig. 9B) ao final da 11ª semana. Este resultado pode estar associado ao aumento da produção de AGCC's (ácidos graxos de cadeia curta), subprodutos oriundos da fermentação do probiótico utilizado na bebida simbiótica (*L. paracasei*). Os AGCC's estimulam a liberação de GLP-1 (*glucagon-like peptide*) pelas células intestinais, melhorando a captação de glicose e sensibilidade a insulina.

Aoki e colaboradores (2017) estudaram o efeito das cepas *Bifidobacterium animalis* spp lactis e *B. longum* na prevenção da SM em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e após sete semanas de tratamento verificaram melhora significativa sobre a tolerância a glicose. O presente estudo também verificou uma melhora significativa da tolerância a glicose apresentado na Figura 8, quando comparamos os valores de glicemia da 4ª semana e da 11ª semana, evidenciado pela diminuição da área sob a curva.

Moya-Péres, Neef e Snaz (2015) também identificaram melhora no perfil metabólico de camundongos induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica combinada a administração de probióticos, demonstrando que a modulação da microbiota intestinal melhorou a tolerância a glicose.

Uma dieta hiperlipídica em camundongos altera a integridade da mucosa intestinal, exacerbando a SM por meio da inflamação adiposa (CANI et al., 2009), desta forma a utilização de probióticos na modulação da microbiota intestinal é considerada uma estratégia emergente para o controle do peso corporal e da sensibilidade a insulina (ZANG et al., 2015), o que também foi evidenciado no presente estudo demonstrado pelo aumento da sensibilidade a insulina no grupo de camundongos tratados com a bebida simbiótica (Fig.9B).

A figura 10 apresenta os resultados do perfil lipídico do soro (colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL), dos grupos controle e obesos, após a ingestão da bebida simbiótica.

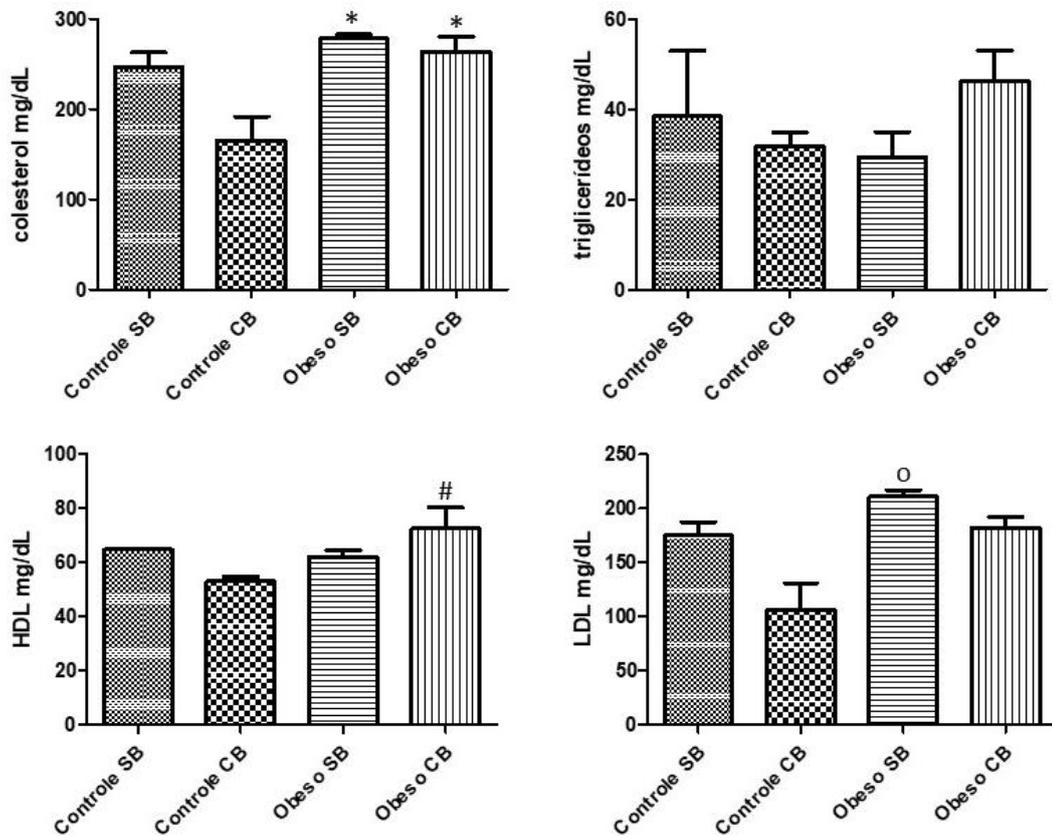


Figura 10. Perfil lipídico dos grupos controle e obesos pós-tratamento. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os obesos e o grupo controle CB para os níveis de colesterol total, (#) indica diferença significativa entre o obeso CB e o controle CB para os níveis de HDL e (o) indica diferença significativa entre obeso SB e controle CB para os níveis de LDL, utilizando-se o teste de Bonferroni.

Quanto aos lipídios séricos os resultados obtidos no presente estudo indicam um aumento significativo no HDL-c do grupo obeso CB, acompanhado de uma redução nos níveis de LDL-c. Entre os efeitos benéficos decorrentes do consumo de probióticos destacam-se: a redução do LDL-c e o aumento do HDL-c (ROSSI, 2001). Em estudo conduzido por Manzoini e colaboradores (2008) somente níveis de HDL-c foram positivamente alterados, quando avaliou perfil lipídico em modelo animal com dieta hiperlipídica utilizando alimentos funcionais. Xiao e colaboradores (2006) investigaram o efeito de um iogurte contendo probiótico nos lipídios séricos em modelo animal e verificaram que após três semanas de

estudo os níveis de LDL-c foram reduzidos. Tanto a redução do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) quanto o aumento do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL) podem resultar em benefício cardiovascular significativo, tanto em termos de redução de eventos como também, em grau variável, lesões ateromatosas. LDL e HDL têm papéis opostos na regulação do colesterol corporal e, em teoria, tanto a redução da deposição (redução de LDL) como o aumento da remoção (aumento de HDL) podem melhorar a doença vascular (SIRTORI; CESARE, 2006).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do suco de maracujá enriquecido com farinha de inhame se mostrou uma boa alternativa para viabilização do *L. paracasei* em bebidas simbióticas de origem vegetal, além de servir como alternativa para indivíduos intolerantes ou alérgicos a componentes lácteos.

A bebida simbiótica mostrou efeito benéfico em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica com melhora da sensibilidade a insulina e na relação HDL/LDL, podendo ser utilizada como adjuvante no tratamento de distúrbios cardio-metabólicos.

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas, 2008.

ABU-FARHA M., BEHBEHANI M. K, ELKUM N. **Comprehensive analysis of circulating adipokines and hsCRP association with cardiovascular disease risk factors and metabolic syndrome in Arabs.** Cardiovasc Diabetol 13:76, 2014.

AGUILAR M.; BHUKET T.; TORRES S.; LIU B.; WONG R. J. **Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003–2012.** JAMA 313:1973–1974, 2015.

ALBERTI, K. G, ZIMMET, P., SHAW, J. **IDF epidemiology task force consensus group. The metabolic syndrome—a new worldwide definition.** Lancet 366:1059–1062. 2005.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. **Disbiose intestinal.** Revista Brasileira de Nutrição Clínica. v. 24, n. 1, p. 58-65. 2009.

ANTUNES, A. E. C. et al. **Probióticos: agentes promotores de saúde.** Nutrire – Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 103-122, dez. 2007.

AOKI R, KAMIKADO K, SUDA W, TAKII H, MIKAMI Y, SUGANUMA N. **A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation.** Scientific Reports. 7: 43522, 2017.

ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E., LE PASLIER D., YAMADA T., MENDE D. R, et al. **Enterotypes of the human gut microbiome.** Nature. 473:174–80, 2011.

ASIEDU, R.S.A. **Crops that feed the World. Yams: Yams for income an foodsecurity.** Food Security, v.2, p. 305-15, 2010

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**, 13^a ed. Washington, 2002.

ATZINGEN, M.C.B.C.V.; SILVA, M.E.M.P. **Inhame na formulação de pão sem glúten / Yam starch in gluten - free Bread.** Nutrire. V. 22 p. 33-48, dez, 2001.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. **Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.3, p.363-366, 1999.

