

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**



**TESE**

**logurte suplementado com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 e extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum*): caracterização e efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo***

**Elisa dos Santos Pereira**

Pelotas, 2022

Elisa dos Santos Pereira

**iogurte suplementado com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 e extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum*): caracterização e efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas como requisito a obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Comitê de orientação:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Maria Fiorentini

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Pieniz

Dr.<sup>a</sup> Márcia Vizzotto

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P436i Pereira, Elisa dos Santos

iogurte suplementado com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* r7 e extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum*) : caracterização e efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* / Elisa dos Santos Pereira ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Simone Pieniz, Marcia Vizzotto, coorientadoras. — Pelotas, 2022.

144 f. : il.

Tese (Doutorado) — Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Probióticos. 2. Leite fermentado. 3. Frutas nativas. 4. Compostos fenólicos. 5. Hiperglicemia. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Pieniz, Simone, coorient. III. Vizzotto, Marcia, coorient. IV. Título.

CDD : 637.146

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

## **Banca examinadora:**

### Presidente:

Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Fiorentini – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)  
Doutorado em Ciência dos Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

### Membros:

Dr. Augusto Schneider – Médico Veterinário, Doutorado em Biotecnologia (UFPEL).

Dr<sup>a</sup>. Chirle de Oliveira Raphaelli – Nutricionista, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPEL).

Dr<sup>a</sup>. Marjana Radunz – Nutricionista, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPEL).

Dr<sup>a</sup>. Stela Maris Meister Meira - Química Industrial de Alimentos (UNIJUÍ-UERGS), Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS).

Dr<sup>a</sup>. Simone Pieniz – Nutricionista (UNIFRA), Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS).

Dr<sup>a</sup>. Márcia Vizzotto – Engenheira Agrônoma (UFSM), Doutorado em Horticulture Science (Texas A&M University).

*“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores tornam-se seu destino.”*

*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar, proteger e me fazer forte.

Aos meus pais Danilo e Maria Helena pelo grande esforço e apoio incondicional durante toda a minha vida e aos meus irmãos Ivan, Rafael e Charles por estarem sempre presentes quando eu precisei.

Ao Diego por ser sempre meu companheiro, fazer os meus dias mais felizes e me alegrar mesmo quando algo não ia bem.

Às minhas orientadoras, Ângela Maria Fiorentini, Simone Pieniz e Márcia Vizzotto, pela paciência, apoio, amizade e pelos grandes ensinamentos transmitidos. Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos que a pós-graduação trouxe, Taiane, Marjana e Jardel por estarem sempre comigo, deixando essa caminhada mais leve.

Às queridas Vanize e Katerin pela parceria e amizade durante todo experimento *in vivo*.

Ao Laboratório LPOA pela estrutura, e aos colegas pelo aprendizado, especialmente a Khadija pela parceria.

Ao laboratório de Nutrição experimental da Faculdade de Nutrição da UFPEL, durante o período do experimento *in vivo*.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Embrapa Clima Temperado, pela disponibilização de sua estrutura, onde parte do meu trabalho de doutorado foi executado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos os outros que de uma maneira ou outra contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

## Resumo

PEREIRA, Elisa dos Santos. Iogurte suplementado com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 e extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum*): caracterização e efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*. 2022. 144f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

O aumento na prevalência de diabetes tipo 2 tem incentivado o desenvolvimento de alimentos mais saudáveis e que proporcionem benefícios à saúde. *Psidium cattleianum* Sabine já demonstrou bioatividades, que podem estar relacionadas ao alto teor de vitamina C e antioxidantes. Além disso, evidências sugerem associações favoráveis entre o consumo de probióticos e o perfil metabólico de indivíduos com diabetes. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de um iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho, como agente modulador, no tratamento da diabetes tipo 2. Para isso, foi desenvolvido um iogurte suplementado com o isolado potencialmente probiótico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 e extrato de araçá vermelho (IPA), e avaliado o efeito da digestão biológica *in vitro* sob o conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e a atividade antihiperlipidêmica; além da caracterização físico-química, e análises microbiológicas, sensorial e viabilidade da bactéria probiótica nas condições do trato gastrointestinal e durante o armazenamento. O estudo *in vivo*, foi realizado para avaliar o efeito da ingestão do iogurte, em camundongos induzidos à diabetes tipo 2. Após o processo de digestão *in vitro*, alguns compostos fenólicos permaneceram, como o ácido cafeico, hidroxibenzóico e sinápico; e a atividade inibitória de radicais como hidroxila e enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase aumentam após o processo de digestão. O iogurte IPA demonstrou teor elevado de sólidos solúveis totais, carboidratos e proteínas, e menor quantidade de gordura, comparado aos tratamentos sem adição do extrato de araçá. E ainda, quantidades superiores de compostos fenólicos e antocianinas, e maior atividade antioxidante, visto a presença do extrato da fruta. A bactéria probiótica incorporada no iogurte resistiu à passagem pelo trato gastrointestinal, e sua viabilidade ficou acima de  $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , e ainda, demonstrou boa aceitabilidade sensorial. No experimento *in vivo*, não foi observada diferença para os parâmetros de estresse oxidativo em nenhum dos tratamentos - iogurte (I), iogurte e probiótico (IP), iogurte e extrato de araçá (IA), iogurte com probiótico e extrato de araçá (IPA), e com soro fisiológico (controle). Os tratamentos I, IA e IPA foram efetivos na redução da glicemia em 60 minutos no TTG, evitando o risco de desenvolver resistência à insulina. Os tratamentos contendo araçá e o probiótico afetaram positivamente os níveis glicêmicos, de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL dos camundongos. Isso indica que a formulação do IPA poderá ser promissora para a população que busca um alimento funcional, fornecendo benefícios à saúde.

**Palavras-chave:** Probióticos. Leite fermentado. Frutas nativas. Compostos fenólicos. Hiperlipidemia. *In vivo*.

## Abstract

PEREIRA, Elisa dos Santos. Yogurt supplemented with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 and red araçá extract (*Psidium cattleianum*): characterization and biological effects *in vitro* and *in vivo*. 2022. 144f. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

The increase in the prevalence of type 2 diabetes has encouraged the development of healthier foods that provide health benefits. *Psidium cattleianum* Sabine has already demonstrated bioactivities, which may be related to the high content of vitamin C and antioxidants. Furthermore, evidence suggests favorable associations between probiotic consumption and the metabolic profile of individuals with diabetes. The objective of this study was to evaluate the potential of a probiotic yogurt supplemented with red araçá extract, as a modulating agent, in the treatment of type 2 diabetes. For this, a yogurt supplemented with the potentially probiotic isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 and red strawberry extract (IPA), and evaluated the effect of *in vitro* biological digestion on the content of phenolic compounds, antioxidant activity and antihyperglycemic activity; in addition to physical-chemical characterization, and microbiological, sensory and viability analyzes of the probiotic bacteria under the conditions of the gastrointestinal tract and during storage. The *in vivo* study was carried out to evaluate the effect of yoghurt intake in mice induced to type 2 diabetes. After the *in vitro* digestion process, some phenolic compounds remained, such as caffeic, hydroxybenzoic and synapic acid; and the inhibitory activity of radicals such as hydroxyl and  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes increase after the digestion process. The IPA yogurt showed a high content of total soluble solids, carbohydrates and proteins, and a lower amount of fat, compared to the treatments without the addition of araçá extract. And yet, higher amounts of phenolic compounds and anthocyanins, and greater antioxidant activity, given the presence of the fruit extract. The probiotic bacteria incorporated in yogurt resisted passage through the gastrointestinal tract, and its viability was above  $6 \log \text{CFU g}^{-1}$ , and also demonstrated good sensory acceptability. In the *in vivo* experiment, no difference was observed for the parameters of oxidative stress in any of the treatments - yogurt (I), yogurt and probiotic (IP), yogurt and araçá extract (IA), yogurt with probiotic and araçá extract (IPA), and with saline solution (control). Treatments I, IA and IPA were effective in reducing blood glucose in 60 minutes in the GTT, avoiding the risk of developing insulin resistance. The treatments containing araçá and the probiotic positively affected the glycemic, triglyceride, total cholesterol, LDL and VLDL levels of the mice. This indicates that the IPA formulation could be promising for the population that seeks a functional food, providing health benefits.

Keywords: Probiotics. Fermented milk. Native fruits. Hyperglycemic. *In vivo*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Acidez e pH dos tratamentos de iogurtes, durante 21 dias de armazenamento em refrigeração. Y: iogurte; YP: iogurte probiótico; YPA: iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho.....58
- Figura 2** Viabilidade de *L. lactis* R7 em iogurte contendo probiótico e extrato de araçá vermelho (YPA), durante 21 dias de armazenamento em refrigeração...61
- Figura 3** Experimento *in vivo* representando os dois grupos e respectivos tratamentos.....67
- Figura 4** Ganho de peso dos grupos saudável e induzidos à DM2.....72
- Figura 5** Teste de tolerância a glicose (TTG) em camundongos fêmeas e machos saudáveis e induzidos à DM2, nos tratamentos iogurte (I), iogurte+araçá (IA), iogurte+probiótico (IP) e iogurte+araçá+probiótico (IPA) e controle, no período de até 60 minutos.....73
- Figura 6** Índice de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ) em camundongos fêmeas e machos saudáveis e induzidos à DM2, nos tratamentos (I), iogurte+araçá (IA), iogurte+probiótico (IP) e iogurte+araçá+probiótico (IPA) e controle.....74
- Figura 7** Efeitos do tratamento de iogurte (I), iogurte+probiótico (IP), iogurte+araçá (IA) e iogurte+araçá+probiótico (IPA) e controle em grupos saudáveis e induzidos à DM2, nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), níveis de lipoperoxidação (TBARS) e níveis de tióis não proteicos (NPSH) em fígado de camundongos.....76
- Figura 8** Set of words on the frequency and relevance of terms associated with research with probiotic microorganisms.....90
- Figura 9** Shows a summary of the biological activities reported by probiotics.....101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Effect of biologic digestion <i>in vitro</i> on the phenolic compounds profile of red guava extract (RGE) and probiotic yogurt with red guava extract (PYRGE).....	43
<b>Tabela 2</b> Capacity for scavenging free radicals and inhibiting $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase enzymes, of the red guava extract (RGE) and probiotic yoghurt with red guava extract (PYRGE) of the fraction's <i>in vitro</i> digestion simulation.....	46
<b>Tabela 3</b> Caracterização físico-química dos diferentes tratamentos de iogurte adicionado ou não de <i>Lactococcus lactis</i> R7 e extrato de araçá vermelho.....	57
<b>Tabela 4</b> Compostos fenólicos totais, antocianinas e capacidade de inibição dos radicais DPPH e hidroxila dos diferentes tratamentos de iogurtes armazenados sob refrigeração.....	60
<b>Tabela 5</b> Viabilidade de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> R7 em iogurte funcional <i>diet</i> com extrato de araçá, em trato gastrointestinal simulado.....	62
<b>Tabela 6</b> Consumo de ração, peso inicial e final, ganho de peso e CEA dos grupos saudável e induzidos à DM2.....	71
<b>Tabela 7</b> Perfil bioquímico comparando o efeito do tratamento com I, IA, IP e IPA e controle em grupos de camundongos saudáveis e induzidos à DM2.....	80
<b>Tabela 8</b> Effect and mechanisms of action of different probiotics strains in disease prevention obesity, diabetes mellitus and celiac disease.....	102

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3 CAPÍTULO 1</b> .....	<b>16</b>
<b>Revisão da literatura</b>	
3.1 Diabetes mellitus tipo 2 .....	16
3.2 Bactérias probióticas na modulação da diabetes tipo 2.....	18
3.2.1 Bactérias ácido-láticas: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> R7 .....	21
3.2.2 Aplicação tecnológica de probióticos.....	23
3.3 Bioatividade de extratos vegetais de araçá .....	26
3.4 Iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá.....	29
<b>4 CAPÍTULO 2</b> .....	<b>32</b>
<b>Probiotic yogurt supplemented with <i>Lactococcus lactis</i> R7 and red guava extract: <i>In vitro</i> biological digestion on the profile of phenolic compounds, antioxidant and antihyperglycemic activity</b>	
4.1 Introdução .....	33
4.2 Material e métodos.....	35
4.3 Resultados e discussão.....	40
4.4 Conclusão .....	48
<b>5. CAPÍTULO 3</b> .....	<b>49</b>
<b>Iogurte funcional <i>diet</i> com adição de extrato de araçá vermelho e <i>Lactococcus lactis</i> R7: propriedades antioxidantes, físico-químicas, bioativa e sensorial e viabilidade da bactéria probiótica</b>	
5.1 Introdução .....	51
5.2 Material e métodos.....	51
5.3 Resultados e discussão.....	55
5.4 Conclusão .....	64

<b>6. CAPÍTULO 4</b>	65
<b>logurte suplementado com probiótico <i>Lactococcus lactis</i> R7 e extrato de araçá vermelho no tratamento de camundongos C57BL/6 induzidos à diabetes tipo 2</b>	
6.1 Introdução	66
6.2 Material e métodos	67
6.3 Resultados e discussão	71
6.2 Conclusão	82
<b>7. CAPÍTULO 5</b>	84
<b>Probiotics: therapeutic strategy on the prevention and treatment of obesity, type 2 diabetes mellitus and celiac disease</b>	
7.1 Introduction	85
7.2 Methodology	86
7.3 Probiotics	87
7.4 Obesity	90
7.5 Type 2 diabetes mellitus	93
7.6 Celiac disease	96
7.7 Conclusion	110
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	111
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	112
<b>APÊNDICES</b>	137
<b>ANEXOS</b>	139

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço do conhecimento sobre os componentes fisiologicamente ativos dos alimentos tem mudado a percepção do papel da dieta sobre a saúde. Com isso, aumenta o interesse da população em melhorar a qualidade da alimentação, reduzindo os gastos com saúde por meio da prevenção de doenças crônicas, da melhoria das condições e da expectativa de vida ativa (ROCHA *et al.*, 2021).

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são hoje, um problema de saúde global e uma ameaça à saúde e ao desenvolvimento humano. No Brasil, 73% das mortes são atribuídas às DCNT, e 17% da população está em risco de morte prematura, alvo deste grupo de doenças. Segundo a pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), o número de pessoas com diabetes no Brasil, passou de 5,5% em 2006 para 7,7% em 2018. O aumento na prevalência de diabetes tipo 2 é definido como um dos desafios mais importantes para os sistemas de saúde nos próximos anos (BRASIL, 2019).

Devido a isso, o incentivo a uma alimentação mais saudável e que proporcione benefícios à saúde, está aumentando. Destaca-se a crescente procura e consumo de alimentos com alegações funcionais, ou seja, aqueles definidos como: “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica” (HILL *et al.*, 2014).

Dentre estes alimentos funcionais, destacam-se aqueles adicionados de probióticos, que são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014). O uso de probióticos favorece o equilíbrio e a reconstrução da microbiota intestinal e participam da modulação da resposta imune, competindo com os patógenos por nutrientes e sítios de ação promovendo benefícios à saúde (KANMANI *et al.*, 2013). *Lactococcus lactis* é atualmente, empregado como cultura iniciadora na fabricação de muitos produtos lácteos e já demonstrou potencial probiótico *in vitro* (dados não publicados), *in situ* (ROSOLEN *et al.*, 2022) e *in vivo* (JASKULSKI *et al.*, 2020).

Além dos probióticos, compostos bioativos presentes nas frutas, também são importantes para a promoção da saúde. Os compostos fenólicos são amplamente

relacionados com atividades anticâncer, antiinflamatórias e antibacterianas, bem como redução do diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (SHAHIDI e YEO, 2018). Por possuir uma estrutura variável, os compostos fenólicos são considerados multifatoriais, ou seja, capazes de modular algumas rotas metabólicas. Estes compostos são capazes de inibir enzimas digestivas responsáveis pela quebra dos carboidratos em glicose, como as  $\alpha$ -glicosidases e  $\alpha$ -amilases, enzimas importantes na modulação do diabetes tipo 2 (YAMASHITA *et al.*, 2012).

Dentre algumas frutas, o araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) foi referido na literatura por possuir atividades biológicas, como atividade antihiperlipidêmica (VINHOLES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020), devido principalmente, a presença de compostos fenólicos (VERMA *et al.*, 2013).

Com tudo isso, dentro do nicho de desenvolvimento de novos produtos que apresentaram sucesso com a adição de compostos bioativos e que possuem um grande potencial de investimento, incluem-se principalmente os queijos, iogurtes e os leites fermentados. Verifica-se uma tendência em adicionar frutas aos produtos lácteos, como iogurte, no intuito de melhorar o valor nutricional e sensorial (KAILASAPATHY *et al.*, 2008), e ainda, é considerada uma matriz ideal para a adição de bactérias probióticas.

Diante do contexto, se faz necessário o desenvolvimento de novos produtos com alegações funcionais. O objetivo, portanto, foi desenvolver e caracterizar um iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá, como agente modulador verificado *in vitro* e *in vivo* com camundongos induzidos à diabetes tipo 2.

A tese está estruturada em cinco capítulos: No Capítulo 1, revisão da literatura, encontra-se uma abordagem sobre a diabetes tipo 2, as bactérias probióticas que atuam na modulação desta doença, e as bactérias ácido-láticas, especialmente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, a aplicação tecnológica de probióticos, a bioatividade dos extratos de araçá e ainda, sobre iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho (IPA). No capítulo 2, é abordado o estudo que avaliou a influência do processo de digestão simulado, nos níveis de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antihiperlipidêmica do IPA. No capítulo 3, é apresentado o desenvolvimento, caracterização e análise sensorial do iogurte adicionado de probiótico e extrato de araçá. No capítulo 4, é abordada a influência do consumo de iogurte adicionado de probiótico e extrato de araçá, através de

pesquisa *in vivo*, utilizando camundongos C57BL/6 induzidos a diabetes tipo 2, sobre os parâmetros bioquímicos, resistência a insulina e estresse oxidativo. No capítulo 5, é apresentada revisão bibliográfica sobre a influência dos probióticos na modulação de doenças crônicas, como a obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e a doença celíaca.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial do iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho e seu potencial hipoglicêmico *in vitro* e frente a camundongos induzidos à diabetes tipo 2.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver um iogurte probiótico suplementado com *L. lactis* R7 e extrato de araçá vermelho;
- Avaliar *in vitro* o potencial de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, do extrato de araçá vermelho e do iogurte probiótico suplementado com *L. lactis* R7 e extrato de araçá;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato de araçá vermelho e do iogurte probiótico suplementado com *L. lactis* R7 e extrato de araçá;
- Avaliar a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* frente à atividade de inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase do extrato de araçá vermelho e do iogurte probiótico suplementado com *L. lactis* R7 e extrato de araçá.
- Caracterizar o iogurte probiótico suplementado com *L. lactis* R7 e extrato de araçá quanto às propriedades físico-químicas e microbiológicas, bem como avaliar a aceitabilidade do produto;
- Avaliar o potencial hipoglicêmico do iogurte probiótico suplementado com *L. lactis* R7 e com extrato de araçá, em ensaios *in vivo*.

### 3 CAPÍTULO 1 Revisão da literatura

#### 3.1 Diabetes mellitus tipo 2

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são um problema de saúde global, cujos dados apontam ser a causa de 17,8% das mortes, entre adultos de 30 a 70 anos de idade, no mundo (WHO, 2021). No Brasil, estão entre as principais causas de morte, responsáveis por 54,7 % dos óbitos, em grande parte resultante de quatro grupos de doenças (cardiovasculares, cânceres, diabetes e respiratórias crônicas) e ainda, gerando alto custo referente a internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (VIGITEL, 2021; WHO, 2010; BRASIL, 2011).

A diabetes mellitus é caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Essa doença pode ser categorizada em duas formas principais, nomeada diabetes mellitus tipo 1 (DM1), causada pela ausência absoluta de produção de insulina devido à desintegração autoimune mediada de células  $\beta$  pancreáticas, e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que ocorre devido à deficiência relativa do mesmo hormônio envolvendo resistência à insulina, elevada síntese de glicose hepática e deterioração progressiva das funções das células  $\beta$  pancreáticas (SHARIFUDDIN *et al.*, 2015).

A hiperglicemia crônica da diabetes está associada a complicações em longo prazo, que incluem retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia levando à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés e amputações, e neuropatia autonômica, causando sintomas gastrointestinais, genitourinários, cardiovasculares e disfunção sexual (SBD, 2019). A hipertensão e as anormalidades do metabolismo das lipoproteínas são frequentemente encontradas em pessoas com diabetes, e ainda, estes têm uma incidência aumentada de doença aterosclerótica cardiovascular, periférica arterial, cerebrovascular e atualmente, sabe-se que é um fator de risco aumentado para complicações da COVID-19. O aumento na prevalência de diabetes é definido como um dos desafios mais importantes para os sistemas de saúde nos próximos anos (SBD, 2019; HUANG *et al.*, 2020).

Ao contrário dos portadores da DM1, os diabéticos tipo 2 não dependem da injeção de insulina, e na maioria das vezes, a dieta e os agentes hipoglicêmicos são suficientes para o controle glicêmico eficaz. Evidências apontam que as DCNT, como o diabetes, podem ser largamente prevenidas por meio de ações de promoção

de saúde (WHO, 2010). Devido a isso, o incentivo ao consumo de alimentos mais saudáveis e que proporcionem benefícios à saúde está aumentando.

A fibra dietética, como a pectina, está consistentemente correlacionada a uma incidência reduzida de DM2 (FERRIGO *et al.*, 2020), assim como consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes. A inibição das atividades de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase por extratos de frutas contendo quantidades elevadas de compostos fenólicos podem atenuar profundamente os níveis pós-prandiais da glicose sanguínea, após uma ingestão mista de carboidratos, e é uma abordagem lógica no gerenciamento do nível de glicose para portadores de DM2 e limítrofes (PEREIRA *et al.*, 2020).

A capacidade de inibição de enzimas digestivas demonstrada pelos compostos fenólicos ocorre pela capacidade de estruturas fenólicas se combinarem com enzimas, proteínas e outros polímeros (carboidratos e pectinas) formando complexos estáveis, impedindo a absorção dos nutrientes e assim, fazendo com que os compostos fenólicos sejam possíveis inibidores de algumas enzimas digestivas (COSTA *et al.*, 2008).

Cardoso *et al.*, (2018) avaliaram a influência da ingestão de extratos de duas frutas nativas (pitanga e araçá), ricas em compostos fenólicos, comparando dois grupos de animais: saudáveis e diabéticos induzidos com dexametasona (DEX). Foi verificado que o grupo em uso de DEX + extrato de pitanga ou araçá, não demonstrou diferença significativa nos níveis de glicemia, quando comparados ao grupo de animais saudáveis. Isso demonstra, que os extratos foram capazes de impedir o aumento da glicose sanguínea, mesmo em uso de indutores.

Além dos compostos bioativos presentes nos alimentos, um crescente corpo de evidências sugere que existam associações favoráveis entre o consumo de probióticos e o perfil metabólico de indivíduos com diabetes (KASINSKA e DRZEWSKI, 2015). Os mecanismos sugeridos entre o consumo de probióticos e a atividade antihiper-glicêmica, envolvem principalmente efeitos intraluminais, diretos na mucosa e na microbiota intestinal (DUAN *et al.*, 2015; STENMAN *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2015). Além disso, a supressão da endotoxemia (aumento dos níveis circulatórios de lipopolissacarídeos bacterianos), estimulação da secreção de ácidos graxos de cadeia curta e incretinas (hormônios produzidos pelo TGI) e efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores devido ao uso de probióticos são relatados (STENMAN *et al.*, 2015).

A prevenção da produção de radicais livres, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e a inibição da peroxidação também já foram relatados como os principais efeitos antioxidantes dos probióticos em relação ao diabetes e ainda, alguns estudos sugerem que os probióticos podem ter efeitos através da alteração da expressão de genes envolvidos no estresse do retículo endoplasmático e homeostase da glicose e resistência à insulina (EJTAHED *et al.*, 2012).

Randhawa *et al.*, (2015) compararam a capacidade antidiabética *in vivo* de três cepas probióticas como bactérias vivas com seu DNA genômico. Uma droga antidiabética (gliburida) foi dada sozinha e também em combinação com os probióticos e com seu DNA genômico. Assim, verificou-se que a combinação de gliburida e o DNA dos probióticos exerceram efeito anti-hiperglicêmico e apresentaram melhor redução nos níveis de glicose do que a gliburida isolada.

Contudo, devido às crescentes pesquisas acerca das propriedades antihiperglicêmicas de compostos presentes em alimentos, assim como das bactérias com ação probiótica, são necessários mais estudos para o desenvolvimento de produtos alimentícios que forneçam benefícios à saúde do consumidor, associando a presença destes compostos e os microrganismos.

### **3.2 Bactérias probióticas na modulação da diabetes tipo 2**

Probióticos são definidos como um conjunto de microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL *et al.*, 2014). Para estes microrganismos serem considerados probióticos, as cepas devem atingir seu local de ação: o intestino, e assim sobreviver ao estresse fisiológico encontrado durante a digestão: estômago ácido, pH intestinal e presença de sais biliares. Além disso, sua ingestão não deve representar risco para o hospedeiro, deverá manter as características e permanecer estável durante o processo de fabricação e conservação na matriz em que foi incorporado, e ser livre de vetores capazes de transferir resistência a antibióticos e de fatores de patogenicidade ou toxicidade (LIONG *et al.*, 2015; PRADO *et al.*, 2015).

Os mecanismos de ação dos probióticos envolvem colonização e normalização de comunidades microbianas intestinais; exclusão competitiva de patógenos e produção de bacteriocinas; modulação das atividades enzimáticas relacionadas à metabolização de uma série de carcinógenos e outras substâncias tóxicas; e produção de ácidos graxos voláteis. Além disso, os probióticos aumentam

a adesão das células intestinais e a produção de mucina e modulam a atividade do tecido linfóide associado ao intestino e do sistema imunológico. Da mesma forma, os metabólitos probióticos são capazes de interagir com o eixo cérebro-intestino e desempenhar um papel no comportamento (PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

Os produtos adicionados de bactérias probióticas devem abordar questões importantes para manter a qualidade, como viabilidade (expressa em unidades formadoras de colônias ou UFC) até o final da vida de prateleira do produto e uso da nomenclatura atual para identificar gênero, espécie e linhagem de todos os organismos incluídos na o produto (GUARNER *et al.*, 2017). Além disso, a dose necessária pode variar para cada cepa, embora muitos produtos forneçam entre 1 e 10 bilhões de UFC / dose. Apesar de muitos estudos comprovarem que o alimento deve ter concentração  $\geq 6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  ou  $\text{mL}^{-1}$  (COSTA *et al.*, 2019; PAPADOPOULOU *et al.*, 2018), não é possível estabelecer uma dose geral necessária de probióticos. A dose deve ser baseada em estudos humanos mostrando benefícios para a saúde (GUARNER *et al.*, 2017).

A linhagem probiótica utilizada deve ser segura para o uso, e deve ser demonstrada por meio de testes *in vivo* e *in vitro* capazes de evidenciar a inocuidade da linhagem. A segurança do composto deverá ser comprovada pela identificação do grupo ou classe de risco do micro-organismo, histórico de uso, revisão de literatura, ensaios *in vitro*, ensaios em animais, ensaios clínicos, e, quando disponível, vigilância pós-mercado. E ainda, uma análise *in silico*, ou seja, comparando a sequência genética do microrganismo probiótico com bancos de dados de genes associados a virulência, pode ser realizada de forma a complementar os ensaios de segurança (ANVISA, 2021).

Os produtos com adição de probióticos não determinam resíduos e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos, sendo uma característica muito positiva, visto que esta resistência representa do ponto de vista clínico e de saúde pública, um sério problema (COSTA *et al.*, 2013).

Portanto, muitos benefícios para a saúde são atribuídos aos probióticos, incluindo atividade antimicrobiana contra patógenos intestinais, modulação do sistema imunológico, redução dos níveis de colesterol e glicose no sangue, redução de colite e inflamação, prevenção de alguns tipos de câncer como colorretal, regulação de energia metabolismo, ação na disbiose intestinal, obesidade,

desequilíbrio microbiano e até melhora dos sintomas em pacientes celíacos (AMBALAM *et al.*, 2016; ORLANDO *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2021).

Os probióticos foram investigados por seus efeitos na diabetes tipo 2 e na prevenção da diabetes gestacional. Um estudo avaliou 67 gestantes com diabetes gestacional, onde um grupo recebeu uma cápsula contendo quatro cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12, *Streptococcus thermophilus* STY-31 e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* LBY-27), e outro grupo recebeu placebo. Os grupos foram avaliados durante 8 semanas, com ingestão de uma cápsula ao dia. A glicemia em jejum diminuiu significativamente mais no grupo probiótico (de 103,7 para 88,4 mg / dL) do que no grupo placebo (de 100,9 para 93,6 mg / dL). Ainda, verificou-se que o ganho de peso no grupo probiótico foi significativamente menor do que no grupo placebo (DOLATKHAH *et al.*, 2015).

Randhawa *et al.*, (2015), em estudo *in vivo*, compararam a capacidade antidiabética do DNA genômico de três cepas probióticas. Uma droga antidiabética (gliburida) foi administrada isoladamente e também combinada com probióticos e seu DNA genômico. Assim, verificou-se que a combinação da gliburida e o DNA dos probióticos exerceu efeito anti-hiperglicêmico e apresentou melhor redução nos níveis de glicose do que a gliburida isoladamente.

Yan *et al.*, (2020), rastreou potenciais cepas antidiabéticas *in vitro* e, em seguida, avaliou seus efeitos *in vivo*. Quatorze cepas de *Lactobacillus* spp. foram testados *in vitro* para as atividades inibitórias e antioxidantes da dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), e então determinados ensaios de hidrofobicidade e tolerância a ácidos e sais biliares. A cepa mais promissora foi *L. acidophilus* KLDS1.0901 e, portanto, foi testada para verificar propriedades antidiabéticas *in vivo* com camundongos C57BL/6J, DM2 (induzidos por dieta hiperlipídica e injeção intraperitoneal de Estreptozotocina - STZ). A administração de *L. acidophilus* KLDS1.0901 diminuiu os níveis de glicemia de jejum, hemoglobina glicada, insulina sérica e índice glicêmico, e aumentou o nível de peptídeo 1, semelhante ao glucagon no soro em comparação com camundongos diabéticos ( $p < 0,05$ ).

Outros estudos avaliaram a eficácia do uso de probióticos na diabetes tipo 2, onde foi verificada a diminuição da hemoglobina glicosilada após o tratamento, assim como os níveis de glicemia em jejum e resistência à insulina, demonstrando efeitos benéficos da administração de probióticos, especialmente do gênero *Lactobacillus* (RAZMPOOSH *et al.*, 2016; TAO *et al.*, 2020).

Estudos clínicos com humanos também associam a modulação da microbiota intestinal a resultados benéficos no controle glicêmico. Em um estudo randomizado controlado por placebo com 50 indivíduos DM2, eles distribuíram aleatoriamente os indivíduos em dois grupos: grupo probiótico (n=25), grupo placebo (n=25). O grupo probiótico consumiu 120 g / dia de leite fermentado durante seis semanas, contendo *L. acidophilus* La5 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Com esta intervenção, o valor da hemoglobina glicosilada foi menor no grupo probiótico do que no grupo placebo (TONUCCI *et al.*, 2017).

### 3.2.1 Bactérias ácido-láticas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7

As bactérias ácido-láticas (BAL) compreendem um grupo de microrganismos com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Estas bactérias podem apresentar forma de bacilos ou cocos, são Gram positiva, catalase negativa, não esporuladas, anaeróbicas facultativas, capazes de realizar a fermentação tanto em anaerobiose como em aerobiose, porém de uma forma mais lenta. O principal produto da fermentação dos açúcares é o ácido lático, e estão envolvidas na acidificação de produtos alimentares (BURGAIN *et al.*, 2014; TAMANG *et al.*, 2016).

As BAL são essencialmente mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de desenvolver-se em temperaturas entre 5 e 45 °C, e possuem a capacidade de crescer a pH de 3,8 (LIMA *et al.*, 2009). Estas bactérias são as principais constituintes de culturas iniciadoras artesanais utilizadas em indústrias, na fabricação de uma ampla gama de produtos lácteos fermentados, como soro de queijo e queijos. Essas culturas iniciadoras desempenham um papel fundamental na qualidade de produtos fermentados quanto ao aumento da vida útil, na preservação e qualidade sensorial (GONZÁLEZ REVELLO *et al.*, 2016).