BARBALHO, S. M. et al. **Metabolic syndrome, atherosclerosis and inflammation: an inseparable triad.** *J. vasc. bras. Porto Alegre*, v.14, n.4, p.319-327, Dec.2015.
<http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.04315>.

BAÑOS DE M. G., HAFIDI M., PÉREZ-TORRES E.U., GUARNER V. **Insulin resistance and metabolic syndrome. Insulin resistance: new research.** EUA. 2009. 49-97.

BHATT H, SAFFORD M, GLASSER S. **Fatores de risco e desfechos de cardiopatia coronariana no século XXI: achados das razões para diferenças geográficas e raciais no estudo do acidente vascular encefálico (REGARDS).** *Curr Hypertens Rep.* 2015; 17 (4): 541. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-015-0541-5> . PMid: 25794955.

BONOMINI F, RODELLA LF, REZZANI R. **Síndrome metabólica, envelhecimento e envolvimento do estresse oxidativo.** *Envelhecimento* 2015; 6 (2): 109-20. <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2014.0305>.

BOUCHER J.; KLEINRIDERS A.; KAHN C. R. **Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a009191, 2014.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. **Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/241_rdc.htm. Acesso em 20 de agosto de 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 52, de 07 de novembro de 2011. **Dispões sobre o Regulamento Técnico da Farinha de Mandioca.** Disponível em: sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=497488882. Acesso em 13 março 2017.

BRASIL. Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. **Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.** *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, p. 20, 21 out. 1978

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigitel Brasil 2013: alerta de risco e proteção para doenças crônicas**. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

BROWNAWELL, A.M., CAERS, W., GIBSON, G.R., KENDALL, C.W.C., LEWIS, K.D., RINGEL, Y., & SLAVIN, J.L. **Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals**. *The Journal of Nutrition*. doi: 10.3945/jn.112.158147, 2012.

BUETTNER R, PARHOFER KG, WOENCKHAUS M, WREDE CE, KUNZ-SCHUGHART LA, SCHOÖLMERICH J, et al. **Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types**. *J Mol Endocrinol*. 36:485-501, 2006.

BUSE J. B, POLONSKY K. S, BURANT C. F. **Type 2 diabetes mellitus**. *Endocrinology*. Saunders, Philadelphia, pp 1427–1442, 2003.

CALDER, P.C., KEW, S. **The Immune system: a target for functional foods?** *British Journal of Nutrition*. V.28, suppl.1, p. S165-S176, 2002.

CAMARGO A., MENESES M.E., PÉREZ-MARTINEZ P., et al. **Dietary fat modifies lipid metabolism in the adipose tissue of metabolic syndrome patients**. *Genes Nutr.*, 9, p. 409. 2014.

CANI P. D, AMAR J, IGLESIAS MA, POGGI M, KNAUF C, BASTELICA D. **Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance**. *Diabetes*. 56:1761–72, 2007.

CANI P. D. et al. **Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability**. *Gut* 58, 1091–1103, 2009.

CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F. et al. **Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, p.1123-1128, 2005.

CASTRO, A. V. B. et al. **Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association**. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* São Paulo, v. 58, n. 6, p. 600-610, 2014.

CÉSPEDES, M.; CÁRDENAS, P.; STAFFOLANI, M.; CIAPPINI, M.C.; VINDEROLA, G. **Performance in nondairy drinks of probiotic L. casei strains usually employed in dairy products.** J Food Sci. v. 78, n. 5, p. 56-62, 2013.

CHAMPAGNE, C. P., & GARDNER, N. J. **Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses.** Food Research International. 41, 539–543, 2008.

CHIA-YUAN C.; TZU-MING P. **Anticancer and Antimigration Effects of a Combinatorial Treatment of 5-Fluorouracil and Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 Fermented Skim Milk Extracts on Colorectal Cancer Cells.** J. Agric. Food Chem. 66 (22), 5549-5555. DOI: 10.1021 / acs.jafc.8b01445, 2018.

COFFMAN E, RICHMOND-BRYANT J. **Multiple biomarkers models for better estimation of risk of specific cardiovascular diseases related to the metabolic syndrome: a cross-sectional study.** Popul Health Metr. 2015; 13: 7. PMID: 25788869.

CONRADO, B. Á. et al. **Disbiose Intestinal em idosos e aplicabilidade dos probióticos e prebióticos.** Cadernos UniFOA, Volta Redonda, n. 36, p. 71-78, abr. 2018.

CRUZ, A. G.; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. **Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects.** Trends in Food Science & Technology, v. 20, p. 344 – 354, 2009.

DALZIEL B.; GOSBY A. K.; RICHMAN R. M.; BRYSON J. M.; CATERSON I. D. **Association of the TNF -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity.** Obes Res 10:401–407, 2002.

DENIPOTE F. G.; TRINDADE E. B.; BURINI R. C. **Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer.** Arq Gastroenterol. 47(1):93–98, 2010.

ELLENDERSEN, L. S. N.; GRANATO, D.; GUERGOLETTA, K. B.; WOSIACKI, G. **Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with Lactobacillus casei.** Engineering in Life Sciences. 12(4), 475–485, 2012.

EMBRAPA. **A cultura do maracujá.** Ed. Texto novo. 76p. 1994.

EMBRAPA. **Maracujá.** Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa_culturas_pesquisadas_maracuja.php&menu. Acesso em: 13 jul 2015.

FAGUNDES, G. E. **Prevalência de sinais e sintomas de disbiose intestinal em estudantes do curso de nutrição da universidade do extremo sul catarinense.** Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, 2010. p. 43. Monografia (TCC).

FAITH J. J., MCNULTY N. P., REY F. E., GORDON J. L. **Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice.** Science. 333:101–4, 2011.

FAO. **ECOCROP.** *Dioscorea cayenensis.* Disponível em: < <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=5369>> acesso em: 12 jun 2015.

FARNWORTH, E.R. **The evidence to support health claims for probiotics.** Journal of Nutrition, v. 138, p. 1250S-1254S, 2008.

FISMAN E. Z.; TENENBAUM A. **Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease?** Cardiovasc Diabetol 13:103, 2014.

FOOKS L. J.; GIBSON G. R. **Probiotics as modulators of the gut flora.** Br J Nutr. 88(1): S39–S49, 2002.

FOSTER-POWELL, K.; HOLT, S. H. A.; BRANDMILLER, J. C. **International table of glycemic index and glycemic load values: 2002.** The American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v. 76, n. 1, p. 5-56, jul, 2002.

FRALOUB J. C, OGG-DIAMANTINO R, FERNANDES-SANTOS C, AGUILA M. B, MANDARIM-DE-LACERDA C. A. **A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in c57bl/6 mice fed a high fat diet.** J Clin Biochem Nutr. 46(3):1-12, 2010.

FRIEDEWALD W. T.; LEVI R. I.; FREDRICKSON D. S. **Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge.** Clin. Chem. 18:499-502, 1972.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, Rev. 2009.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Global consensus definition of metabolic syndrome**. Bruxelas: IDF; 2005.<https://www.idf.org/webdata/docs/IDF.pdf>.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 8ª Ed. Bruxelas: IDF; 2017.<https://www.idf.org/webdata/docs/IDF.pdf>.

GALLOU-KABANI C. L.; VIGÉ A, GROSS MS, RABÈS JP, BOILEAU C, LARUE-ACHAGIOTIS C, TOMÉ D, JAIS JP, JUNIEN C. **C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome**. Obesity. 15(8):1996-2005, 2007.

GANHOU K. B.; CHANG H.J.; NIINUMA H. et al. **Associação inversa entre obesidade central e rigidez arterial em indivíduos coreanos com síndrome metabólica: estudo de coorte transversal**. Diabetol Metab Syndr. 7:3. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-7-3>, 2015.

GARCIA E. F.; LUCIANO W. A.; XAVIER D. E.; DA COSTA W. C. A.; DE SOUSA OLIVEIRA K.; FRANCO O. L.; DE MORAIS JUNIOR M. A.; LUCENA B. T. L.; PICÃO R. C.; MAGNANI M.; SAARELA M.; DE SOUZA E. L. **Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected Lactobacillus Strains**. Front. Microbiol. 7:1371. doi: 10.3389/fmicb.2016.01371, 2016.

GASTALDELLI A.; GAGGINI M.; DEFRONZO R. A. **Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the San Antonio metabolism study**. Diabetes 66:815–822, 2017.

GIL A.; BENGMARK S. **Control biológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos**. Nutrición Hospitalaria. 2006; 21:73–86.

GINSBERG H. N, ZHANG Y. L, HERNANDEZ-ONO A. **Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes**. Arch Med Res 36:232–240, 2005.

GIUGLIANO D, CERIELLO A, ESPOSITO K. **The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome**. J. Am. Coll. Cardiol.;48: 677–85. 2006.

GOLDENBERG, R.; PUNTHAKEE, Z. **Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes, and metabolic syndrome.** *Can. J. Diabetes* 2013, 37, S8–S11.

GRUNDY SM, BREWER B, CLEEMAN JI, et al. **definition of metabolic syndrome.** *Circulation.* 109:433-8. 2004.

GRUNDY S. M. **Pandemia da síndrome metabólica.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 629–663. 2008.

GUARNER V., CARBÓ R., RUBIO M.I.M, BAÑOS DE M. G. **Envelhecimento do sistema cardiovascular.** *Hipertensão: nova pesquisa. EUA.* 2005. 47-68.

GUARNER V, RUBIO-RUIZ MIM, PEREZ-TORRES E.U, BAÑOS DE M. G. **Relationship between aging and sex hormones to metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Exp Gerontol.* 2011. 46: 517-523.

GUIZE L., THOMAS F., PANNIER B., BEAN K., JEGO B., BENETOS A. **All-cause mortality associated with specific combinations of the metabolic syndrome according to recent definitions.** *Diabetes Care,* 30: 2381–2387, 2007.

HAFFNER S.; TAEGTMEYER H. **Epidemic obesity and the metabolic syndrome.** *Circulation.* 108: 1541–1545, 2003.

HUNG J.; MCQUILLAN B. M.; CHAPMAN C. M. L.; THOMPSON P. L.; BEILBY J. P. **Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1268-73, 2005.

IJUN T., TAKENAWA T. **Regulation of insulin signaling by the phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate phosphatase SKIP through the scaffolding function of Pak1.** *J Mol Cell Biol* 32:3570–3584, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos,** 1ª ed. Imprensa. São Paulo, 2008.

KATZMARYK P.T.; LEON A.S., WILMORE J.H., SKINNER J.S., RAO D.C., RANKINEN T. **Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the heritage family study.** *Medial Sci Sports Exerc.;* 35(10): 1703–9, 2003.

KLAYRAUNG, S., VIERNSTEIN, H., & OKONOJI, S. **Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability.** International Journal of Pharmaceutics. 370(1/2), 54-60, 2009.

KUK J. L.; ARDERN C. I. **Age and sex differences in the clustering of metabolic syndrome factors: association with mortality risk.** Diabetes Care 33:2457–2461, 2010.

KAUR, J. **A comprehensive review on metabolic syndrome.** Cardiol Res Pract 2014:943162, 2014.

KRAMMER, H.J., VON SEGGERN, H., SCHAUMBURG, J., NEUMER, F. **Effect of Lactobacillus casei Shirota on colonic transit time in patients with chronic constipation.** Coloproctology. 33:109–113, 2011.

KYLIN, E. **Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyca “mie-Hyperurika” miesyndrom.** Zentralblatt fuer Innere Medizin 44:105–127, 1923.

LAKKA HM, LAAKSONEN DE, LAKKA TA, et al. **The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men.** JAMA. 2002; 288:2709-16.

LECERF, M.J. **Prébiotiques, flore intestinale, inflammation, obésité.** Phytothérapie 9: 106–112. 2011.

LEONEL, M., MISCHAN, M.M., PINHO, S.Z., IATAURO, R.A., DUARTE-FILHO, J. **Efeitos de parâmetros de extrusão nas propriedades físicas de produtos expandidos de inhame.** Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas, V.26, n.2, p. 459-464, Abr/Jun. 2006

LIMA, J.A. **Potencialidades de industrialização do Inhame e do Taro no Brasil.** In: Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do aro. 2, 2002, João Pessoa. Anais. EMEPA-PB, 2002 p.275-303

LISERRE, A. M., FRANCO, B. D. G. M., RÉ, M. I. **Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions.** Food Biotechnology. 21, 1-16, 2007.

LOPES DE OLIVEIRA, J.; ALMEIDA, C.; BOMFIM, N. S. **A importância do uso de probióticos na saúde humana.** Unoesc & Ciência – ACBS. v. 8, n. 1, p. 7-12, jun. 2017.

- LUCKOW, T., DELAHUNTY, C. **Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients.** Food Research International. 37, 805-814, 2004.
- LUCKOW T., SHEEHAN V., FITZGERALD G., DELAHUNTY C. **Exposure, health information and flavor-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice.** Appetite. 47(3), 315-23, 2006.
- MANZONI, M. S. J. et al. **Fermented soy product 38. supplemented with isoflavones affects adipose tissue in a regional-specific manner and improves HDL cholesterol in rats fed on a cholesterol-enriched diet.** Eur. Food Res. Technol., v. 227, n. 6, p. 1591-1597, 2008.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. **Technological challenges for future probiotic foods.** International Dairy Journal, v.12, p. 173-182, 2002.
- MCCLEARY, B. V.; MURPHY, A.; MUGFORD, D. C. **Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study.** J. AOAC Int. 2000 Mar-Apr; 83(2):356-64.
- MEILGAARD, M. ; CIVILLE, G. ; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques.** London: CRC. PRESS, Inc., 2. 281, 1988.
- MOHAMMADI, M. ; GOZASHTI M. H. ; AGHADAVOOD M. ; MEHDIZADEH M. R. ; HAYATBAKHSI, M. M. **Clinical significance of serum IL-6 and TNF- α levels in patients with metabolic syndrome.** Rep Biochem Mol Biol 6:74–79, 2017.
- MOORTHY, S. N. **Potentialities of tropical root starches in food applications.** Proceeding, Tsukuba, p. 36, 2002.
- MOROTI, C. et al. **Potencial da Utilização de Alimentos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Redução de Colesterol Sanguíneo e Glicemia.** Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 11, n. 4, p. 63-67. 2009.
- MOYA-PÉRES A.; NEEF A.; SNAZ Y. **Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice.** PloS One. 10(7), 2015.

NAIMI M, GAUTIER N, CHAUSSADE C, VALVERDE AM, ACCILI D, VAN OBBERGHEN E. **Nuclear forkhead box O1 controls and integrates key signaling pathways in hepatocytes.** *Endocrinology* 148:2424–2434, 2007.

NAVARRO-GONZÁLEZ JF, MORA-FERNÁNDEZ C. **The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 19:433–442, 2008.

NUNN A.V, BELL J.D, GUY G.W. **Lifestyle-induced metabolic inflexibility and accelerated ageing syndrome: insulin resistance.** *Nutr Metab.* 6: 16, 2009.

O'NEILL S.; O'DRISCOL L. **Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies.** *Obes Rev* 16:1–12, 2015

O'TOOLE, P. W.; COONEY, J. C. **Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota.** *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2008, Article ID 175285, 2008.

PARK J.; FLOCH, M. H. **Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease.** *Gastroenterol Clin North Am.* 36(1):47–63, 2007.

PEREIRA, A. L. F., MACIEL, T. C., RODRIGUES, S. **Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*.** *Food Research International.* 44, 1276–1283, 2011.

PICCHI, A., GAO, X., BELMADANI, S., POTTER B. J., FOCARDI M., CHILIAN, W. M. **Tumor necrosis factor alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome.** *Circ Res* 99:69–77, 2006.

PIMENTEL, T. C. **Probióticos a Benefícios à Saúde.** *Revista Saúde e Pesquisa, Maringá*, v. 4, n. 1, p. 101-107, jan./ abr. 2011.

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. **Trends in non-dairy probiotic beverages.** *Food Research International*, v. 41, p. 111-123, 2008.

PRIETO, I. et al. **Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome.** *PLoS One.* v.13(1); 2018.

PUCCI G.; ALCIDI R.; TAP L.; BATTISTA F.; MATTACE-RASO F.; SCHILLACI PUCCI G. **Sex and gender related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: a review of the literature.** *Pharmacol Res* 120:34–42, 2017.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; FILHO, A.D.R. **Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano.** *Revista Ciência & Saúde*, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

REAVEN, G. M. **Role of insulin resistance in human disease.** *Diabetes* 37:1595–1607, 1988.