Além disso, as BAL produzem bacteriocinas como lacticins, lactococcinas e nisina, sendo esta última, um peptídeo extracelular antagonista contra patógenos e microrganismos deteriorantes, constituindo uma ampla atividade antimicrobiana (LIU *et al.*, 2005; WARDANI *et al.*, 2006).

De acordo com o produto final da fermentação, as BAL classificam-se em homofermentativas, que abrangem os gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, que utilizam a via glicolítica para transformar os carboidratos principalmente em ácido lático; e as

heterofermentativos, que utilizam a via da fosfoacetolase para produzir além do ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol, acetato e citrato a partir da glicose (CARR *et al.*, 2002; FORSYTHE, 2002; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Os microrganismos do gênero *Lactococcus* são considerados os principais responsáveis pela acidificação do leite (LOPEZ-DIAZ *et al.*, 2000). Devido à sua capacidade em converter rapidamente a lactose em ácido láctico, estes microrganismos são os mais usados na fabricação de ácido nas fermentações lácticas, podendo ser empregados também, na fabricação de iogurtes. As cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produzem amônia a partir da arginina, crescem a temperaturas de 10, 15 e 40 °C e em 4% de sal (FOX *et al.*, 2000).

Por ser uma bactéria de fácil manuseio, não comensal, não patogênica e não invasiva, *L. lactis* subsp. *lactis* tem sido utilizada como vetor *in vivo* para antígenos e proteínas imunomoduladoras (AVERY *et al.*, 2015). Na literatura, já foi relatado a capacidade de sobrevivência e a passagem pelo trato gastrointestinal, ou seja, a capacidade destas cepas em sobreviverem às condições de baixo pH do estômago, bile intestinal, enzimas proteolíticas na cavidade oral e intestinal, que caracterizam uma bactéria probiótica (KIMOTO *et al.*, 2004).

Foi constatado ainda, que cepas de *L. lactis*, possuem efeito hipocolesterolêmico, antidiabético e antimutagênico (KIMOTO *et al.*, 1999). Em uma pesquisa anterior ainda não publicada deste grupo de estudos, caracterizou-se *L. lactis* subsp. *lactis* R7, isolada de queijo ricota, e verificou que esta bactéria possui características probióticas e aspectos de segurança compatíveis para utilização como culturas em alimentos. O isolado R7, foi identificado molecularmente como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, e apresentou características probióticas nas análises de tolerância ao pH ácido, sais biliares, suco gástrico simulado e suco intestinal simulado. Além disso, foi sensível aos seis antimicrobianos avaliados (Clindamicina, Eritromicina, Penicilina, Cloranfenicol, Meropenen e Vancomicina), não forma biofilme, é homofermentativo, e não apresentou atividade hemolítica. O isolado R7 apresentou ainda, capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade e ainda, foi verificada atividade antagonista contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (dados não publicados).

Jaskulski *et al.*, (2020), verificaram efeito positivo na estabilização de células cancerosas induzidas no epitélio colorretal, demonstrando potencial anticancerígeno

de *L. lactis* subsp. *lactis* R7 contra o câncer de colorretal. Verificaram também a estabilidade do ganho de peso, redução da adiposidade abdominal, melhora da resposta imune, atividade antioxidante frente ao estresse oxidativo e proteção à peroxidação lipídica.

### 3.2.2 Aplicação tecnológica de probióticos

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, além da seleção de cepas probióticas para uso humano, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação na matriz alimentar, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA *et al.*, 2002; KOMATSU *et al.*, 2008).

O emprego apenas de bactérias probióticas em cultura pura é inviável industrialmente, visto que, quando estas culturas são empregadas isoladamente, o pH do leite continua acima de 5,4 após 20 horas a 42 °C, ou seja, o tempo de produção aumentaria muito. Normalmente, para a fabricação de leites fermentados contendo probióticos, adicionam-se culturas iniciadoras como *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* para facilitar o processo de fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Assim, o emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados tem sido amplamente estudado, visto que é necessário avaliar a viabilidade destes microrganismos ao longo do armazenamento em refrigeração. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são seguros e amplamente utilizados em alimentos (SALMINEN e ISOLAURI, 2008). Estes possuem a capacidade de se manterem viáveis no produto fermentado e de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, aderindo a mucosa do intestino, trazendo benefícios a microbiota de indivíduos que consomem esses produtos, periodicamente (SILVA, 2007).

Células de *Lacticaseibacillus casei* CSL3 (anteriormente *Lactobacillus casei*) já foram imobilizadas em pedaços de frutas e usadas como adjuvantes aos probióticos na fabricação de queijo, o que conferiu sabor frutado, e muito bem aceito aos queijos (VITOLA *et al.*, 2020). Ainda, verificou-se que as frutas foram eficazes

no suporte para a sobrevivência das células de *L. casei* durante o amadurecimento do queijo (KOURKOUTAS *et al.*, 2006).

A atividade probiótica do isolado *Lacticaseibacillus casei* CSL3, derivado de silagem de colostro bovino, foi avaliada em manteiga fermentada acrescida com bixina, um antioxidante natural encontrado nas sementes de urucum. Foi verificado que a manteiga suplementada de bixina e o probiótico foi eficiente para até 74 dias de armazenamento, o que evidencia que a concentração de bixina adicionada não afetou a viabilidade das cepas probióticas (BELLINAZO *et al.*, 2019).

Outro estudo avaliou as características funcionais e probióticas de um sorvete, com adição de frutas nativas (butiá), e *Bifidobacterium lactis* (BI-04). Durante 90 dias de congelamento, houve uma redução de 10% no conteúdo fenólico total, uma redução de 5% no ácido L-ascórbico, e aumento na quantidade de carotenoides e flavonoides. A bactéria probiótica permaneceu viável (acima de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ ) no sorvete de butia durante o armazenamento, confirmando a característica probiótica do produto e ainda, as análises sensoriais mostraram que o sorvete de butia teve alta aceitação, sendo uma boa opção para consumo (CRUXEN *et al.*, 2017).

Devido as BAL serem responsáveis por provocar transformações na matéria-prima, este é o principal grupo de bactérias utilizado na fermentação e/ou suplementação de alimentos, principalmente derivados do leite (IKEDA, 2013). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, por exemplo, destaca-se no metabolismo do citrato e a capacidade de atribuir o sabor característico à manteiga e a alguns iogurtes (FORSYTHE, 2013).

Um estudo utilizou *Lactococcus lactis* como adjuvante para produção de iogurte probiótico, utilizando células imobilizadas em abacaxi, inhame e pó de alcachofra; células livres de *L. lactis* e apenas de culturas iniciadoras. O iogurte produzido com a adição de células imobilizadas de abacaxi e inhame e o pó de alcachofra melhorou a viabilidade das células probióticas durante o armazenamento sob refrigeração em comparação com as células livres, especialmente o iogurte suplementado com imobilização celular em segmentos de abacaxi. Curiosamente, as amostras de iogurte suplementadas com células imobilizadas apresentaram um número maior de células probióticas do que os níveis mínimos recomendados. O que indica que as células imobilizadas foram benéficas e tecnologicamente

eficientes para uso na produção de iogurte por razões de saúde e funcionais (PHUAPAIBOON *et al.*, 2013).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 já foi microencapsulado por *spray drying*, utilizando como material encapsulante a combinação de soro de queijo e inulina, a fim de verificar a estabilidade em diferentes matrizes alimentares, como suco de mirtilo, leite e creme de leite. Foi verificado que a acidez do suco de mirtilo levou a perda da integridade da microcápsula e exposição de *L. lactis* R7. Enquanto no leite e no creme de leite o microrganismo manteve sua estabilidade ao longo de 28 dias de armazenamento a 4 °C. Em relação a concentração, as células aplicadas no suco de mirtilo, ficaram em torno de 10 log UFC.mL<sup>-1</sup> após a passagem pelo fluido gástrico. A ruptura da microcápsula no leite ocorreu apenas após 120 min (>11 log UFC mL<sup>-1</sup>), enquanto que no creme de leite a alta concentração celular foi encontrada em todas condições analisadas. Matrizes lácteas, portanto, apresentaram boas condições para estabilidade de *L. lactis* R7 (ROSOLEN *et al.*, 2020 e 2022).

Ainda, demonstrando atividade funcional, Nishiyama *et al.*, (2018) avaliaram dois tratamentos de iogurtes, sendo um controle (fermentado com *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*), e outro teste (com cepas de *L. lactis* 11/19-B1 e *Bifidobacterium lactis* BB-12). Estes verificaram que dentre um grupo de 76 participantes que receberam os iogurtes (80 g) durante 8 semanas, o grupo que recebeu o iogurte teste, demonstrou queda nos índices da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo significativamente (159,1 ± 25,7 para 149,3 ± 24,4; p = 0,02), o que não foi observado no grupo de iogurte controle.

Novos produtos e matérias-primas para aplicação de probióticos são a principal área de pesquisa e desenvolvimento para o mercado de alimentos funcionais. As inovações tecnológicas atuais incluem a busca de soluções para os problemas de estabilidade e viabilidade de probióticos em novas matrizes alimentares, como lácteos, frutas, cereais e outros vegetais (FARNWORTH *et al.*, 2007). Dentre os produtos lácteos, os leites fermentados são muito utilizados, considerados bons veículos, para aplicação de probióticos.

Em geral, pode-se dizer que o processamento de alimentos funcionais contendo bactérias probióticas, principalmente sua incorporação em iogurtes, leites

fermentados e queijos, vem resultando em produtos com alto grau de aceitabilidade, nos quais a sua viabilidade e funcionalidade são mantidas.

### **3.3 Bioatividade de extratos vegetais de araçá**

O Brasil é um país com características geográficas e climáticas favoráveis para a produção de frutas. No entanto, um grande número de frutas permanece inexplorado, apesar de seus altos valores nutricionais, frequentemente relatados (SCHIASSI *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, foi observado um aumento nos estudos com frutas, bem como o desenvolvimento de novos produtos alimentícios com base nelas, porém informações sobre as características químicas e valor nutricional das frutas brasileiras ainda precisam ser mais exploradas (SCHIASSI *et al.*, 2018).

*Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), popularmente conhecida como araçá, é uma espécie nativa brasileira ainda pouco explorada, e é encontrada da Bahia ao Rio Grande do Sul e também no vizinho Uruguai (PATEL, 2012). O araçá é uma fruta suculenta, com excelente sabor e polpa doce a subácida, com toque picante (BIEGELMEYER *et al.*, 2011). Esta fruta pode ser consumida *in natura* ou processada, na forma de doces, geleias e sucos (REISSIG *et al.*, 2016). Além disso, devido à bioatividade (antioxidante, anticâncer, antidiabética, anti-inflamatória, anti-idade e antimicrobiana) do extrato da fruta, que pode estar relacionada ao alto teor de vitamina C e antioxidantes, o araçá também pode ser valioso para a indústria farmacêutica (FRANZON *et al.*, 2009, PEREIRA *et al.*, 2018).

Um estudo *in vivo* com ratos alimentados com araçá liofilizado em pó apresentou notável redução nos parâmetros alterados pelo estresse oxidativo induzido pela cisplatina. Os animais apresentaram níveis reduzidos de glicose, colesterol LDL, colesterol LDL oxidado e colesterol total quando comparados aos animais controle (animais induzidos por cisplatina não alimentados com araçá). Além disso, os animais alimentados com araçá diminuíram a deposição de gordura no fígado apresentando melhora no perfil lipídico (DALLA NORA *et al.*, 2014). Mais recentemente, a administração de extrato de araçá (200 mg / kg / dia, por 21 dias) em ratos resistentes à insulina evitou a peroxidação lipídica hepática e a formação de espécies reativas de oxigênio (SOUZA CARDOSO *et al.*, 2017).

O processo de extração dos compostos bioativos presentes em matrizes alimentares, como no araçá, pode ser utilizado a fim de obter concentrações desses

compostos, e assim, maior bioatividade (BURIOL *et al.*, 2009). Por exemplo, extratos de araçá foram avaliados, como potenciais inibidores das enzimas digestivas, e verificou-se que os genótipos de araçás vermelho e amarelo foram capazes de inibir as enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase, sendo uma alternativa à modulação da hiperglicemia (PEREIRA *et al.*, 2020).

Além disso, a administração de extrato de araçá (200 mg / kg / dia, por 21 dias) evitou a hiperglicemia e hipertrigliceridemia em ratos resistentes à insulina induzida por dexametasona (SOUZA CARDOSO *et al.*, 2017). O mecanismo de ação do extrato não foi relatado pelos autores. No entanto, essa atividade pode estar relacionada com alguns dos compostos fenólicos presentes nos extratos de araçá, uma vez que esses compostos são responsáveis por inibir enzimas específicas (VALKO *et al.*, 2007). A quercetina, por exemplo, é considerada um bom inibidor de enzimas digestivas, com IC<sub>50</sub> quase 40 vezes menor que o controle positivo (VINHOLES *et al.*, 2017).

Diferentes estudos indicam propriedades farmacológicas promissoras principalmente relacionadas às suas propriedades químicas. Assim, os araçás podem ser úteis na prevenção e tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo e envelhecimento. Além disso, parece ser um potencial candidato para uso no tratamento do DM2.

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos que inibem a formação de radicais livres, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (SINGH *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos são originados do metabolismo especializado das plantas e essenciais para o crescimento e reprodução destas. Além disso, são formados em condições de estresse, como por exemplo, infecções, ferimentos, radiações UV, entre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004). Há evidências de que o consumo de compostos fenólicos presentes nos alimentos pode diminuir o risco de transtornos graves de saúde devido a sua atividade antioxidante. O mecanismo de ação dos compostos fenólicos está relacionado com o efeito protetivo contra o estresse oxidativo, imposto por espécies reativas de oxigênio (ROS), o que desempenha papel crucial na fisiopatologia de neoplasias, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (HEIM *et al.*, 2002).

Além disso, os compostos fenólicos também atuam no bloqueio de enzimas específicas (VALKO *et al.*, 2007). Isso ocorre pela capacidade de estruturas

fenólicas se combinarem com enzimas digestivas, proteínas e outros polímeros (carboidratos e pectinas) formando complexos estáveis, impedindo a absorção dos nutrientes e assim, fazendo com que os compostos fenólicos sejam possíveis inibidores de algumas enzimas digestivas (COSTA *et al.*, 2008).

Dentre os compostos fenólicos, a epicatequina e a quercetina são consideradas bons inibidores de  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase, enzimas chave no controle de DM2 (TADERA *et al.*, 2006). Estas enzimas atuam na absorção da glicose nos enterócitos através de transportadores específicos. Elas hidrolisam os carboidratos para que estes sejam absorvidos na corrente sanguínea, sendo que a  $\alpha$ -amilase é responsável por hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da amilose e da amilopectina presentes no amido, e a  $\alpha$ -glicosidase é responsável pela hidrólise dos dissacarídeos, liberando duas moléculas de glicose para serem absorvidas na corrente sanguínea (WILLIAMSON, 2013). A inibição destas enzimas digestivas demonstra grande importância visando o possível controle da DM2, cujo tratamento baseia-se em mudanças no estilo de vida como dietas, exercícios físicos e uso de antidiabéticos orais e injetáveis (WEINERT *et al.*, 2015).

O ácido clorogênico é um tipo de ácido hidroxicinâmico, que ocorre em diversos tipos de frutas, inclusive no araçá (PEREIRA *et al.*, 2018). Estudos sugerem que os polifenóis, especialmente o ácido clorogênico, têm efeitos hipoglicêmicos (TUOMILEHTO *et al.*, 2004). Este composto é um tipo de sensibilizador de insulina que tem desempenho semelhante à metformina em potencializar a ação da insulina, e também suprime a hiperglicemia pós-prandial ao inibir a alfa-glicosidase. O ácido clorogênico em uma dose de 5 mg / kg de peso corporal exerceu potencial antidiabético em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) (45 mg / kg bw) (KARTHIKESAN *et al.*, 2010).