RENUKA, B., KULKARNI, P., PRAPULLA, S.G. **Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics.** *LWT – Food Science and Technology*, 42 (5), 1031-1033, 2008.

REXRODE K.M., PRADHAN A., MANSOS J.E., BURING J.E., RIDKER P.M. **Relationship of total and abdominal adiposity with crp and il-6 in women.** *Ann Epidemiol.* 2003; 13:1-9.

RIGBY N. **Eating and Obesity - The New Global Disorder.** *Nutrients* 2013; 5 (10): 4206-10. <http://dx.doi.org/10.3390/nu5104206>.

ROSSI, E.A. **Alimentos funcionais.** In: DAMASO, A. 47. *Nutrição e exercícios na prevenção de doenças.* Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.337-362.

SACRAMENTO, C. K.; MOURA, J. I. L.; COELHO JÚNIOR, E. **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas.** Brasília , DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. P. 95-132.

SEGARRA AB, RUIZ-SANZ JI, RUIZ-LARREA MB, RAMÍREZ-SÁNCHEZ M, DE GASPARO M, BANEGAS I, et al. **The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities.** *Horm Metab Res.* 2011.

SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. **Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.3, 2008.

SAHAF B., HEYDARI K., HERZENBERG L.A., HERZENBERG L.A. **The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects.** Arch Biochem Biophys. 2005; 434: 26–32.

SANTOS, E.S. dos. **Inhame (*Dioscorea* sp.): aspectos básicos da cultura.** João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158 p.

SANTOS, F. F., ALMEIDA, M. A., BRUMANO, L. P., PEREIRA, M. S., STRINGHETA, P. C., PINTO, M. A. O. **Elaboração do relatório técnico-científico para registro de leites fermentados com alegação de propriedade funcional.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Nov/Dez, 383(66), 40-48, 2011.

SANTOS, T. T; VARAVALLO, M. A. A. **Importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal.** Revista Científica do ITPAC, v. 4, n. 1. P. 40-49, 2011.

SARON, M.L.G.; SGARBIERI, V.C.; LERAYER, A.L.S. **Prebióticos: efeitos benéficos à saúde humana.** Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr., v. 30, p. 117-130, dez. 2005.

SCARPELLINI, E., CAMPANALE, M., LEONE, D., PURCHIARONI, F., VITALE, G., LAURITANO, E.C., GASBARRINI, A. **Gut microbiota and obesity.** Intern Emerg Med. 5 (Suppl 1):S53–S56, 2010.

SCHMIDT, F.L.; PEREIRA, K.S. **O potencial dos probióticos e prebióticos em bebidas de origem vegetal.** In: Saad, S.M.I; Cruz, A.G; FARIA, J.A.F. Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo, Varela, 2011.

SCHWARCZ J. **Uma maçã por dia: mitos e verdades sobre os alimentos que comemos.** Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed.,2008. p.135

SCOTT KP, GRATZ SW, SHERIDAN PO, FLINT HJ, DUNCAN SH. **The influence of diet on the gut microbiota.** Pharmacol Res. 69:52–60, 2013.

SENEFF S., G. WAINWRIGHT, L. **MascielliIs the metabolic syndrome caused by a high fructose, and relatively low fat, low cholesterol diet?** Arch Med. Sci, 1, pp. 8-20, 2011.

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. **Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices.** Innovative Food Science and Emerging Technologies. v. 8, p. 279-284, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDOS DA OBESIDADE. **I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica.** Arq Bras Cardiol. 2005; 84 (Supl 1): 1-28.

SOCOL, C.R.; PRADO, F.C.; PARADA, J.L. **Technological process to produce a coconut fermented beverage with probiotic properties.** 2007. BR patent PI0703244-7

STECKHAN N. et al. **Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis.** Nutrition, 32. 338–348. 2016.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). NEPA UNICAMP. Versão III. 2. ed. Campinas, SP, 2011.

TIMÓTEO A. T. **Diet in patients with metabolic syndrome: what is the ideal macronutrient composition?** pii: S0870-2551(17)30834-X. Rev. Port. Cardiol. 2018.

USAMI M, et al. **Effects of perioperative synbiotic treatment on infectious complications, intestinal integrity, and fecal flora and organic acids in hepatic surgery with or without cirrhosis.** JPEN J Parenter Enteral Nutr. 35(3):317–328, 2011.

USDA. **Plants Profile.** *Dioscorea cayenensis* Lam. **yellow guinea yam.** Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=DICA25&mapType=nativity&photoID=>> acesso em : 12 jun 2013.

USMAN S., JAFRI A. S. **Insulin resistance study in diabetes mellitus type II and its correlation with obesity.** Am J Life Sci 2:96–102, 2014.

UZUNLULU M., TELCI C. O., OGUZ A. **Association between metabolic syndrome and cancer.** Ann Nutr Metab 68:173–179. 2016.

VANDENPLAS, Y., BENNINGA, Y. **Probiotics and Functional Gastrointestinal Disorders in Children.** Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 48:S107–S109. 2009.

VAGUE, J. **Sexual differentiation. A factor affecting the forms of obesity.** Presse Med 30:S39–S40, 1947.

VARALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. **Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, jan./jun. 2008

VENTURA, I., FONTOURA, PSG. **Obtenção e caracterização da farinha de inhame Colocasia esculenta (L.) Schott. B. Ceppa,** Curitiba, V.12, n.1, p 25-32, jan/jun 1994.

VIKRAM, N. K., BHATT, S. P., BHUSHAN B. **Associations of -308G/A polymorphism of tumor necrosis factor (TNF)- α gene and serum TNF- α levels with measures of obesity, intra-abdominal and subcutaneous abdominal fat, subclinical inflammation and insulin resistance in Asian Indians in North India.** Dis Markers 31:39–46, 2011.

WEISS R., BREMER A. A., LUSTIG R. H. **What is metabolic syndrome, and why are children getting it?** Ann N Y Acad Sci 1281:123–140. 2013.

WEN, J., YANG, J., SHI, Y. **Comparisons of different metabolic syndrome definitions and associations with coronary heart disease, stroke, and peripheral arterial disease in a rural Chinese population.** PLoS One 10:e0126832, 2015.

WILLIAN, M., MABEL, A., ALBERTO, B. **Probióticos, Prebióticos y Simbióticos en pacientes críticos.** Revista Brasileira de Nutrição Clínica. 21:155–162, 2006.

WISSE, B. E. **The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity.** J Am Soc Nephrol 15:2792–2800, 2004.

WHITE, P. A. S. et al. **Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose.** Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 339-345, 2013.

WOTING, A.; BLAUT, M. **The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease.** Nutrients. 8(4): 202. doi: 10.3390/nu8040202, 2016.

XIAO, J.Z. et al. **Effects of milk products fermented 61. by bifi dobacterium longum on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers.** J. Dairy Sci., v. 86, p.2452-2461, 2003.

YAMAUCHI T, NIO Y, MAKI T, KOBAYASHI M, TAKAZAWA T, IWABU M. **Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.** *Nat Med* 13:332–339, 2007.

YOON MJ, LEE GY, CHUNG JJ, AHN YH, HONG SH, KIM JB. **Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator activated receptor alpha.** *Diabetes* 55:2562–2570, 2006.

ZAFAR, U., KHALIQ, S., AHMAD, HU et al. **Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links.** *Hormônios* 17: 299. <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s42000-018-0051-3>, 2018.

ZAMBON S.; ZANONI S.; ROMANATO G., CORTI M.C., NOALE M., SARTORI L. **Metabolic syndrome and all-cause and cardiovascular mortality in an Italian elderly population: the Progetto Veneto Anziani study.** *Diabetes Care.* 2009. 32: 153–159.

ZHANG X. et al. **Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats.** *Sci. Rep.* 5, 2015.

ZOPPI, G., CINQUETTI, M., BENINI, A., BONAMINI, E., MINELLI, E.B. **Modulation of the intestinal ecosystem by probiotics and lactulose in children during treatment with ceftriaxone.** *Current Therapeutic Research Clinical and Experimental.* Vol. 62, No. 5, Maio 2001.

ANEXO

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2018 006778 8**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de** BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME**Utilidade (54):**

Resumo: “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”. A presente patente de invenção se refere a uma bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame, com atividade antioxidante e de manutenção da microbiota intestinal, isenta de colesterol e rica em vitaminas e minerais. O processo de obtenção da bebida envolve a obtenção da farinha de inhame, a obtenção de suco de fruta tropical, ativação e viabilidade da cepa probiótica e obtenção da bebida vegetal probiótica. A bebida vegetal foi caracterizada em sua composição centesimal e microbiológica apresentando os seguintes resultados: umidade - 3,28; cinzas - 4,51; proteína - 8,55; lipídeo - 0,59; Carboidrato - 81,50; fibra alimentar total - 10,4; amido - 75,1; açúcares totais e redutores - traços; valor calórico total - 365,51; pH - 5,83 e acidez - 2,19. Os resultados da análise microbiológica da farinha nos tempos de armazenamento 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 apresentaram-se da seguinte maneira: Coliformes a 45°C/NMP/g - < 0,03 em todos os tempos avaliados; Bolores e leveduras UFC/g - < 10 em todos os tempos; estafilococos coagulase positiva/g - negativo em todos os tempos; Salmonella sp/25g - Ausência em todos os tempos; Bacillus cereus/g - negativo em todos os tempos avaliados. A bebida apresentou os seguintes parâmetros físico-químicos e microbiológicos: A análise microbiológica foi realizada para Coliformes a 45 °C/NMP/g e Salmonella sp, nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias pós fermentação, afim de verificar a estabilidade biológica da bebida. No que diz respeito a composição centesimal os resultados apresentaram-se da seguinte forma em g/100g: umidade - 91,83; cinzas - 0,16; proteína - 0,33; lipídeo - 0,26, carboidrato - 7,21; fibra alimentar total - 2,45 e valor calórico total - 32,5. Os resultados para as análises microbiológicas foram de ausência para Coliformes a 45 °C e para Salmonella sp em todos os tempos avaliados. No teste sensorial apresentou os seguintes resultados para o Índice de Aceitabilidade (IA%): aparência - 70; qualidade global - 71,83; cor - 75,21; sabor - 73,57 e odor - 72,39. Para o teste de sobrevivência a fluidos simulados do trato gastrointestinal, a bactéria mostrou-se adaptado à bebida e condições extremas que foram submetidas durante as simulações. Por fim, esta bebida vegetal probiótica pode ser consumida por vegetarianos e indivíduos intolerantes ou alérgicos a componentes lácteos.

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200 200.pdf Portaria	Comprovante de Pagamento GR Portaria Coordenador NIT 3.pdf
Procuração	Procuracao UFPB.pdf
Procuração	Procuração UPE.pdf
Relatório Descritivo	1. Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	2. Reivindicações.pdf
Resumo	3. Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético

Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

“BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção está inserida no campo da ciência e tecnologia de alimentos. A presente invenção se refere a uma bebida vegetal simbiótica enriquecida com farinha de inhame, com atividade antioxidante, manutenção da microbiota intestinal, isenta de colesterol e rica em vitaminas e minerais.

Antecedentes da Invenção

[002] A busca atual pela saúde e bem-estar envolve uma série de questões holísticas e a nutrição ocupa parte importante neste cenário. A redução do risco de doenças aliada a uma qualidade de vida aponta cada dia mais para uma alimentação saudável e equilibrada, embasados numa vasta ciência que ao longo do seu desenvolvimento evidencia mais fortemente a necessidade do consumo de alimentos *in natura* em detrimento daqueles industrializados. Novas demandas à indústria de alimentos têm surgido, entre elas, as necessidades de populações específicas como vegetarianos, intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite e pessoas que sentem desconforto ao consumir produtos lácteos. Diante disso, novos produtos, que contemplem esta demanda precisam ser desenvolvidos, como por exemplo, fórmulas de bebidas e produtos fermentados por probióticos que não utilizam o leite como base de suas formulações, apresentam-se como alternativas em potencial. Têm-se utilizado tanto para alimentos de origem vegetal como grãos, leguminosas e sementes, assim como as frutas (CÉSPEDES M et al., J Food Sci. 78: 756-62, 2013).

[003] A crescente busca pela implementação de alimentos funcionais na alimentação humana, em particular os probióticos, justifica-se pela gama de benefícios trazidos ao consumidor, dentre os quais podemos citar a prevenção da disbiose (ZOPPI et al., Cur Th R Clin Exp 62(5): 418-435, 2001), a diminuição dos quadros de constipação e diarreia (SCARPELLINI, E et al., Inter Emerg Med 5(1): S53-S56, 2010; KRAMMER, H.J et al.

Coloproctol 33: 109-113, 2011), além dos benefícios imunológicos (CALDER, P.C., & KEW, S. B J Nut 28(1): 165-S176, 2002) e mais recentemente hipotetizado na prevenção da obesidade (SCARPELLINI, E et al., Inter Emerg Med 5(1): S53-S56, 2010; LECERF, M.J. Phytotherp 9: 106-112, 2011), um atual problema de saúde pública.

[004] Os probióticos são bactérias que promovem a saúde e são conhecidos pela sua característica de competir com bactérias patogênicas, como membros da família Enterobacteriaceae e Clostridium difficile e principalmente bactérias dos gêneros Lactobacillus e Bifidobacterium. São ainda capazes de combater gastroenterites e outros distúrbios gastrointestinais, de estimular a resposta do sistema imune e de melhorar absorção de minerais (CHALUVADI, S. et al. Beneficial Microbes 3(3): 175–187, 2012).

[005] O uso de cepas probióticas deve ter um respaldo científico, higiênico e tecnológico (FARNWORTH, E.R. J Nut 138: 1250S-1254S, 2008), caso do gênero Lactobacillus que é considerado GRAS (generally reconized as safe) e em especial o Lactobacillus paracasei que tem sido amplamente estudado para emprego em alimentos industrializados e vem se mostrando viável na produção de bebidas vegetais (SHEEHAN, V et al., Innovat F Sci Emerg Technol 8(2): 279–284, 2007).

[006] Os probiótico com alegação de propriedade funcional aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei variedade rhamnosus*, *Lactobacillus casei variedade defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

[007] O espectro das atividades dos probiótico incluem efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos. Três formas de ação dos probióticos são descritas: 1. Supressão de bactérias viáveis: acredita-se que os micro-organismos probióticos sejam capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana, o que suprimiria o número de micro-organismos patogênicos viáveis além de facilitar a competição por nutrientes e por sítios de adesão. 2. Alteração do metabolismo microbiano: esta ação se daria pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. 3. Estímulo da imunidade do hospedeiro: através do estímulo ao aumento dos anticorpos e da atividade dos macrófagos (SAAD, S.M.I. Rev Bras Cienc Farm 42:1, 2006).

[008] Recentemente, as bactérias probióticas foram estudadas como um método potencial para prevenir doenças infecciosas oportunistas devido à sua capacidade de estimular o sistema imunológico (WICKENS et al., *Infect Immun* 79(4): 1546 – 58, 2008), várias cepas de *Lactobacillus* foram investigadas como potenciais bactérias probióticas capazes de inibir a virulência de agentes patogênicos e estimular o sistema imunológico (AOUDIA N et al., *Food Microbiol* 53: 51 – 9, 2016). Alguns estudos demonstraram que *Lactobacillus* pode interagir com células de *Candida* em biofilmes mistos e inibir o crescimento de *C. albicans* (MATSUBARA VH et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 100(14):6415–26, 2016). Além disso, outros estudos demonstraram que diferentes cepas de lactobacilos podem modular as respostas inatas e adaptativas do sistema imunológico, impedindo a iniciação e a progressão das células cancerosas (ABEDIN-DO A et al., *Immuno* 7(12):1307–29, 2015). Outros estudos mostraram que certas cepas de lactobacilos eram capazes de modular a expressão de vários genes envolvidos na regulação do sistema imune (GROUNTA A et al., *PLoS One* 11(9):e0161263, 2016).

[009] Apesar dos benefícios da inserção de alimentos probióticos na alimentação, sua aplicação prática não tem se concretizado de forma homogênea, uma vez que indivíduos com intolerância ou alergia ao leite, com restrições no consumo de colesterol ou mesmo vegetarianos acabam por não fazer uso desses alimentos, haja vista ser o leite o principal veículo desses micro-organismos benéficos e a adição de culturas probióticas em produtos não-lácteos ser ainda um grande desafio (PRADO, F.C et al., *Food Res Int* 41(2): 111-123, 2008).