Shabbir *et al.*, (2020) verificou potencial antidiabético de extratos de goiaba (também da família Mirtacea). Foi visto que a polpa apresentou maior atividade antihiperglicêmica, comparado às folhas e as sementes. Os resultados sugerem que a viabilidade da adição de 200–250 mg / kg bw de extratos polifenólicos da polpa de goiaba como uma alternativa aos medicamentos para diabetes.

Visto o potencial dos compostos bioativos, torna-se importante a continuidade de pesquisas que utilizem estes compostos, seja na forma isolada, ou pela utilização de frutas ricas em compostos antioxidantes, a fim de prevenção ou tratamento das DCNT.

### 3.4 Iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá

O iogurte é definido como um produto obtido pela fermentação láctica através da ação do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre o leite integral, desnatado ou padronizado, aos quais podem acompanhar outras bactérias ácido-láticas (BRASIL, 2007). Ele pode ser produzido a partir de leite com alto teor de sólidos, uma cultura láctica e açúcar e pode ser enriquecido com leite em pó, proteínas, vitaminas, minerais ou frutas (ALMEIDA *et al.*, 2008). O iogurte é um alimento convencional conhecido por suas propriedades terapêuticas, nutricionais e sensoriais (GONZALEZ *et al.*, 2011).

No iogurte ainda, podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas ou não, que por sua atividade, conferem efeitos probióticos e contribuem para a determinação das características do produto final (MAPA, 2007). A aplicação das bactérias probióticas, pode se dar de modo que elas participem da fermentação do produto, atribuindo características sensoriais provenientes dos compostos gerados, ou ainda, sua adição pode se dar diretamente ao produto final, por suplementação, normalmente, não causa alteração sensorial, de modo a trazer os mesmos benefícios promovidos por estes microrganismos (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).

Os derivados do leite são meios adequados para o crescimento de bactérias probióticas, pois contém fatores e substratos indispensáveis para a fermentação, como açúcares e proteínas, sendo os microrganismos mais utilizados como probióticos, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (WENDLING e WESCHENFELDER, 2013).

Os benefícios ao hospedeiro e as propriedades probióticas, são específicos para cada cepa (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2014), e a viabilidade das bactérias pode ser influenciada pela composição dos alimentos (DANTAS *et al.*, 2016), como também precisam superar os obstáculos do trato gastrointestinal e aderir às células intestinais (FORSYTHE e BIENENSTOCK, 2010). Neste sentido, é recomendado a concentração de células probióticas viáveis no alimento, superior a 6 Log UFC g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> de microrganismos com potencial probiótico (PAPADOPOULOU *et al.*, 2018). Portanto, estes microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto durante o período de vida útil do alimento (ANVISA, 2021).

Dentro do nicho de novos produtos que apresentaram sucesso com a adição de compostos bioativos e que possuem um grande potencial de investimento, incluem-se principalmente os queijos, iogurtes e os leites fermentados. Verifica-se uma tendência em adicionar frutas aos produtos lácteos, no intuito de melhorar o valor nutricional e sensorial (KAILASAPATHY *et al.*, 2008).

A ingestão de extratos de araçá, por exemplo, já foi relacionada com atividade antihiperlipidêmica e antioxidante em modelos animais diabéticos (SOUZA CARDOSO *et al.*, 2017).

Nesta tendência, cada vez mais em ascensão, de alimentos lácteos funcionais, é de extrema importância os estudos das interações dos componentes do leite com os compostos bioativos que estão sendo aplicados, uma vez que essas interações podem afetar a bioatividade, a biodisponibilidade e a atividade antioxidante desses compostos. Além disso, existe o desafio de caracterização final dos produtos, em relação a qualidade sensorial, físico química e microbiológica (CUTRIM *et al.*, 2018).

A biodisponibilidade é a diferença entre o que se ingere e o que realmente é absorvido. As porções que são digeridas, absorvidas, metabolizadas e utilizadas em funções fisiológicas ou armazenadas pelo organismo são denominadas como biodisponíveis (SENA *et al.*, 2017). A biodisponibilidade dos compostos bioativos pode ser avaliada por métodos *in vitro* e *in vivo*, e são extremamente importantes para verificar os nutrientes que são realmente absorvidos. Este último, não só serve para corroborar os resultados *in vitro*, como também pode ser usado para selecionar as dosagens utilizadas para a obtenção de uma melhor eficácia terapêutica. Se um composto apresentar benefícios à saúde do hospedeiro em ensaios *in vitro*, então se torna válida a realização de ensaios biológicos e funcionais *in vivo*, para confirmação dessas características (SHARIFI *et al.*, 2012).

Vinholes *et al.*, (2018) verificaram diminuição da atividade antioxidante ao longo do processo digestivo *in vitro* de extratos de araçá, porém os fenólicos individuais se mostraram resistentes, e ainda, ocorreu o surgimento de novos compostos após o processo, provavelmente devido à quebra de compostos iniciais. Quando os extratos não digeridos foram comparados aos extratos digeridos de araçá, frente à inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, os resultados foram semelhantes, indicando seu potencial para uso no controle da DM2, inclusive após o processo digestivo.

A biodisponibilidade *in vivo* foi testada para a goiaba, que também é uma Mirtacea. Foi avaliada a administração de oito triterpenos (ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido arjunólico, ácido asiático, ácido boswélico, ácido corosólico, ácido madecássico e ácido maslínico) a 0,5%, fornecidos a camundongos de 4 a 8 semanas. O nível de cada triterpeno no plasma, cérebro, coração, fígado, rim, cólon e bexiga aumentou conforme o período de alimentação foi aumentado de 4 para 8 semanas demonstrando que esses triterpenos foram absorvidos e depositados em suas formas intactas, que por sua vez exerceram proteção antioxidante *in vivo* (YIN *et al.*, 2012).

Além disso, as características físicas, químicas, microbiológicas, e sensoriais devem ser uma preocupação na elaboração de um novo produto, pois esses determinam, juntamente com o preço, a aquisição deste. O iogurte com frutas é bem aceito, por isso, o desenvolvimento de novos sabores tende a ser bem recebido pelos consumidores do produto (SCHMIDT *et al.*, 2012). Entretanto, para uma nova elaboração, vários testes são necessários (LOURES *et al.*, 2010). A legislação brasileira através da Instrução Normativa nº 46, de 23/10/2007 - MAPA (BRASIL, 2007) estabelece os parâmetros físico-químicos do iogurte. Apesar disso, a análise sensorial, outro importante instrumento, é bastante usada para avaliar as características, como cor, aroma, sabor, consistência e preferência (LOURES *et al.*, 2010), antes de serem inseridos no mercado.

Ainda, em virtude da demanda por produtos mais saudáveis, se faz necessária a redução da concentração de açúcares (sacarose) em derivados lácteos, ou a substituição por adoçantes naturais como o xilitol, que pode ser uma vantagem, visto que este poliol possui similar poder adoçante à sacarose, mas com menor fornecimento de calorias e ainda não necessita da insulina para ser metabolizado, sendo indicado para diabéticos (KUMAR *et al.*, 2019). E ainda, segundo a ANVISA (2018), o xilitol pode ser utilizado "*quantum satis*", ou seja, quanto for suficiente.

Contudo, ainda persiste a necessidade de mais pesquisas acerca da aceitabilidade e das atividades biológicas de formulações, como o iogurte, acrescentadas de diferentes extratos de frutas e novas cepas probióticas, mesmo que para alguns produtos similares, os benefícios já foram comprovados pela literatura.

#### **4. CAPÍTULO 2**

**Probiotic yogurt supplemented with *Lactococcus lactis* R7 and red guava extract: *In vitro* biological digestion on the profile of phenolic compounds, antioxidant and antihyperglycemic activity**

As páginas 33 a 48 não serão disponibilizadas, por motivo de sigilo.

## 5 CAPITULO 3

### **Iogurte funcional diet com adição de extrato de araçá vermelho e *Lactococcus lactis* R7: propriedades antioxidantes, físico-químicas, bioativa e sensorial e viabilidade da bactéria probiótica**

Manuscrito a ser submetido na revista Journal of Food Processing and Preservation

Fator de Impacto: 1,288

ISSN: 1745-4549

#### **Resumo**

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios com potencial funcional vem sendo impulsionado, visto os benefícios relacionados à promoção da saúde. Os produtos lácteos, como iogurte, quando adicionados de bactérias probióticas e componentes de diferentes frutas, podem apresentar além de propriedades probióticas, também potencial bioativo e são bem aceitos pelos consumidores. O objetivo do estudo foi elaborar um iogurte funcional dietético com adição de *L. lactis* subsp. *lactis* R7, extrato de araçá vermelho e xilitol, bem como, avaliar as características físico-químicas, bioativas e antioxidantes, a viabilidade da bactéria probiótica e a aceitação sensorial. O iogurte dietético com adição de *L. lactis* R7 e extrato de araçá vermelho demonstrou teor mais elevado de sólidos solúveis totais, carboidratos e proteínas, e menor quantidade de gordura, comparado aos tratamentos sem adição do extrato de araçá. E ainda, quantidades superiores de compostos fenólicos e antocianinas, e maior atividade antioxidante, visto a presença do extrato da fruta. A bactéria probiótica *L. lactis* R7, incorporada no iogurte, resistiu à passagem pelo trato gastrointestinal, e sua viabilidade ficou acima de 6 log UFC g<sup>-1</sup> em 14 dias de armazenamento, e ainda, demonstrou alta aceitabilidade sensorial. Portanto, o iogurte funcional dietético com adição de extrato de araçá vermelho e *L. lactis* R7 tem potencial como veículo de probióticos e compostos bioativos.

**Palavras-chave:** antioxidante, compostos fenólicos, bactérias ácido-láticas, probióticos, saúde.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Produtos alimentícios que contêm substâncias naturalmente presentes ou que foram adicionadas com propósito de fornecer benefícios à saúde, são considerados alimentos e bebidas funcionais (WILLIAMSON 2009). O mercado destes alimentos aumentou muito nos últimos anos e o foco no desenvolvimento de novos produtos também, visto a preocupação da população por uma alimentação mais saudável (GRANATO *et al.*, 2020).

Os alimentos funcionais podem auxiliar na redução do risco de diversas doenças, como dislipidemia, câncer, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral e doenças cardiovasculares. E dentre os alimentos com este potencial, pode-se destacar os produtos lácteos, pela possibilidade de adição de probióticos, prebióticos e/ou compostos bioativos de frutas, além do mais, são amplamente consumidos pela população em geral (GRANATO *et al.*, 2020).

Os probióticos, são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL *et al.* 2014). Estes são capazes de favorecer o equilíbrio e a reconstrução da microbiota intestinal, aumentar o número de microrganismos benéficos e suas atividades (HEMARAJATA e VERSALOVIC 2013) e participar na modulação da resposta imune, competindo com os patógenos por nutrientes e sítios de adesão (KANMANI *et al.*, 2013).

Os microrganismos mais utilizados pertencem ao grupo de bactérias ácido-láticas (BAL), como *Lactococcus lactis*, que são amplamente empregados como culturas iniciadoras na fabricação de diversos produtos lácteos. Outrossim, estudos realizados com o isolado *L. lactis* subsp. *lactis* R7, demonstraram seu potencial probiótico *in vitro* (dados não publicados), a viabilidade *in situ* (ROSOLEN *et al.*, 2022) e *in vivo* através da avaliação da estabilização de células carcinogênicas (JASKULSKI *et al.*, 2020).

Por outro lado, os compostos bioativos como compostos fenólicos, presentes em grande quantidade nas frutas, também são importantes para a promoção da saúde, e são provenientes do metabolismo especializado das plantas (DEL RIO *et al.*, 2013). No organismo humano, estes compostos têm sido atribuídos à capacidade de aumentar o gasto energético e a oxidação lipídica, ajudando no combate a doenças, como obesidade e diabetes tipo 2 (SHAHIDI e YEO, 2018).

Dentre os tipos de frutas, o araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) foi referido na literatura por possuir atividades biológicas, como atividades anticâncer, antidiabética, anti-inflamatória, anti-idade e antimicrobiana (PEREIRA *et al.*, 2018, 2020), devido principalmente, a presença de compostos fenólicos (VERMA *et al.*, 2013). Neste contexto, o desenvolvimento de novos produtos com potencial funcional, suplementados tanto com probióticos, como com extratos de frutas, é bastante promissor. E os derivados lácteos, além de serem muito bem aceitos pela população, permitem a adição de ingredientes na sua formulação e apresentam-se como adequada alternativa para entrega de probióticos através de alimentos (TERPOU *et al.*, 2019).

Ainda, em virtude da demanda por produtos mais saudáveis, se faz necessária a redução da concentração de açúcares (sacarose) em derivados lácteos, ou a substituição por adoçantes naturais como o xilitol, que pode ser uma vantagem, visto que este poliol possui similar poder adoçante à sacarose, mas com menor fornecimento de calorias e ainda não necessita da insulina para ser metabolizado, sendo indicado para diabéticos (KUMAR *et al.*, 2019).

Com este propósito, o objetivo do estudo foi elaborar um iogurte funcional dietético com adição de *L. lactis* subsp. *lactis* R7, extrato de araçá vermelho e xilitol bem como, avaliar as características físico-químicas, bioativas e antioxidantes, a viabilidade da bactéria probiótica e a aceitação sensorial.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Material**

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 foi isolada de ricota, identificada molecularmente (número de acesso KF87912.6) e caracterizada com potencial probiótico *in vitro*, em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (dados não publicados). As culturas iniciadoras utilizadas foram *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen®). Os frutos de araçá vermelho (AC 87) foram obtidos no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado (31°40'47"S, 52°26'24"W, RS, Brasil). O leite de vaca integral UHT (marca comercial Santa Clara) e xilitol foram adquiridos no comércio local.

### **5.2.2 Cultivo da bactéria probiótica e preparo do extrato de araçá (EA)**

A bactéria foi inoculada em soro de leite reconstituído e pasteurizado, e incubada à temperatura de 37 °C/12 h, sob agitação constante a 130 oscilações/minuto. Após, o cultivo celular foi centrifugado a 4165 g por 15 min a 4 °C (Eppendorf®), o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado leite em pó sem lactose reconstituído (10% m / v) e esterilizado e na sequência foi congelado e liofilizado (Liotop L101, Liobras®), permanecendo armazenado a -70 °C (Indrel IULT 335D) até sua utilização.

Para o preparo do extrato de araçá (EA), foi utilizado etanol 95%, na proporção 1:4 (amostra:solvente) e triturados em ultra-turrax (Ultra-turrax® IKA® Werke GmbH and Co), para completa homogeneização. O EA foi centrifugado e o sobrenadante rota evaporado (Rotavapor® R II Brand Buchi) para total eliminação de resíduos de solvente. Foi então liofilizado e armazenado a -70 °C (Indrel IULT 335D) até a utilização.

### **5.2.3 Elaboração do iogurte**

Para obtenção do iogurte foi utilizada 0,1% de culturas iniciadoras *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (~ 7 log UFC mL<sup>-1</sup>) em 1 litro de leite integral UHT, previamente submetido a tratamento térmico (95 °C / 5 min) e resfriado até a temperatura de 42 °C. A formulação foi incubada a 42 °C em iogurteira (Fun Kitchen) até atingir pH entre 4,5 - 4,6 e, após o término do processo, o iogurte foi resfriado a 4 °C. Posteriormente, foram adicionados 0,1% de *L. lactis* R7 (12 log UFC mL<sup>-1</sup>), e EA (4%) e adoçado com xilitol (4,6%), sob homogeneização moderada, identificado como tratamento YPA. As concentrações de extrato de araçá e de xilitol foram definidas sensorialmente, por meio de testes prévios. Ainda, foram elaborados outros dois tratamentos, em duplicata: iogurte apenas com as culturas iniciadoras + xilitol (Y) e iogurte com as culturas iniciadoras + *L. lactis* R7 + xilitol (YP). Todos os tratamentos foram armazenados em refrigeração (~ 4 °C), pelo período de 21 dias.

### **5.2.4 Caracterização físico-química do iogurte**

#### *5.2.4.1 Composição centesimal*

As determinações de umidade, cinzas, gordura e proteínas foram realizadas em triplicata, no período de até uma semana após a elaboração do iogurte,

conforme AOAC (2006). Carboidratos foram determinados através da soma dos resultados de umidade, cinzas, gordura e proteínas, dividido de 100.