[010] O inhame (*Dioscorea sp.*) é uma amilácea bastante cultivada, sendo produzido a mais de 2000 anos em regiões de clima tropical e subtropical. Existem cerca de 600 espécies do tubérculo, é uma planta de constituição herbácea, trepadeira, da família das Dioscoreáceas e produtora de rizóforos alimentícios de alto valor energético e nutritivo, tendo larga aceitação pelas diversas camadas da sociedade brasileira (OLIVEIRA, E.J et al., *Rev Bras Frut* 35(2): 485-492, 2013). No mundo a área cultivada é de mais de um milhão de hectares, entretanto, no Brasil o inhame é uma cultura de pequenos produtores, utilizada no consumo direto LEONEL, M. et al., *Cienc Tecnol Alim* 26(2): 459-464, 2006). É conhecido mundialmente como “Yellow Guinea Yam” ou “Twelve months yam”, mas no Brasil é denominado Inhame-da-Costa, Cará-da-costa ou simplesmente Inhame, como é mais

conhecido na região Nordeste. A planta é comumente utilizada na forma cozida, assada ou no preparo de saladas.

[011] Estudos remotos e atuais evidenciam que o inhame é uma excelente matéria prima, tanto sob aspectos nutricionais, sendo considerado um tubérculo de qualidade superior quando comparado aos demais, quanto como matéria prima promissora no emprego industrial (KIM S.H. et al., J Dairy Sci 94(4): 1705-12, 2011; SHITTU T.A. & OLAITAN O.F J Food Sci Technol 51(2): 359-64, 2014) e ainda como alimento funcional.

[012] Evidências reportam a dioscorina, uma proteína de estocagem presente no IN, como componente funcional com atividade imunomoduladora (HOOKER E. I J Toxicol 23: 49-54, 2004; JHENG Y.J et al., Protein Express Purific 85(1): 77-85, 2012). Estudo de LIN P.L. et al., J Agricult Food Chem 10(11): 4606-13, 2009), investigando a ação da dioscorina extraída de diferentes espécies de IN (*Dioscorea alata* e *Dioscorea japonica*) sobre as atividades do sistema imunológico de ratos, evidenciaram que as dioscorinas de ambas as espécies levaram ao aumento da fagocitose de células RAW 264.7, sendo melhor para a *D. alata*. O aumento da proliferação de células linfóides também foi evidenciado, entretanto a *D. japonica* apresentou maior capacidade de estimulação que a *D. alata*. Testes in vivo após ingestão do IN evidenciaram um efeito modulador tanto à nível de mucosa, quanto sistêmico (LIU Y.H. et al., J Agricult Food Chem 14(19): 9274-9, 2009).

[013] O efeito antioxidante do IN também tem sido associado à presença de flavonóides em sua composição. Alguns estudos observaram se a fração rica em flavonóides (FRF) do *Dioscorea bulbifera* Linn. era capaz de exercer efeito protetor em ratos frente à agressão provocada pelo isoproterenol (ISO), fármaco usado como modelo para indução de infarto do miocárdio (IM). Os resultados do estudo evidenciaram que a administração da FRF na proporção de 150mg/kg, 35 dias antes da agressão com o ISO, foi eficiente na modulação da peroxidação lipídica provocada pelo IM, diminuindo os radicais livres e melhorando o status das enzimas mitocondriais de energia, sugerindo um forte efeito protetor da FRF do IN contra danos cardiovasculares (JAYACHANDRAN KS et al., Current Pharm Biotechnol 11(8): 887-94, 2010).

[014] O desenvolvimento de produtos alimentícios tendo como base raízes tropicais, de tradição de cultivo e apelo cultural como o inhame, tem obtido o interesse dos produtores rurais e industriais, pois possibilita o incremento de toda a cadeia produtiva,

sendo importante para o fortalecimento da sustentabilidade. A utilização da farinha do inhame tem se revelado viável para o desenvolvimento de produtos para fins especiais como a doença celíaca, uma vez que não possui glúten (ATZINGEN, M.C.B.C.V. & SILVA, M.E.M.P. *Nutrire* 22:33-48, 2001), além de atribuir outras propriedades nutricionais e funcionais, pelo seu teor de minerais e vitaminas, assim como pelo seu conteúdo de fitoquímicos, como antocianinas, saponinas e polifenóis, além do teor de fibras.

[015] Ainda que pouco estudada, a farinha do inhame tem se revelado promissora para o desenvolvimento de produtos para fins especiais, caso da doença celíaca, uma vez que não possui glúten (ATZINGEN, M.C.B.C.V. & SILVA, M.E.M.P. *Nutrire* 22:33-48, 2001), para o aumento do teor de fibras de preparações devido a sua composição química (ZÁRATE, N.A.H.; & VIEIRA, M.C. *Pesq Agropec Trop* 34(1):61-63, 2006) e ainda para conferir propriedades funcionais aos produtos (JHENG Y.J et al., *Protein Express Purific* 85(1): 77-85, 2012).

[016] Segundo a Food and Agriculture Organization, o maracujá é reconhecido popularmente por apresentar propriedades calmantes. O fruto maduro é consumido principalmente na forma de suco, entretanto é um fruto bastante usado para confecção de compotas e geleias. A fruta é bastante apreciada devido ao seu sabor e aroma agradáveis, além de ser uma boa fonte de vitaminas A e C. O Brasil é o principal produtor e consumidor da fruta, o aroma e a acidez são muito pronunciados, o pH varia de 2,8 a 3,3, e é amplamente aceito e comumente usados em sucos, engarrafamentos e fabricação de iogurte.

[017] Somado ao anteriormente exposto, atualmente a escolha alimentar transpôs a barreira do sabor e aceitabilidade. Com o avanço científico-tecnológico e com a constatação de benefícios à saúde trazidos por determinados grupos de alimentos, os consumidores têm feito de suas escolhas um estilo de vida em prol da saúde e bem-estar (KANMANI et al., *ECOCROP* 1: 5369, 2013). Diante desta nova perspectiva a biotecnologia tem se ocupado em desenvolver produtos que possuam além das características básicas da nutrição, como a presença de macro e micronutrientes, propriedades funcionais para a prevenção ou tratamento de acometimentos à saúde, inibindo a instalação de algumas doenças, como a obesidade (MEIRA, S.M et al., *J Dairy Res* 79(1):119-27, 2012).

[018] Alguns autores relatam a realização de experimentos para elaboração de bebida probiótica à base vegetal, como com suco de abacaxi (SHEEHAN, V et al., *Innovat Food Sci Emerg Technol* 8(2): 279–284, 2008), de laranja (LUCKOW, T et al., *Appetite* 47(3): 315-23, 2006), de beterraba, tomate e cenoura (PRADO, F.C et al., *Food Res Int* 41(2): 111-123, 2008). Os autores relatam que esta nova classe de produtos seria o futuro dos alimentos probióticos, apesar dos maiores desafios tecnológicos encontrados.

[019] Alguns documentos de patente já utilizaram o *L. paracasei*, a exemplo da patente US6835376, que descreve o uso de *L. paracasei* para preparação de um suporte ingerível e uma composição contendo o mesmo na prevenção de diarreia provocada por bactéria patogênica.

[020] A patente BR112016023754-4 refere-se ao uso de *L. paracasei* para manter ou aumentar a diversidade da microbiota intestinal em um indivíduo que tem disbiose.

[021] A patente ES2320920T3 refere-se a um iogurte probiótico, a um método para o referido produto e ainda ao uso de bactérias ácido lácticas, uma delas o *L. paracasei*.

[022] A patente PI0501200-7 se relaciona com o processo para obtenção de bebida energética a base de água de coco e suco de maracujá e mel.

[023] A patente PI0703244-7 se relaciona com o processo tecnológico para produção de uma bebida fermentada a base de água de coco com propriedades probióticas.

[024] A presente patente de invenção difere das acima citadas por tratar do desenvolvimento de uma bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame, o micro-organismo utilizado é o *Lactobacillus paracasei*, e a fruta o maracujá.

[025] A presente invenção apresenta a vantagem pela possibilidade de ser utilizada por grupos populacionais como os vegetarianos e indivíduos intolerantes ou alérgicos a componentes lácteos, por não apresentar nos seus constituintes derivados lácteos. Como observado no estado da técnica pelos documentos de patente aqui apresentados, ela se apresenta como nova e, portanto, é passível de proteção.

Descrição da Invenção

[026] A presente invenção se refere a uma bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame, com atividade antioxidante, manutenção da microbiota intestinal, isenta de colesterol e rica em vitaminas e minerais. O processo de obtenção da bebida é melhor compreendido nas seguintes modalidades: i. Processo de obtenção da farinha de inhame; ii. Processo de obtenção da polpa de maracujá; iii. Processo de obtenção da bebida vegetal; iv. Processo de ativação e viabilidade da cepa probiótica; e v. Processo de obtenção da bebida vegetal probiótica.

[027] Na primeira modalidade, é descrito o processo de obtenção da farinha de inhame que consiste nas seguintes etapas: seleção, lavagem, sanitização, descascamento, fatiamento, resfriamento, branqueamento, secagem, trituração, pulverização, tamização e armazenamento. Após seleção, os tubérculos foram pesados, medidos e então submetidos à lavagem com abrasão em água corrente com o intuito de retirar as sujidades. Seguiram pelo processo de sanitização e então descascados. Após fatiamento (1-2 mm) e resfriamento (10-12 °C), as fatias foram branqueadas em água à 90-95 °C preferencialmente por 3 minutos e seguiram pelos processos de secagem preferencial a 70 °C por 4 horas, trituração e pulverização em moinho a uma velocidade de 17.000-19.000 rpm para uma maior agilidade no processo, esta velocidade pode ser diminuída a rotações menores como 1750 rpm que o efeito será o mesmo, sabendo-se que o tempo de obtenção será mais longo. A tamização foi realizada em peneiras com abertura preferencial das malhas a 80 mesh (0,177mm) acopladas a um vibrador e agitadas. As farinhas foram então armazenadas. Esta granulometria se faz necessária para que não exista interferência sensorial na bebida pronta para o consumo.

[028] Na segunda modalidade para obtenção da polpa de maracujá, as frutas foram pesadas em balança, lavadas em água corrente e submetidos à sanitização. Em seguida os frutos foram enxaguados em água, cortados e retirada a polpa em seguida homogeneizado, por exemplo, em liquidificador. O sumo obtido foi peneirado preferencialmente em peneira de 20 mesh para eliminação de partes não comestíveis. É possível utilizar outras frutas tropicais para a formação da bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame. Também é possível utilizar outras apresentações de suco tropical, como por exemplo os

sucos concentrados de fruta, desde que respeitem o mínimo exigido de sólidos solúveis em °Brix.

[029] Na terceira modalidade, a bebida de maracujá, onde a concentração da polpa obedeceu aos critérios determinados pela Legislação Brasileira para sucos tropicais no que diz respeito a adequação ao limite dos sólidos solúveis (°Brix) preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em sua Instrução Normativa nº12 de 2003, que prevê o valor mínimo de 6 °Brix, utilizando-se preferencialmente um refratômetro, obtendo-se um percentual de 31% de polpa de fruta e 69% de água, sem adição de açúcar. A bebida vegetal foi submetida ao processo de pasteurização, 72 a 75°C de 15 a 20 segundos, sendo preferencialmente de 72 °C por 5 minutos, e seguiram imediatamente para um banho de gelo de 8 a 12 °C, sendo preferencialmente 10 °C, com a finalidade de resfriar a bebida de 30 a 40 °C, preferencialmente até 35°C.

[030] Na quarta modalidade para ativação e viabilidade do *Lactobacillus paracasei*, que foi obtida através da Fundação Oswaldo Cruz – INCQS (Nº 00222) em forma liofilizada, tornando-se necessária sua ativação, que foi realizada a partir de sua inoculação preferencial em caldo MRS (deMan, Rogosa and Sharpe) e manutenção em estufa com temperatura de 30 a 40 °C por até 72 horas, preferencialmente à 37°C por 72 horas sob anaerobiose para então ser ativado. Para verificação da viabilidade da cepa foi realizado o procedimento de diluição em tubos múltiplos de 10^{-3} até 10^{-7} , preferencialmente nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Foi inoculado, também sob anaerobiose, 1 mL do substrato na diluição máxima pela técnica de profundidade e em meio MRS Agar e então submetido à estufa em temperatura de 30 a 40 °C, preferencialmente 37°C. A contagem das unidades formadoras de colônia em placas procedeu-se após 48 horas. Após verificação da viabilidade, a cepa foi mantida em estufa à temperatura à 30 a 40 °C, preferencialmente 37°C até utilização. É possível utilizar outras espécies de *Lactobacillus* previstos pela ANVISA que possuam alegação de propriedade probiótica, como exemplo os *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei variedade rhamnosus*, *L. casei variedade defensis*, *L. casei*, entre outros.

[031] na quinta modalidade para obtenção da bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame foi desenvolvida a partir do acréscimo da farinha de inhame, 1,5 a 5% (p/v), mas preferencialmente 2% (p/v) e de *L. paracasei* 1 a 3%, preferencialmente 2%

(v/v), a bebida de maracujá. Em seguida a bebida foi colocada em estufa com temperatura de 30 a 40 °C, preferencialmente de 37°C, por 48 horas para iniciar o processo fermentativo, a fim de favorecer e garantir o desenvolvimento do probiótico até 10⁸ UFC/mL. Após a fermentação, as bebidas foram acondicionadas sob refrigeração sendo prontas para a ingestão.

Exemplo 1: Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de inhame

[032] A farinha de inhame foi submetida a composição centesimal e análise microbiológica para verificar sua qualidade físico-química e viabilidade, além dos testes de estabilidade, onde a farinha foi armazenada em potes estéreis de vidro com tampas rosqueadas, foi mantida em ausência de luz e em sala em temperatura entre 28 e 37 °C por 180 dias. Nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, a fim de avaliar a sua qualidade total, as amostras foram coletadas de forma aleatória e então submetidas à avaliação microbiológica e química, que consistiu da pesquisa de coliformes a 45°C/g, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positiva/g, salmonella sp/25g, bacillus cereus/g, umidade e atividade de água. No que diz respeito a composição centesimal da farinha obteve-se os seguintes resultados (g/100g) de: umidade - 3,28; cinzas - 4,51; proteína – 8,55; lipídeo – 0,59; Carboidrato – 81,50; fibra alimentar total – 10,4; amido – 75,1; açúcares totais e redutores – traços; valor calórico total – 365,51; pH – 5,83 e acidez – 2,19. Os resultados da análise microbiológica da farinha nos tempos de armazenamento 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 apresentaram-se da seguinte maneira: Coliformes a 45°C/NMP/g - < 0,03 em todos os tempos avaliados; Bolores e leveduras UFC/g - < 10 em todos os tempos; estafilococos coagulase positiva/g – negativo em todos os tempos; Salmonella sp/25g – Ausência em todos os tempos; Bacillus cereus/g – negativo em todos os tempos avaliados. De acordo com os resultados apresentados a farinha de inhame apresenta-se viável microbiologicamente no período de 180 dias bem como apresentou excelente composição centesimal quando comparada a outros tipos de farinhas. A estabilidade física da farinha de inhame durante o armazenamento foi avaliada nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180, para umidade e atividade de água, obtendo-se os seguintes resultados: umidade - 3,31; 3,41; 5,49; 5,58; 5,71; 5,88 e 5,94, respectivamente; atividade de água - 0,304; 0,359; 0,364; 0,371; 0,388; 0,392 e 0,407, respectivamente. Desta forma, a farinha de inhame mostra-se estável fisicamente durante armazenamento.