#### 5.2.4.2 Teor de sólidos solúveis

Realizado em triplicata, através de °Brix, com leitura em refratômetro digital (Atago Pocket PAL-3) a 20 °C. O refratômetro foi calibrado com água destilada. As amostras foram pingadas individualmente sobre o prisma e posteriormente feita a leitura no período de até uma semana após a elaboração do iogurte.

#### 5.2.4.3 Acidez e pH

A acidez foi realizada por titulometria, com NaOH 0,1N e expressa em % de ácido láctico. As amostras foram tituladas com NaOH 0,1N até pH 8,1 (titulação potenciométrica). O pH foi realizado a 20 °C em potenciômetro (Metrohm pH lab 827) onde o eletrodo foi inserido na amostra e, uma vez estabilizado, foi feita a leitura (AOAC, 2006). As análises foram realizadas em 0, 7, 14 e 21 dias, em triplicata.

### 5.2.5 Análises de viabilidade ao trânsito gastrointestinal (TGI) *in vitro* e viabilidade sob armazenamento refrigerado

A simulação do TGI *in vitro* foi realizada pelo método contínuo e apenas com amostras do tratamento YPA, aos 7 dias de armazenamento em refrigeração. Para simular efeitos peristálticos, foram utilizadas diferentes intensidades de agitação nas quatro fases (antes da fase gástrica – BG; após a fase gástrica – AG; duodeno – D; e íleo - I), além da utilização de enzimas e variações de pH, específicos. A análise seguiu conforme descrito por Madureira *et al.* (2011). As contagens para verificação da estabilidade de *L. lactis* R7 foram realizadas em triplicata nas quatro fases, por contagem em ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS, Acumedia®), após incubação de 72h.

Para avaliar a viabilidade de *L. lactis* R7 sob armazenamento refrigerado, foi realizada contagem, em triplicata, nos períodos 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento em refrigeração (~ 4 °C). Diluições seriadas foram realizadas utilizando 10 g de amostra, inoculadas em placas de Petri contendo ágar MRS suplementado com 0,02% de sais biliares (Himedia®), para a contagem de *L. lactis* R7 e, em placas contendo ágar MRS para contagem das culturas iniciadoras, sendo incubadas por 72 h a 37 °C, em anaerobiose (APHA, 2002).

### **5.2.6 Análises microbiológicas**

A presença de *Salmonella* spp. e as contagens de *Staphylococcus* coagulase-positiva e bolores e leveduras, foram realizadas conforme preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2022), após 15 dias de armazenamento em refrigeração (APHA, 2002), antes da avaliação sensorial.

### **5.2.7 Antocianinas totais**

Realizada de acordo com Fuleki e Francis (1968), com algumas adaptações. Para a extração de antocianinas foi utilizado etanol acidificado com HCl 1,5 N, e a leitura realizada em espectrofotômetro (Genesys 10UV), a 535 nm utilizando cubeta de quartzo. Cianidina-3-glicosídeo foi utilizada como referência para a curva de calibração (0 - 0,04 mg mL<sup>-1</sup>) e os resultados expressos em mg de equivalente em cianidina-3-glicosídeo por 100 g de amostra.

### **5.2.8 Compostos fenólicos totais**

O protocolo seguiu conforme Swain e Hillis (1959), com algumas adaptações, utilizando Folin-Ciocalteu (0,25 N). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Genesys 10UV), utilizando cubeta de quartzo, a 725 nm. A quantidade de compostos fenólicos totais foi expressa em mg de ácido clorogênico por 100 g de amostra.

### **5.2.9 Atividade antioxidante**

#### *5.2.9.1 Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)*

Determinada através da inibição do radical DPPH, pelo método de Brand-Williams *et al.* (1995) e adaptado por Vinholes *et al.* (2011), utilizando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Trolox foi usado como referência para a curva de calibração e os resultados expressos em percentual. Resumidamente, 20 µL de cada extrato ou metanol (controle) foram adicionados a 280 µL 0,10 mM de solução metanólica de DPPH. As placas foram incubadas no escuro por 30 min e posteriormente, analisado em espectrofotômetro de microplacas (Spectra-Max 190, Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 515 nm.

#### *5.2.9.2 Radical hidroxila*

A capacidade de sequestro de radicais hidroxila foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Vinholes *et al.* (2011), com adaptações. Para isso, 25 µL de amostra, 110 µL de solução de FeSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (8 mM), 50 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7,18 mM) e 74,2 µL de solução salicílica solução ácida (3 mM), foram adicionadas às amostras. A placa foi agitada, manualmente, e incubada por 30 min a 37 °C em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA). Em seguida, a leitura foi feita no comprimento de onda de 515 nm.

#### **5.2.10 Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada por 100 avaliadores não treinados, conforme metodologia de ASTM e ISO 11136:2014 (ASTM, 2011; Internacional Norma ISO 11136, 2014). Cada provador recebeu 15 mL do iogurte YPA. No teste de aceitação foi usada uma escala hedônica de 9 pontos variando de desgostei a gostei muitíssimo, para os atributos cor, sabor, textura e aroma, e para o teste de intenção de compra, uma escala de 5 pontos, variando de certamente compraria e certamente não compraria. Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos / Universidade Federal de Pelotas sob CAAE: 26087219.0.0000.5317 e, os provadores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), antes do início da pesquisa.

O Índice de Aceitabilidade (IA) foi calculado, para cada atributo avaliado, através da seguinte fórmula:

$$IA = \frac{A \times 100}{B}$$

Onde, A = nota média obtida no atributo para o produto; B = nota máxima dada ao produto no respectivo atributo.

#### **5.2.11 Análise estatística**

Os dados, em triplicata, foram submetidos à análise de variância e as variáveis com efeito significativo foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada pelo programa Winstat – versão 2.11.

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Iogurtes dietéticos contendo a bactéria com potencial probiótico e extrato de araçá vermelho foram elaborados e apresentaram resultados promissores quanto a viabilidade de *L. lactis* R7 durante o armazenamento e quanto a tolerância ao sistema gastrointestinal, bem como características físico-químicas, de compostos bioativos e aceitação sensorial do produto.

### 5.3.1 Caracterização físico-química do iogurte

Na tabela 3, estão apresentados os valores médios encontrados para as análises físico-químicas dos tratamentos de iogurte (Y- iogurte; YP- iogurte probiótico; YPA- iogurte probiótico com extrato de araçá vermelho).

Foi observado que os resultados de umidade diferiram estatisticamente, apresentando uma redução em YPA, em relação a Y e YP. Para o teor de cinzas, o valor encontrado foi maior em YPA, com 0,83%; seguido de Y (0,77%) e YP (0,72%). Após a retirada de toda umidade, foi possível observar valores de matéria seca, sendo maior em YPA, corroborando com o resultado de umidade, que foi menor nesta amostra. As amostras de Y e YP não diferiram entre si.

O teor de sólidos solúveis totais e o percentual de carboidratos foi maior em YPA, devido ao extrato da fruta. A adição de ingredientes à base de frutas pode levar a um maior teor de açúcar no iogurte de frutas que corresponde a presença de glicose, frutose e sacarose, o que pode influenciar em uma maior aceitação do consumidor (SENADEERA *et al.*, 2018). O iogurte YP não diferiu do controle (Y).

O conteúdo de SST em todos os tratamentos ficou, em média, similar a outros iogurtes adicionados de frutas como, suco de aronia (12,6 °Brix) e suco de mirtilo (10 °Brix) (DIMITRELLOU *et al.*, 2020).

A quantidade de proteína variou de  $1,38 \pm 0,01$  a  $2,49 \pm 0,53$ , para YP e YPA, respectivamente, e YP apresentou  $1,82 \pm 0,12$ . Frutas de araçá demonstram cerca de 0,75 – 1,03 g / 100 g de proteína na composição (Pereira *et al.*, 2018), o que influenciou na quantidade de proteína superior no iogurte YPA. Shori *et al.* (2021), também verificaram quantidade superior de proteínas em iogurte com adição de extrato de frutas, comparado ao iogurte natural.

O teor de gordura foi maior em Y, seguido de YP e YPA, o que pode ser resultado do fato de que bactérias ácido-láticas, incluindo *L. lactis* R7 (YP e YPA), podem hidrolisar lipídios e produzir compostos responsáveis pelo *flavor*, durante o

processo de fermentação do iogurte (HOLLAND *et al.*, 2005). Consequentemente, o valor calórico de YP e YPA foi menor que Y, devido ao menor teor de gordura.

Provavelmente, a adição de 4% de extrato de araçá e o baixo teor de gordura no EA, também contribuiu para o menor teor de gordura. Em estudo realizado por Jung *et al.* (2016), verificaram um decréscimo no teor de gordura após a adição de extrato de ginseng vermelho (*Panax ginseng*), de 3,72% no iogurte natural, para 2,6% no iogurte suplementado com o extrato.

Com referência aos valores inferiores para proteínas e gorduras obtidos para o iogurte YPA, de acordo com a IN 46/2000, “os leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados poderão ter conteúdo de matéria gorda e proteínas inferiores, não devendo reduzir-se a uma proporção maior do que a porcentagem de substâncias alimentícias não-lácteas” (BRASIL, 2007).

Tabela 3. Caracterização físico-química dos diferentes tratamentos de iogurte adicionado ou não de *Lactococcus lactis* R7 e extrato de araçá vermelho.

Análises	Iogurtes		
	Y	YP	YPA
Umidade (%)	80,43 ± 0,33 <sup>a</sup>	81,60 ± 0,68 <sup>a</sup>	78,31 ± 0,80 <sup>b</sup>
Cinzas (%)	0,77 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,72 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>a</sup>
Matéria Seca (%)	19,56 ± 0,33 <sup>b</sup>	18,40 ± 0,68 <sup>b</sup>	21,68 ± 0,80 <sup>a</sup>
*SST (°Brix)	15,00 ± 0,40 <sup>b</sup>	14,41 ± 0,25 <sup>b</sup>	17,61 ± 1,21 <sup>a</sup>
Carboidratos (%)	14,15 ± 0,35 <sup>b</sup>	14,80 ± 0,60 <sup>b</sup>	17,77 ± 0,61 <sup>a</sup>
Proteína (%)	1,82 ± 0,12 <sup>ab</sup>	1,38 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,49 ± 0,53 <sup>a</sup>
Gordura (%)	2,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,09 <sup>c</sup>
Valor calórico (kcal/100g)	40,97 ± 0,88 <sup>a</sup>	32,34 ± 1,25 <sup>b</sup>	33,72 ± 3,00 <sup>b</sup>

\*SST: Sólidos solúveis totais. Y: iogurte; YP: iogurte probiótico; YPA: iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho. Médias (n=3) seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados das análises de acidez e pH dos iogurtes estão apresentados na figura 1. A acidez é responsável pela estabilidade dos iogurtes, impedindo que ocorram condições favoráveis para o crescimento de bactérias patogênicas. Pode-se observar (Fig.1) que a acidez foi maior em YPA aos demais tratamentos, durante o armazenamento, apresentando acidez variando de 1,4, 1,05, 0,98 e 1,22 em percentual de ácido láctico nos períodos de 0, 7, 14 e 21, respectivamente.

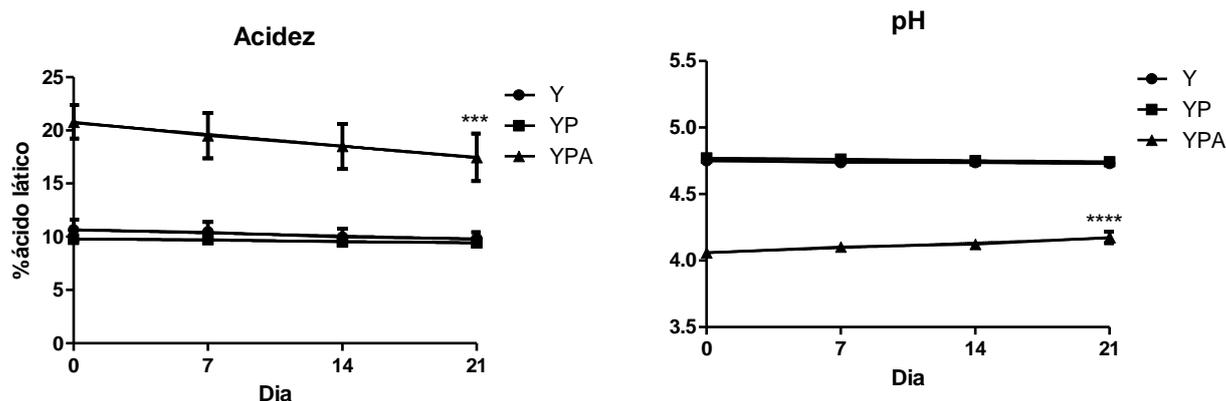


Figura 1. Acidez e pH dos tratamentos durante 21 dias de armazenamento em refrigeração. Y: iogurte; YP: iogurte probiótico; YPA: iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho. \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparando com os demais tratamentos após Two-way ANOVA e teste post hoc Bonferroni.

A acidez do iogurte deve-se, principalmente, à conversão da lactose em ácido láctico pelas culturas bacterianas (CHEN *et al.*, 2017; BORGONOVÍ; CASAROTTI; PENNA, 2021) e pela influência da adição do EA, que possui pH ácido, em torno de 3,53 (HAMINIUK *et al.*, 2006). Conseqüentemente, a diminuição do pH ocorreu em YPA e valores de pH foram superiores em Y e YP. Em iogurte preparado com extrato da folha de araçá, o pH diminuiu conforme o aumento da concentração de compostos fenólicos do extrato (ZIENA e ABD-ELHAMID, 2009).

Os maiores valores de acidez no tratamento contendo extrato de araçá (YPA) pode-se dar pela maior disponibilidade de fontes de carboidratos dos frutos para a atividade metabólica das culturas iniciadoras do iogurte (*S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), e da bactéria probiótica *L. lactis* R7, resultando em maior quantidade de ácidos orgânicos. Senadeera *et al.* (2018) e Espírito Santo *et al.* (2012), também relataram que a acidez total em iogurte com extrato de frutas foi maior, do que em seus respectivos iogurtes controle.

Os resultados médios de pH para YPA (4,09 a 4,17), se enquadram na faixa recomendada segundo a Instrução Normativa nº 46 de 24 de outubro de 2007, que estabelece o pH ideal para identidade e qualidade do iogurte entre 3,6 e 4,5 (BRASIL, 2007). Não houve variação significativa no pH, durante o período de armazenamento.

### 5.3.2 Compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante

Na tabela 2, observa-se que a adição de extrato de araçá vermelho ao iogurte com probióticos (YPA), aumentou significativamente o conteúdo fenólico total e exerceu alta atividade antioxidante quando comparados aos demais tratamentos.

Assim, pode-se observar que o tratamento YPA apresentou quantidade superior, aos demais, de compostos fenólicos ( $404,79 \pm 22,96$  mg GAE.100 g<sup>-1</sup>). Já é referido na literatura, um teor elevado destes compostos em frutos de araçá deste genótipo (AC87), como kaempferol ( $4,86 \pm 0,02$  µg / g), quercetina ( $44 \pm 1$  µg / g), malvidina-3-O-glicosídeo ( $19,9 \pm 0,1$  µg / g) e ácido elágico ( $43 \pm 2$  µg / g) (PEREIRA *et al.*, 2020). Enquanto os compostos fenólicos presentes em Y e YP são, provavelmente, devido à presença de polifenóis no leite, que derivam principalmente dos compostos proteicos e redutores (CHOUCHOU LI *et al.*, 2013) e da ração bovina (BESLE *et al.*, 2010).

Em iogurtes suplementados com polpas de diferentes frutas (caqui, manga e goiaba) em proporções variadas (5, 10 e 15%, p / p), foi verificado aumento nos compostos fenólicos totais e nos compostos flavonoides totais conforme o aumento das proporções de polpa (AMIN GOUDA e MERVAT HAMED 2020).

A presença de antocianinas foi verificada apenas no tratamento YPA ( $30,50 \pm 7,42$  mg.100 g<sup>-1</sup>), novamente, devido a adição do extrato de araçá, conferindo coloração avermelhada ao iogurte. Szołtysik *et al.* (2021) referem que adição de bagas de madressilva proporcionou iogurtes de coloração roxa o que ampliou o potencial antioxidante do produto.