Exemplo 2: Caracterização físico-química, microbiológica da bebida e vida de prateleira

[033] A bebida vegetal foi caracterizada em sua composição centesimal com as análises de umidade, proteína, lipídeo, cinzas, fibras, os carboidratos totais foram determinados por diferença, bem como o valor calórico total. A análise microbiológica foi realizada para Coliformes a 45 °C/NMP/g e *Salmonella sp*, nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias pós fermentação, afim de verificar a estabilidade biológica da bebida. No que diz respeito a composição centesimal os resultados apresentaram-se da seguinte forma em g/100g: umidade – 91,83; cinzas – 0,16; proteína – 0,33; lipídeo – 0,26, carboidrato – 7,21; fibra alimentar total – 2,45 e valor calórico total – 32,5. Os resultados para as análises microbiológicas foram de ausência para Coliformes a 45 °C e para *Salmonella sp* em todos os tempos avaliados. Desta forma pode-se observar que a bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame apresentou baixos índices de proteína, lipídio e valor energético total, o carboidrato apresentou nível considerável, um resultado esperado uma vez que a base da bebida é feita por fruta e farinha de inhame ambos considerados fontes de energia pelo carboidrato. Observa-se que a quantidade de fibras na bebida é expressiva já que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária define que um produto líquido pronto para consumo como fonte de fibra deve ter sua porção 1,5g, assim pode-se alegar que o referido produto desta patente auxiliará o funcionamento do intestino.

Exemplo 3: Avaliação sensorial da bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame.

[034] Foram realizados testes afetivo e de intenção de compra. As amostras de bebidas foram apresentadas em cabine sensorial a 50 provadores não treinados. Para avaliação da aceitação foi utilizada uma escala hedônica de 9 pontos cujos limites apresentarão a seguinte classificação: 1 para “Desgostei muitíssimo” e 9 para “Gostei muitíssimo”. A atitude quanto à intenção de compra será avaliada através de uma escala de 5 pontos cujos limites apresentarão a seguinte classificação: 1 para “Certamente não compraria” e 5 para “Certamente compraria”. O perfil sensorial da bebida elaborada foi verificado através dos parâmetros: aparência, sabor, odor, cor e qualidade global. Com as notas obtidas de cada parâmetro foi construído um Índice de Aceitação (IA%), tendo como

ponto de corte de 70%. No que diz respeito aos aspectos éticos para realização dos testes do projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e obteve aprovação através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número: 15312113.2.0000.5208. Todos os provadores voluntários foram esclarecidos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Desta forma os resultados sensoriais obtidos foram os seguintes descritos em IA (%): aparência – 70; qualidade global - 71,83; cor - 75,21; sabor – 73,57 e odor – 72,39. De acordo com os resultados apresentados pode-se observar que o produto apresentou boa aceitação global, pois apresentou valor acima de 70% de IA, os voluntários relataram através de observações nos formulários de avaliação que se mostraram surpresos pelas características apresentadas tendo em vista que a proposta da bebida ser atípica no mercado, afirmando que houve uma surpresa positiva. No que diz respeito a intenção de compra o resultado obtido dos 50 provadores foi de 66,4%, demonstrando que a bebida possui potencial de venda em uma projeção para o mercado consumidor.

Exemplo 4: Análise de sobrevivência do *L. paracasei* a fluidos simulados do trato gastrointestinal.

[035] A sobrevivência do probiótico da bebida vegetal após análise sensorial foi avaliada através de simulações das fases da digestão (gástrica e entérica), a resistência ao ácido e à pepsina (Simulação da fase gástrica) foi verificada diluindo a bebida em solução fisiológica 1:9 (solução salina à 0,85%) e adicionadas em solução ácida de pepsina (3 g/L; pH 2,5). As amostras foram incubadas à uma temperatura de 37 °C (temperatura corporal) por 120 minutos sob agitação de cerca de 150 rpm. Os testes foram realizados em triplicata frente a um controle, que consistiu na incubação da bebida na mesma diluição sem a presença do ácido ou da enzima. Para verificação da resistência da cepa ao processo digestivo simulado, sua viabilidade foi testada através da incubação da amostra em meio MRS a uma temperatura de 37 °C por 72 horas sob anaerobiose. A resistência aos sais biliares (simulação da fase entérica) a bebida também foi diluída na proporção de 1:9 em solução fisiológica (solução salina à 0,85%) e adicionadas em solução básica de bile bovina (3 g/L; pH 7,5), procedendo-se da mesma forma que o teste anterior. As contagens médias de *L. paracasei* obtidas nos tempos 0 e 28 dias foram os seguintes: 7,48, 6,57, 6,18 e 5,00 LogUFC.mL⁻¹ para tratamentos de Controle, Pepsina, Bile 2 h e Bile 4 h na preparação de

bebidas (D-0), respectivamente, e 6.15, 4.68, 4.90 e 4.20 LogUFC.mL⁻¹ para tratamentos de Controle, Pepsina, Bile 2 h e Bile 4 h no 28º dia de armazenamento (D-28), respectivamente. A maioria dos produtos fermentados que apresentam baixa viabilidade celular após administração oral porque as bactérias não sobrevivem ao ambiente ácido do estômago (KLAYRAUNG S et al., Int J Pharm. 370(1/2): 54-60, 2009). A bile liberada no intestino delgado também dificulta a sobrevivência do probiótico porque a sua membrana celular rica em lipídios é destruída. Apesar da diminuição das células viáveis de *L. paracasei*, mostrou-se adaptado à bebida e condições extremas que foram submetidas durante as simulações.

REIVINDICAÇÕES

1. “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME” **caracterizado por** um processo de obtenção da farinha de inhame, seguido da obtenção de poupa de fruta, misturadas com água para obtenção da bebida vegetal, sendo na dita bebida, inoculado com *Lactobacillus*, seguido de processo fermentativo para obtenção da bebida vegetal probiótica.
2. “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** pela farinha de inhame ter granulometria de 80 mesh, pois afeta as propriedades sensoriais do produto.
3. “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** poupa de fruta tropical compreender maracujá.
4. “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** processo de inoculação do micro-organismo consistir de unidades formadoras de colônia em no mínimo 10^8 .
5. “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** *Lactobacillus* compreender o *Lactobacillus paracasei*.
6. “BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME” **caracterizado por** um produto a base de bebida vegetal oriunda de uma mistura de farinha de inhame, suco de fruta tropical enriquecida com *Lactobacillus*.

RESUMO

“BEBIDA VEGETAL PROBIÓTICA ENRIQUECIDA COM FARINHA DE INHAME”. A presente patente de invenção se refere a uma bebida vegetal probiótica enriquecida com farinha de inhame, com atividade antioxidante e de manutenção da microbiota intestinal, isenta de colesterol e rica em vitaminas e minerais. O processo de obtenção da bebida envolve a obtenção da farinha de inhame, a obtenção de suco de fruta tropical, ativação e viabilidade da cepa probiótica e obtenção da bebida vegetal probiótica. A bebida vegetal foi caracterizada em sua composição centesimal e microbiológica apresentando os seguintes resultados: umidade - 3,28; cinzas - 4,51; proteína - 8,55; lipídeo - 0,59; Carboidrato - 81,50; fibra alimentar total - 10,4; amido - 75,1; açúcares totais e redutores - traços; valor calórico total - 365,51; pH - 5,83 e acidez - 2,19. Os resultados da análise microbiológica da farinha nos tempos de armazenamento 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 apresentaram-se da seguinte maneira: Coliformes a 45°C/NMP/g - < 0,03 em todos os tempos avaliados; Bolores e leveduras UFC/g - < 10 em todos os tempos; estafilococos coagulase positiva/g - negativo em todos os tempos; *Salmonella sp*/25g - Ausência em todos os tempos; *Bacillus cereus*/g - negativo em todos os tempos avaliados. A bebida apresentou os seguintes parâmetros físico-químicos e microbiológicos: A análise microbiológica foi realizada para Coliformes a 45°C/NMP/g e *Salmonella sp*, nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias pós fermentação, afim de verificar a estabilidade biológica da bebida. No que diz respeito a composição centesimal os resultados apresentaram-se da seguinte forma em g/100g: umidade - 91,83; cinzas - 0,16; proteína - 0,33; lipídeo - 0,26, carboidrato - 7,21; fibra alimentar total - 2,45 e valor calórico total - 32,5. Os resultados para as análises microbiológicas foram de ausência para Coliformes a 45°C e para *Salmonella sp* em todos os tempos avaliados. No teste sensorial apresentou os seguintes resultados para o Índice de Aceitabilidade (IA%): aparência - 70; qualidade global - 71,83; cor - 75,21; sabor - 73,57 e odor - 72,39. Para o teste de sobrevivência a fluidos simulados do trato gastrointestinal, a bactéria mostrou-se adaptado à bebida e condições extremas que foram submetidas durante as simulações. Por fim, esta bebida vegetal probiótica pode ser consumida por vegetarianos e indivíduos intolerantes ou alérgicos a componentes lácteos.