Medina *et al.* (2011) relataram que os extratos de araçá com teor mais elevado de compostos fenólicos foram aqueles com maior atividade antioxidante. Isso também pode ser observado para os diferentes tratamentos de iogurte, pois demonstraram que a presença do EA no iogurte melhorou o desempenho de eliminação de radicais livres.

O tratamento YPA foi responsável pela maior inibição dos radicais DPPH e hidroxila, apresentando assim, maior atividade antioxidante. Extratos de araçá vermelho são potentes eliminadores de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que provavelmente estão associados ao seu elevado conteúdo fenólico, e esta propriedade bioativa foi mantida quando os extratos foram adicionados ao produto lácteo (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Tabela 4. Compostos fenólicos totais, antocianinas e capacidade de inibição dos radicais DPPH e hidroxila dos diferentes tratamentos de iogurtes armazenados sob refrigeração.

Análises	Iogurtes		
	Y	YP	YPA
Compostos fenólicos <sup>1</sup>	189,01 ± 16,04 <sup>b</sup>	232,17 ± 20,82 <sup>b</sup>	404,79 ± 22,96 <sup>a</sup>
Antocianinas <sup>2</sup>	*nd	nd	30,50 ± 7,42 <sup>a</sup>
DPPH (%)**	6,14 ± 0,91 <sup>b</sup>	4,77 ± 0,58 <sup>c</sup>	15,35 ± 0,45 <sup>a</sup>
Hidroxila (%)**	20,47 ± 0,46 <sup>b</sup>	19,79 ± 2,16 <sup>b</sup>	48,00 ± 1,51 <sup>a</sup>

\*nd: Não detectado.<sup>1</sup>Compostos fenólicos totais expresso em mg do equivalente ácido clorogênico.100g<sup>-1</sup> amostra; <sup>2</sup>Antocianinas expressa em mg equivalente a cianidina-3-glicosídeo.100g<sup>-1</sup>; \*\*Resultados foram expressos em porcentagem de inibição. Médias (n=3) seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Y: iogurte; YP: iogurte probiótico; YPA: iogurte probiótico suplementado com extrato de araquá vermelho.

Prestes *et al.*, (2021) caracterizaram leite fermentado probiótico com adição de polpa de guabiroba (*Campanesia xanthocarpa* O. berg), também uma fruta nativa do Brasil, e verificaram teor de compostos fenólicos de 824,8 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, ainda superior ao encontrado na amostra de YPA, neste estudo.

Em iogurte preparado com leite integral UHT, suplementado com farinha de casca de uva, foi verificado teor mais elevado de fenólicos (+55%) e atividade antioxidante (+80%) do que os obtidos no iogurte controle, resultados semelhantes ao deste estudo (MARCHIANI *et al.*, 2016).

Em sorvete probiótico suplementado com polpa de butiá (*Butia odorata*), foi verificada inibição de 17,6 ± 1,1% do radical DPPH, a uma concentração de 30% da polpa (CRUXEN *et al.*, 2017). Potencial este, semelhante ao verificado para YPA, considerando que o iogurte foi suplementado com apenas 4% de EA. O potencial antioxidante observado em YPA poderá inibir ou inativar a ação dos radicais, auxiliando na prevenção e tratamento de doenças, como por exemplo, neurodegenerativas (SILVA *et al.*, 2022), aterosclerose, enfisema e câncer (HAYASHI e IGUCHI, 2010).

Na sequência, os resultados das análises de viabilidade da bactéria probiótica *L. lactis* R7, e aceitação sensorial, referem-se ao iogurte referente ao tratamento YPA.

### 5.3.3 Viabilidade do probiótico em YPA sob armazenamento e após o trânsito gastrointestinal (TGI) *in vitro*

A viabilidade de *L. lactis* R7 em YPA durante 21 dias de armazenamento sob refrigeração está apresentada na Figura 2.

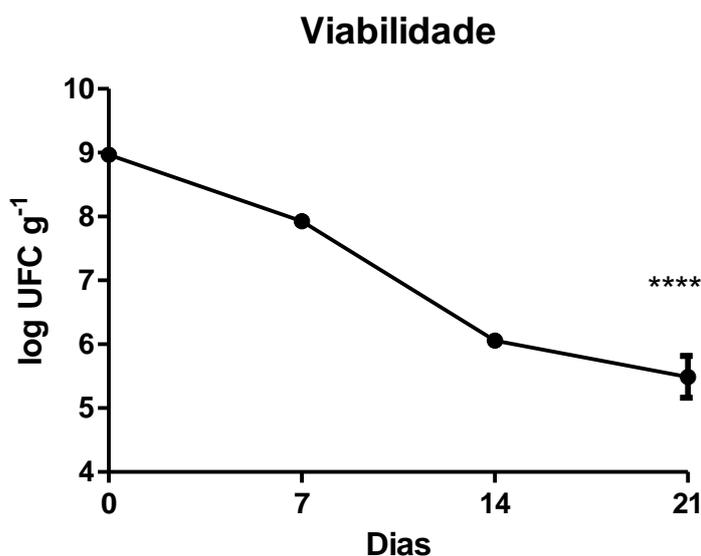


Figura 2. Viabilidade de *L. lactis* R7 em iogurte contendo probiótico e extrato de araçá vermelho (YPA), durante 21 dias de armazenamento em refrigeração. \*\*\*\* $p < 0,0001$  para efeito tempo.

É possível observar que *L. lactis* R7 adicionada no tratamento YPA apresentou redução das células viáveis durante o período de 21 dias de armazenamento em refrigeração ( $\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 2). O decréscimo ocorrido, no período, foi de  $3,47\text{ log UFC g}^{-1}$ , sendo que *L. lactis* R7 variou de  $8,96\text{ log UFC g}^{-1}$  no dia 0 (zero) para  $5,49\text{ log UFC g}^{-1}$  no 21º dia, no entanto, aos 14 dias a viabilidade estava em  $6,05\text{ log UFC g}^{-1}$ .

No iogurte, a viabilidade dos probióticos pode ser afetada por componentes alimentares, como açúcares, proteínas, gorduras, minerais, vitaminas, agentes aromatizantes, aminoácidos e antioxidantes; fatores relacionados ao processamento, como tratamentos térmicos, homogeneização e temperatura de fermentação; e fatores microbiológicos, como tipo de cepas e nível de inóculo (MEYBODI *et al.*, 2020).

É relatado ainda, que a adição de material à base de frutas como suco ou polpa pode afetar negativamente o crescimento e a viabilidade de bactérias probióticas em produtos alimentícios devido à acidez e à presença de compostos

antimicrobianos, o que pode explicar a redução da viabilidade de *L. lactis* R7 ao longo dos 21 dias de armazenamento (BURITI *et al.*, 2007).

Em leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* La-5 e suplementado com extrato de tâmara, também foi verificada redução na viabilidade do probiótico, de 8,16 log UFC g<sup>-1</sup> no tempo 0, para 6,44 log UFC g<sup>-1</sup> após 14 dias de armazenamento a 4 °C (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2018).

Para conferir benefícios à saúde, recomenda-se no momento do consumo do alimento, uma concentração de bactérias probióticas, acima de 6 log UFC g<sup>-1</sup> de produto (PAPADOPOULOU *et al.*, 2018). Entretanto, não significa que ao consumir um alimento com concentração inferior de determinada bactéria probiótica, a sua ação esteja inviabilizada, segundo Fontana *et al.* (2013), essa concentração mínima garantirá que a bactéria supere as barreiras do trato gastrointestinal (TGI), e possa colonizar o intestino, o sítio de ação da bactéria, comportamento esse que é dependente da cepa utilizada.

Durante a passagem pelo trânsito no trato gastrointestinal simulado, *L. lactis* R7 não sofreu alterações (Tabela 5), mantendo uma alta viabilidade de 8,69 ± 0,075 log UFC g<sup>-1</sup> ao atingir a porção intestinal.

Essas bactérias produzem concentrações de exopolissacarídeos durante o crescimento, o que pode ser essencial para a sobrevivência destas, com efeito protetor contra a acidez extrema ou em contato com sais biliares do intestino (BOKE *et al.*, 2010). Ainda, a gordura do leite pode ter um efeito protetor ao redor das células, e a fração lipídica contribui para a biossíntese de ácidos graxos concentrados ao redor da membrana plasmática probiótica (FLORENCE *et al.*, 2016; VERRUCK *et al.*, 2015), sendo assim, o iogurte é um produto considerado o mais adequado transportador de probiótico (TERPOU *et al.*, 2019).

Tabela 5. Viabilidade de *L. lactis* subsp. *lactis* R7 em iogurte funcional *diet* com extrato de araçá, em trato gastrointestinal simulado.

Fase	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> R7 (log UFC g <sup>-1</sup> )
Antes da fase gástrica (BG)	8,38 ± 0,145 <sup>a</sup>
Gástrica (G)	8,67 ± 0,095 <sup>a</sup>
Duodeno (D)	8,55 ± 0,070 <sup>a</sup>
Íleo (I)	8,69 ± 0,075 <sup>a</sup>

Médias (n=3) seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

A contagem de *L. lactis* R7 foi semelhante ao verificado por Prestes *et al.*, (2021), que avaliaram a viabilidade do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 presente em leite fermentado probiótico com adição de polpa de guabiroba. Não foi verificada diminuição na contagem após o processo digestivo, sendo a contagem inicial de  $9,29 \pm 0,09 \log \text{ UFC g}^{-1}$  e a final de  $9,41 \pm 0,08 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , assim como verificado neste estudo. Desta forma, *L. lactis* R7 mostrou-se resistente às condições do TGI, mantendo superior concentração, quando relacionada aos estudos que evidenciam a necessidade de uma concentração, de pelo menos,  $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$  ou  $\text{mL}^{-1}$  do probiótico no alimento (COSTA *et al.*, 2019).

Em relação à qualidade microbiológica, o iogurte YPA demonstrou resultados satisfatórios, segundo os parâmetros microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2022).

#### **5.3.4 Análise sensorial**

A avaliação sensorial foi realizada a fim de verificar o aroma, cor, sabor e textura de YPA. No total, foram 100 avaliadores não treinados. O índice de aceitabilidade (IA) dos atributos de YPA avaliados é considerado muito bom, tendo em vista que, todos os parâmetros tiveram IA superior a 80%, além do mais um produto é considerado aceitável desde que obtenha um índice  $\geq 70\%$  (DUTCOSKY, 1996). O maior IA foi para aroma (96,1%), seguido de sabor (86,7), cor (83,7) e textura (81,1%).

Foi ainda, realizado o teste de intenção de compra para o iogurte YPA, onde 81% dos avaliadores relataram que certamente ou provavelmente comprariam o produto.

Embora YPA tenha apresentado nível mais elevado de acidez em relação aos demais tratamentos sem a adição de extrato de araçá, houve boa aceitabilidade do consumidor. A adição de frutas pode levar a um maior teor de açúcar natural do iogurte, levando a uma maior aceitação do consumidor, porém Şengül *et al.* (2012), observaram quanto ao aspecto global uma maior aceitabilidade para o iogurte contendo polpa de fruta azeda.

Hoje, muitos consumidores buscam produtos mais saudáveis, com teor reduzido de açúcares e propriedades funcionais. Normalmente, os iogurtes

adoçados podem conter entre 10 e 13% de açúcar adicionado (MOORE *et al.*, 2020). Estudo que avaliou amostras de iogurte preparadas com sacarose e adoçantes naturais como o xilitol demonstrou que o iogurte preparado com xilitol (10 g / 100 g), obteve o maior índice para o atributo sabor (CHADHA *et al.*, 2022). O iogurte avaliado neste estudo foi adoçado com xilitol, que quando adicionado em iogurtes como substituto da sacarose, tem bom poder adoçante (GASMI BENAHMED *et al.*, 2020).

Produtos de iogurte comercializados no Reino Unido, por exemplo, reduziram pelo menos 13% do teor médio de açúcar em 2 anos. No Brasil com a mudança atual na legislação da rotulagem de alimentos (RDC nº 429 / 2020), onde constará uma lupa alertando sobre o alto teor de açúcar e uma tarja preta com informação do produto, será urgente a demanda por novos produtos com menor adição de açúcar.

#### **5.4 CONCLUSÃO**

O iogurte funcional dietético com adição de extrato de araçá vermelho e *Lactococcus lactis* R7 tem potencial como veículo de probióticos e compostos bioativos. Os parâmetros físico-químicos apresentados foram adequados, com teor mais elevado de sólidos solúveis totais, carboidratos e proteínas, e menor quantidade de gordura, se comparado aos demais tratamentos (sem adição do extrato de araçá). Além disso, apresentou elevado teor de compostos fenólicos e antocianinas, e maior atividade antioxidante, demonstrando a influência da adição de extrato de araçá vermelho.

*Lactococcus lactis* R7 resistiu à passagem pelo trato gastrointestinal, indicando sua viabilidade em YPA após o processo de digestão, e manteve no produto a viabilidade em 14 dias de armazenamento em refrigeração.

O iogurte YPA teve uma ótima aceitação, com maior IA para aroma (96,1%) entre os atributos avaliados, provavelmente, influenciada pela adição do extrato de araçá, e consequente aumento dos sólidos solúveis totais.

## 6 CAPÍTULO 4

### **iogurte suplementado com probiótico *Lactococcus lactis* R7 e extrato de araçá vermelho no tratamento de camundongos C57BL/6 induzidos à diabetes tipo 2**

Manuscrito a ser submetido na revista Nutrition Research

Fator de Impacto: 3.315

ISSN: 1879-0739

#### **Resumo**

O aumento na prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes tipo 2, tem incentivado o desenvolvimento de alimentos mais saudáveis e que proporcionem benefícios à saúde. *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), popularmente conhecido como araçá, já demonstrou bioatividades, que podem estar relacionadas ao alto teor de vitamina C e antioxidantes. Além disso, evidências sugerem que existam associações favoráveis entre o consumo de probióticos e o perfil metabólico entre indivíduos com diabetes, devido principalmente, a efeitos intraluminais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antihiperlipidêmico de iogurte suplementado com o probiótico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 (*L. lactis* R7) e extrato de araçá vermelho, em ensaio *in vivo*, utilizando como modelo biológico, camundongos C57BL/6 adultos, e avaliando parâmetros de estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio, tióis não proteicos e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), teste de tolerância a glicose e teste de tolerância a insulina, hemograma e perfil bioquímico. Os animais alimentados com dieta padrão (grupo saudável) e dieta hipercalórica (induzidos à DM2) foram tratados com iogurte (I), iogurte e probiótico (IP), iogurte e extrato de araçá (IA), iogurte com probiótico e extrato de araçá (IPA), e com soro fisiológico (controle). Não foi observada diferença para os parâmetros de estresse oxidativo em nenhum dos tratamentos. Os tratamentos I, IA e IPA foram efetivos na redução da glicemia em 60 minutos no TTG, indicando que estes animais foram afetados positivamente, evitando o risco de desenvolver resistência à insulina. Os tratamentos contendo araçá e a bactéria probiótica *L. lactis* R7, afetaram positivamente os níveis glicêmicos, de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL dos camundongos. Isso indica que a formulação do IPA, poderá ser promissora para a população que busca um alimento funcional, e que forneça benefícios à saúde.

**Palavras-chave:** *Psidium cattleianum* Sabine, estreptozotocina, glicemia, *in vivo*.

## 6.1 Introdução

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, ação de insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica da DM2 está associada a complicações em longo prazo, como hipertensão e anormalidades do metabolismo das lipoproteínas, causando incidência aumentada de doença aterosclerótica cardiovascular, periférica arterial e cerebrovascular (HUANG *et al.*, 2020). O aumento na prevalência de diabetes é definido como um dos desafios mais importantes para os sistemas de saúde nos próximos anos (KAISER *et al.*, 2018).

Evidências apontam que as doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes, podem ser largamente prevenidas por meio de ações de promoção de saúde. Devido a isso, o interesse da população acerca de alimentos mais saudáveis e que proporcionem benefícios à saúde é uma demanda crescente (SINGH e JAYA, 2021).

O consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes está consistentemente, correlacionado a uma incidência reduzida de DM2 (FUSTER *et al.*, 2021). Ainda, a inibição das enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase por extratos de frutas contendo quantidades elevadas de compostos fenólicos, podem atenuar profundamente os níveis pós-prandiais da glicose sanguínea (PEREIRA *et al.*, 2020). *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), popularmente conhecido como araçá, já demonstrou bioatividade, como antioxidante, anticâncer, antidiabética, anti-inflamatória, anti-idade e antimicrobiana, que pode estar relacionada ao alto teor de vitamina C e antioxidantes, podendo ser valioso para a indústria farmacêutica e de alimentos (PEREIRA *et al.*, 2018).

Além dos compostos bioativos presentes nos alimentos, um crescente corpo de evidências sugere que existam associações favoráveis entre o consumo de probióticos e o perfil metabólico entre indivíduos com diabetes (KASINSKA e DRZEWOSKI, 2015). Vários são os benefícios proporcionados pelo consumo de probióticos, incluindo atividade antimicrobiana contra patógenos intestinais, modulação do sistema imunológico, redução dos níveis de colesterol e glicose sanguíneos, redução nos níveis inflamatórios, prevenção de alguns tipos de câncer, e melhora do desequilíbrio microbiano (AMBALAM *et al.*, 2016; ORLANDO *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2021).

Os mecanismos sugeridos entre o consumo de probióticos e a atividade antihiperlipidêmica, envolvem principalmente efeitos intraluminais, diretos na mucosa intestinal e na modulação da microbiota (DUAN *et al.*, 2015; STENMAN *et al.*, 2015). Contudo, devido às crescentes pesquisas acerca das propriedades bioativas de compostos presentes em alimentos, assim como das bactérias com potencial probiótico, são necessários mais estudos para o desenvolvimento de produtos alimentícios que forneçam benefícios à saúde do consumidor. Porém, para o desenvolvimento e caracterização de novos produtos, é necessário que ocorra experimentos que comprovem essa alegação funcional, e os modelos de experimentação animal constituem uma importante ferramenta para essa pesquisa.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial hipoglicêmico de iogurte suplementado com o probiótico *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 (*L. lactis* R7) e extrato de araçá vermelho, em ensaio *in vivo*, utilizando camundongos C57BL/6.

## 6.2. Material e Métodos

### 6.2.1 Animais e procedimentos experimentais

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Brasil (CEEA 18783-2020). Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, e mantidos em gaiolas, em ambiente com controle de temperatura ( $19 \pm 2$  °C), luz (12:12 horas ciclo escuro/claro) e água *ad libitum*. Setenta e dois (n=72) animais, com dois meses de idade, foram divididos em dois grupos: Grupo saudável e Grupo induzido à diabetes tipo 2 (Figura 1). Cada grupo recebeu cinco tratamentos por gavagem: controle (soro fisiológico); iogurte - I; iogurte + araçá - IA; iogurte + probiótico - IP; iogurte + araçá + probiótico - IPA.

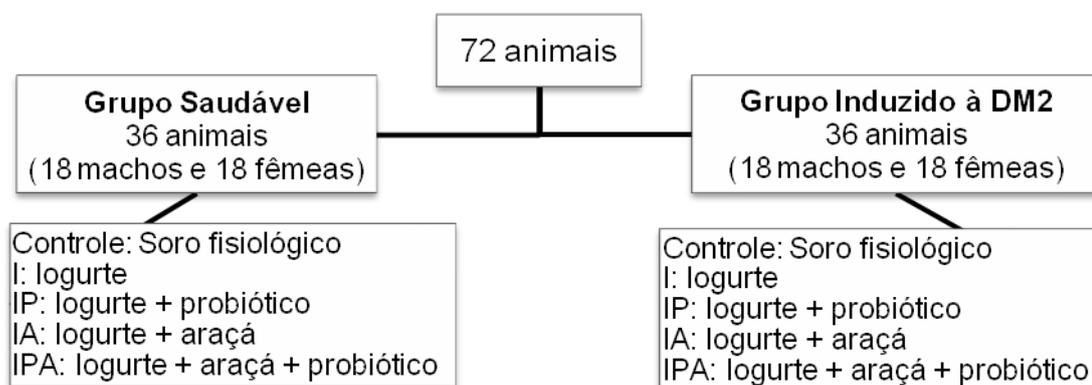


Figura 3. Experimento *in vivo* representando os dois grupos de animais e respectivos tratamentos

Para o desenvolvimento de diabetes no grupo induzido à DM2, foi administrada dieta hipercalórica (10 meses) e uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (150 mg/kg de peso, dividido em duas doses, sendo a primeira após 3 meses, e a segunda após o quinto mês).

A composição da dieta hipercalórica administrada para o grupo induzido à DM2 consistiu em 25% de ração padrão + 34% de leite condensado + 23% de amido de milho + 8% de sacarose + 10% de lipídios. Essa mistura era elaborada uma vez por semana, durante todo o período experimental, com textura sólida e seca, formando tabletes. Enquanto que para o grupo saudável, era administrada apenas ração padrão. Após a indução ao DM2 (10 meses), foi iniciado o tratamento com o iogurte, por gavagem, durante 30 dias.

Para a formulação do iogurte, o leite UHT integral foi fermentado com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (~7 log UFC/g) e após interrompida a fermentação (pH 4,5-4,6), foi suplementado com *L. lactis* R7 (12 log UFC.g<sup>-1</sup>) (0,1%); extrato de araçá vermelho AC87 (4%), de acordo com os respectivos tratamentos, sendo todos os tratamentos adoçados com xilitol (4,6%), armazenados sob refrigeração (~ 4 °C).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 foi isolado de ricota, identificado molecularmente (acesso KF87912.6) em estudos anteriores (dados não publicados). O extrato de araçá vermelho foi preparado utilizando etanol 95% (1:4, p/v), a partir da polpa/casca do fruto. Os homogeneizados (Ultra-turrax® IKA® WerkeGmbHHandCo) foram centrifugados (Eppendorf), o sobrenadante coletado e, em seguida, concentrados por evaporação à vácuo (Rotavapor® R II Marca Buchi), até a eliminação total do etanol, congelados e, posteriormente liofilizados.

### 6.2.2 Teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT)

Ao final do experimento (indução ao DM2 + tratamento = 11 meses), a glicemia de jejum foi avaliada (jejum de 4 horas) por meio de glicosímetro (Accu-ChekPerforma, Roche, São Paulo, Brasil). Em seguida, 2 g de glicose/kg de peso corporal foram injetados intraperitonealmente e o sangue da veia da cauda foi coletado novamente aos 15, 30 e 60 minutos, para medir os níveis de glicose. Para ITT, a glicemia foi avaliada (jejum de 4 horas) e após, a insulina (0,5U / kg de peso

corporal (Novolin Regular, Novo Nordisk, São Paulo, Brasil) foi administrada por via intraperitoneal e amostras de sangue da cauda foram obtidas aos 15, 30 e 60 minutos, para avaliar os níveis de glicose no sangue. Os resultados foram expressos pela taxa constante de decaimento da glicose ( $K_{ITT}$ ), índice que corresponde à queda da glicose expressa em % / minuto. Quanto maior o  $K_{ITT}$ , maior a sensibilidade à insulina.

### 6.2.3 Eutanásia

Os animais foram submetidos a um jejum de 4 horas e, posteriormente, sedados com isoflurano e eutanasiados por punção cardíaca, seguindo os princípios éticos da experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004). Os órgãos foram retirados, pesados e armazenados a -80 °C, para posterior análises.

### 6.2.4 Ensaio ex-vivo

#### 6.2.4.1 Análises de Estresse Oxidativo

As análises de estresse oxidativo foram realizadas a partir do fígado dos camundongos, utilizando 0,06 g de tecido homogeneizados em 150 µL de tampão fosfato pH 7,4, e centrifugadas. O sobrenadante foi ainda, diluído em 1:10 em tampão fosfato pH 7,4 para posteriores análises.

##### 6.2.4.1.1 Níveis de Espécies Reativas (ERO)

Os níveis de ERO foram determinados por um método espectrofluorimétrico, usando o ensaio de 2',7'-diclorofluoresceíndiacetato (DCHF-DA). A oxidação de DCHF-DA para diclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi medida para a detecção de ERO intracelular. A emissão de intensidade de fluorescência DCF foi registrada em 520 nm (com excitação de 480 nm), 60 minutos após a adição de DCHF-DA ao meio (fluorômetro Shimadzu RF-5301 PC) (LOETCHUTINAT *et al.*, 2005). Os níveis de ERO foram expressos por fluorescência DCF unida.

##### 6.2.4.1.2 Níveis de Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de TBARS foram usados como medida de peroxidação lipídica e foram determinados de acordo com um método previamente descrito (OHKAWA *et*

*al.*, 1979). Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada à mistura reacional: ácido tiobarbitúrico (0,8 %), dodecil sulfato de sódio e ácido acético (pH 3,4), e incubada a 95°C por 1 hora. A absorvância foi medida a 532 nm. Os resultados foram expressos como nmol de malondialdeído (MDA) / mg de proteína.

#### **6.2.4.1.3 Tióis Não Proteicos (NPSH)**

Os níveis de NPSH foram determinados pelo método de Ellman (1959). Este método é utilizado para avaliar os níveis de defesas antioxidantes não enzimáticas. O sobrenadante foi misturado (1:1, volume / volume) com 10 % de ácido tricloroacético (TCA). Os tubos foram centrifugados a 900 x g por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* de proteína foi descartado e os grupos de tiol livre (SH) foram determinados no sobrenadante. Adicionou-se uma alíquota do sobrenadante a tampão fosfato de potássio 1 M pH 7,4 e ácido 5,5'ditiobis-(2-nitrobenzóico) 10 mM (DTNB). A reação de cor foi medida a 412 nm em um espectrofotômetro. Os níveis de NPSH foram expressos como nmol NPSH / g de tecido.

#### **6.2.4.1.4 Quantificação de Proteínas**

A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (1 mg . mL<sup>-1</sup>) como padrão. Os resultados obtidos serviram de base para o cálculo das demais dosagens.

#### **6.2.4.2 Perfil Bioquímico**

O sangue total dos camundongos foi coletado por punção cardíaca e transferido para tubos Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) contendo EDTA. Após, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. O plasma foi separado e utilizado na avaliação dos parâmetros bioquímicos utilizando kits comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brazil), no analisador automático Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Os parâmetros mensurados no estudo foram: colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicérides, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e glicemia de jejum.

#### **6.2.4.3 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por meio de two-way ANOVA seguida do teste de Tukey. Para comparação de apenas dois grupos, foi usado o teste t-

Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Para os testes de tolerância à glicose e à insulina foram feitas análises comparando cada tempo nas curvas. Para o teste de sensibilidade à insulina foi usado adicionalmente a constante de decaimento de glicose ( $K_{ITT}$ ) entre os tempos 0 e 15 minutos após a injeção de insulina.

### 6.3. Resultados e discussão

Não houve diferença estatística entre as fêmeas saudáveis e as induzidas à DM2 no peso inicial, final e no ganho de peso. Também não foi verificada diferença entre estes grupos no consumo médio de ração e CEA. Os camundongos machos saudáveis apresentaram peso inicial superior aos induzidos à DM2 ( $p < 0,05$ ), porém o ganho de peso mensal foi menor ( $p < 0,05$ ), o que resultou em um peso final sem diferença entre os grupos. O consumo médio de ração e CEA não diferiram entre os grupos.

Tabela 6. Consumo de ração, peso inicial e final, ganho de peso e CEA dos grupos de animais saudáveis e induzidos à DM2

Parâmetros	Grupos de animais do estudo		
	Saudáveis (n=36)	Induzidos à DM2 (n=36)	P
	<b>Fêmeas</b>		
Peso inicial (g)	20,49±0,51	20,17±0,30	0,614
Peso final (g)	25,17±0,48	26,33±1,45	0,419
Ganho de peso mensal (g)	0,58±0,31	0,77±0,41	0,613
Ganho de peso total (g)	4,62±0,53	6,16±1,26	0,340
Consumo médio de ração (g)	80,81±1,42	91,25±5,21	0,056
CEA	0,006±0,00	0,007±0,00	0,463
	<b>Machos</b>		
Peso inicial (g)	26,92±0,49	23,38±0,69	<0,050
Peso final (g)	32,67±0,61	33,83±1,35	0,498
Ganho de peso mensal (g)	0,48±0,41	2,01±0,23	<0,050
Ganho de peso total (g)	5,74±0,57	10,46±1,69	0,055
Consumo médio de ração (g)	70,4±1,64	73,15±1,24	0,225
CEA	0,009±0,00	0,01±0,00	0,079

Valores representados em média ± erro padrão da média. CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar. Teste t Pareado.

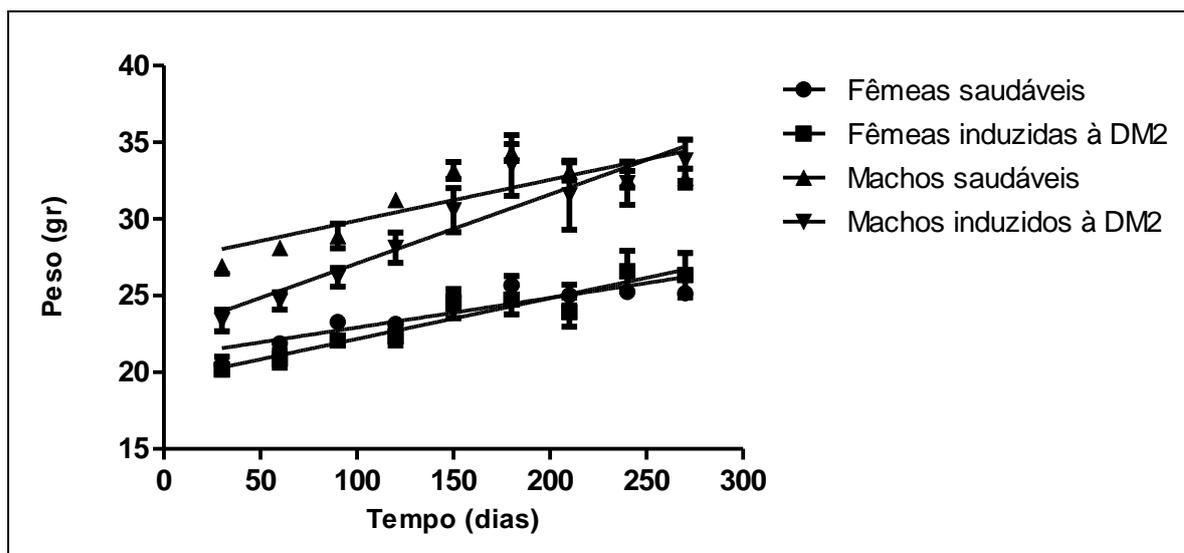


Figura 4. Ganho de peso (média  $\pm$  desvio padrão) dos grupos saudável e induzidos à DM2. Regressão linear. ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni.

A modificação da dieta padrão comercial para roedores a partir da adição de alimentos mais calóricos, entre eles banha, leite condensado e açúcar, apresentou boa aceitação pelos camundongos, sendo capaz de elevar o peso corporal em níveis superiores aos que recebiam apenas ração padrão, para os machos. Porém, este aumento alterou apenas parcialmente alguns parâmetros avaliados neste estudo, especialmente no que se refere ao colesterol e triglicerídeos.

A densidade energética da dieta hiperlipídica é maior que a dieta padrão e apesar de o consumo ter sido semelhante nos dois grupos, o ganho ponderal dos machos induzidos à DM2 foi superior aos saudáveis.

### 6.3.1 Teste de tolerância à glicose (TTG)

O teste de tolerância à glicose (TTG) é utilizado para determinar a capacidade de manter a glicemia em homeostase, medindo principalmente a capacidade de captação de glicose pelos tecidos e a capacidade do pâncreas de secretar insulina, após a injeção de uma elevada quantidade de glicose.

Na figura 3 está disposto os resultados obtidos no TTG das fêmeas e machos, respectivamente, dos grupos saudável e induzidos à DM2, os quais receberam os tratamentos I, IP, IA, IPA e o controle. O TTG baseia-se em fornecer uma sobrecarga de glicose em um curto espaço de tempo, quantificando o tempo necessário para que a glicemia retome seus níveis basais.

No grupo de fêmeas saudáveis é possível observar que no tempo 0, o tratamento IP demonstrou níveis inferiores de glicemia quando comparados aos

tratamentos I ( $p < 0,0486$ ) e IA ( $p < 0,0441$ ), e não diferiu de IPA. Já no grupo induzido à DM2, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos no tempo 0, assim como em 15 minutos.

No tempo de 30 minutos, os resultados do grupo saudável não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos e o controle, já no grupo das fêmeas induzidas à DM2, o tratamento I apresentou glicemia inferior ao tratamento IP ( $p < 0,0360$ ). Ao final, no tempo de 60 minutos, foi possível verificar diferença apenas entre os tratamentos IA e IP do grupo induzido à DM2, onde se observou níveis menores de glicemia em IA ( $p < 0,0383$ ), os quais não diferiram dos tratamentos I e IPA.

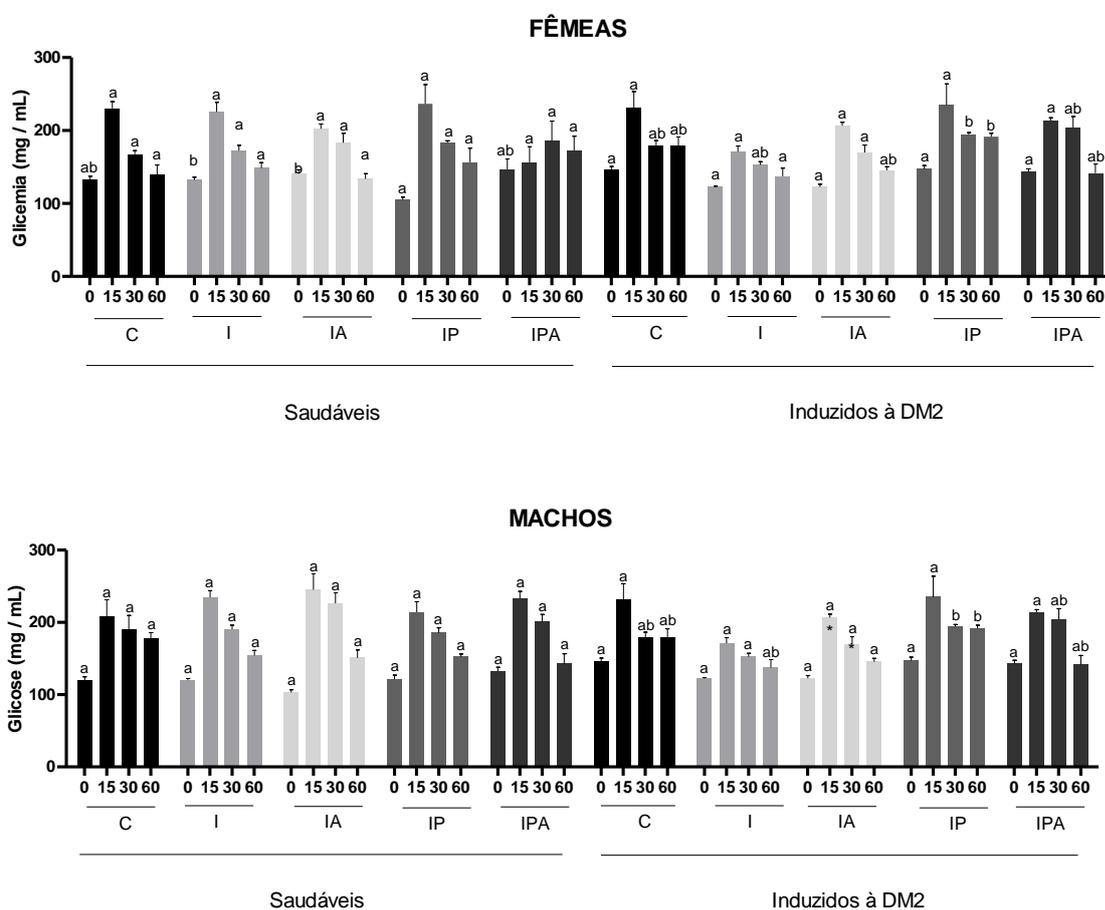


Figura 5. Teste de tolerância a glicose (TTG) em camundongos fêmeas e machos saudáveis e induzidos à DM2, nos tratamentos iogurte (I), iogurte+araçá (IA), iogurte+probiótico (IP) e iogurte+araçá+probiótico (IPA) e controle, no período de até 60 minutos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos para os mesmos tempos entre tratamentos no mesmo grupo.

Em camundongos machos não foi verificada diferença significativa no tempo 0 e 15 minutos entre os tratamentos tanto no grupo saudável, quanto no grupo

induzido à DM2. Já no tempo de 30 minutos, tratamento I demonstrou glicemia inferior aos animais que receberam o tratamento IP, nos animais induzidos à DM2. E no tempo de 60 minutos, IA demonstrou níveis glicêmicos menores que IP nos induzidos.

### 6.3.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)

A contribuição da sensibilidade à insulina para a intolerância à glicose foi investigada pela determinação do decaimento da glicose plasmática em função do tempo após a injeção de insulina. Esta medida da sensibilidade à insulina de todo o corpo, pode ser expressa pela taxa constante de decaimento da glicose ( $K_{ITT}$ ), onde valores maiores indicam maior sensibilidade geral à insulina. Neste estudo não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para todos os grupos, tanto fêmeas quanto machos.

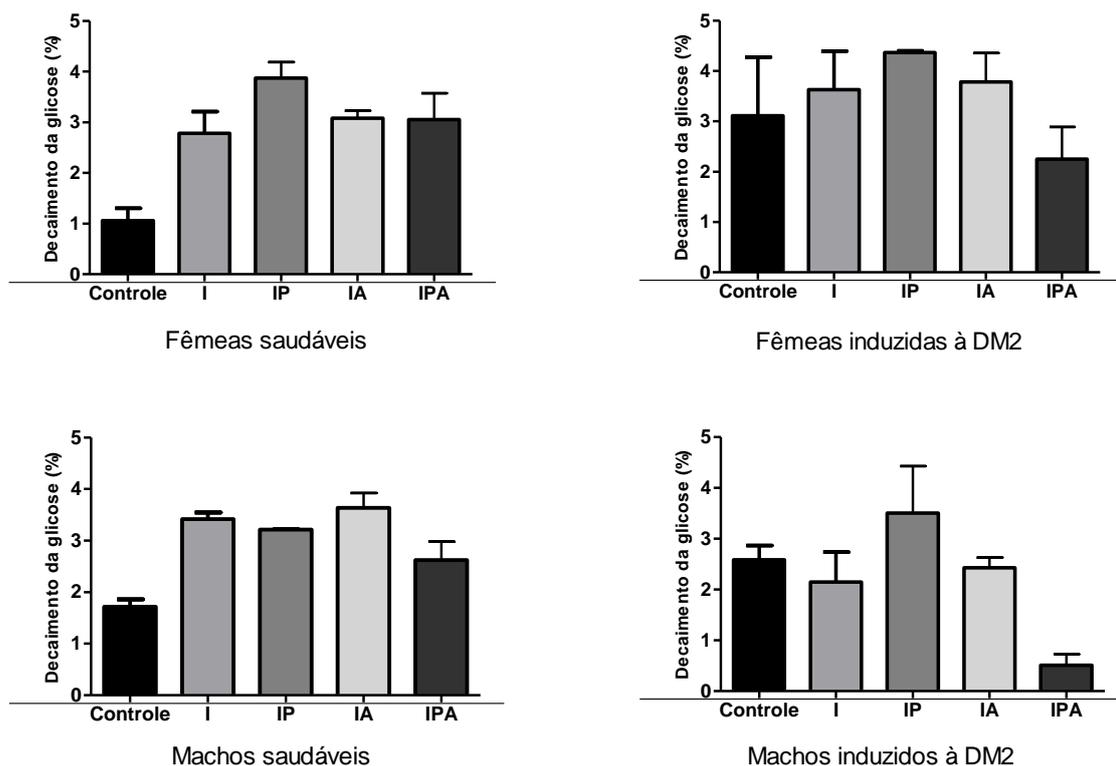


Figura 6. Índice de decaimento da glicose ( $K_{itt}$ ) em camundongos fêmeas e machos saudáveis e induzidas à DM2, nos tratamentos (I), iogurte+araçá (IA), iogurte+probiótico (IP) e iogurte+araçá+probiótico (IPA) e controle.

O tratamento com extratos de folhas de *Psidium x durbanensis* Baijnath & Ramcharunined (Myrtaceae) hidrometanólicas, melhorou a tolerância à glicose, a

resistência à insulina e as enzimas antioxidantes, mas não a insulina plasmática em animais diabéticos em comparação com os controles, respectivamente (MBARA *et al.*, 2022). Os autores relacionam essas atividades com os fitoconstituintes bioativos presentes na planta, como ácidos orgânicos, álcoois, vitaminas, terpenoides e ésteres, encontrados nos extratos.

Ainda, Viana *et al.* (2022) verificaram que os probióticos e principalmente, os simbióticos, exercem atividade de redução da resistência insulínica, níveis de insulina sérica e glicose plasmática. Porém, neste estudo, o mesmo não foi observado, indicando que a presença do extrato de araçá juntamente com a bactéria probiótica, não manteve a mesma eficácia.

### **6.3.3 Estresse Oxidativo**

Os níveis de TBARS, NPSH e ERO estão representados na figura 4, e foram utilizados como marcadores do estresse oxidativo no fígado dos camundongos tratados com I, IA, IP e IPA. Os tratamentos dos grupos saudáveis e induzidos à DM2 não influenciaram nos níveis dos marcadores avaliados ( $p > 0,05$ ).

Nos níveis de lipoperoxidação hepática, avaliada por TBARS, foi verificada diferença significativa apenas para os machos do controle do grupo induzido à DM2, que demonstrou níveis superiores deste marcador ao controle saudável, indicando maior estresse oxidativo nos animais que receberam a dieta hipercalórica.

O grupo de tióis não-proteicos (NPSH), compreendem um mecanismo antioxidante não-enzimático, e é representado, principalmente, pela glutathiona reduzida. Semelhante ao observado para TBARS, os níveis deste marcador se mostraram superior para I do grupo de fêmeas induzidas à DM2. Já as fêmeas saudáveis demonstraram níveis de EROs superiores às induzidas à DM2 no controle.

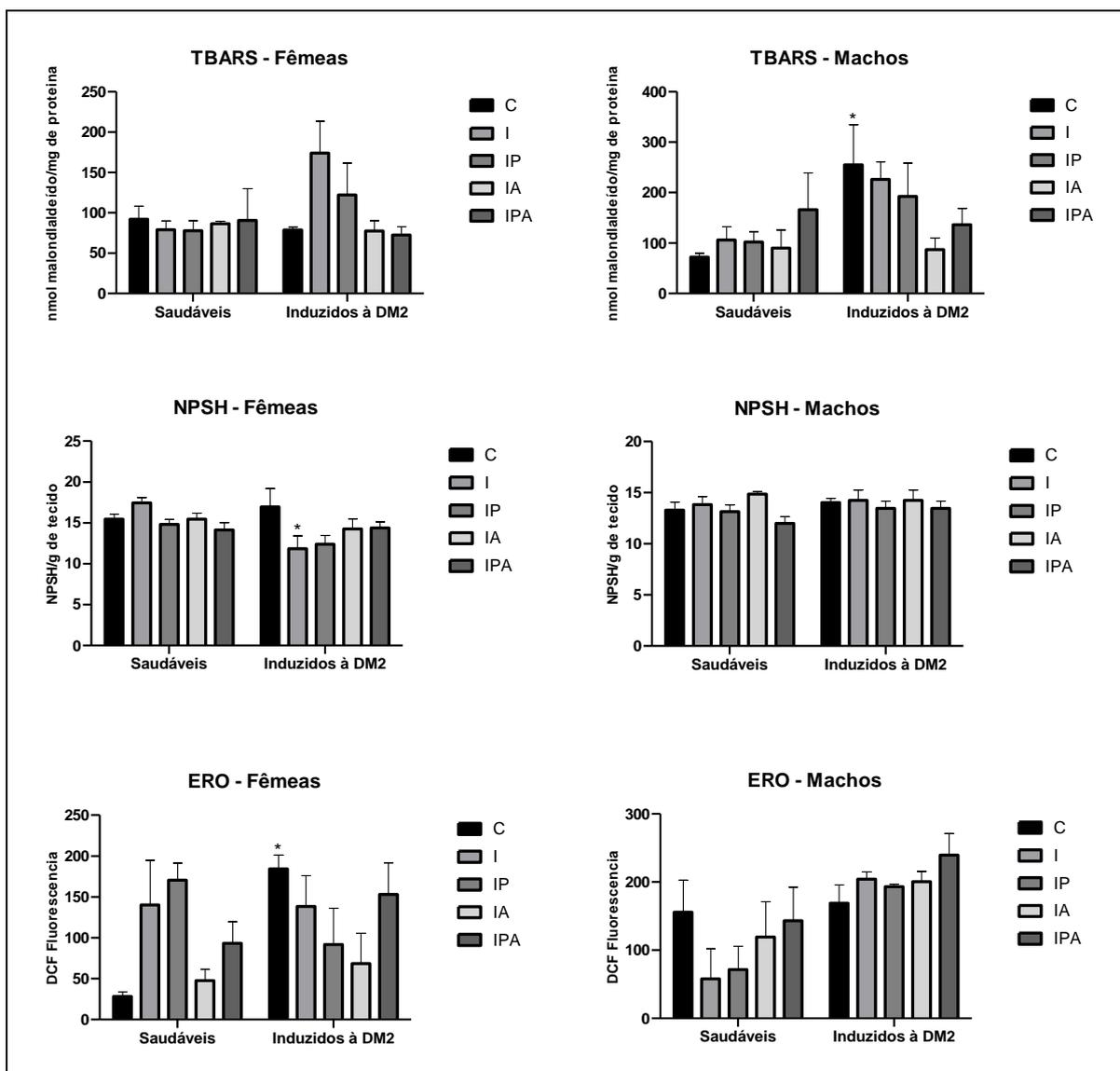


Figura 7. Efeitos do tratamento de iogurte (I), iogurte+probiótico (IP), iogurte+araçá (IA) e iogurte+araçá+probiótico (IPA) e controle em grupos saudáveis e induzidos à DM2, nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), níveis de lipoperoxidação (TBARS) e níveis de tióis não proteicos (NPSH) em fígado de camundongos. \*Diferença significativa entre os grupos, para cada tratamento. Valores de  $p < 0,05$  após teste de Sidak.

O desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes resulta no estresse oxidativo, podendo ocorrer a degradação de estruturas biológicas essenciais para o funcionamento orgânico celular e proporcionar o desenvolvimento ou agravamento de doenças (VELLOSA *et al.*, 2021). Os antioxidantes por sua vez, eliminam os radicais livres para reduzir este estresse. O extrato de araçá utilizado na formulação do iogurte desenvolvido neste estudo foi caracterizado anteriormente quanto à atividade antioxidante *in vitro*, e verificou-se um grande potencial frente a captura de radicais livres (PEREIRA *et al.*, 2020). Porém, neste estudo, com o

percentual de 4% adicionado ao produto, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos que continham extrato de araquá e os demais.

#### **6.3.4 Análises bioquímicas**

Os resultados obtidos para avaliação do perfil bioquímico dos animais do grupo saudável e do grupo induzido à DM2 estão apresentados na Tabela 7. A glicemia de jejum encontra-se dentro dos parâmetros normais em ambos os grupos. Entretanto, é possível verificar que no grupo saudável, as fêmeas que receberam os tratamentos I, IA e IPA, apresentaram glicemia menor quando comparados aos tratamentos IP e controle. Já no grupo induzido à DM2, IP demonstrou glicemia inferior à IPA, I e controle. Em machos saudáveis, o tratamento IP também demonstrou glicemia inferior aos tratamentos de IPA e I, corroborando com os resultados observados nos animais induzidos à DM2, onde IP demonstrou glicemia inferior a IPA e ao controle.

A glicemia foi menor no grupo saudável para o tratamento IPA e controle nas fêmeas, e no controle nos camundongos machos.

Os tratamentos com a presença do probiótico e/ou do extrato de araquá demonstraram redução dos índices de triglicérides. Nas fêmeas, o tratamento IPA demonstrou quantidade inferior dentre os demais, no grupo saudável. E no grupo induzido à DM2, os tratamentos IP e IA demonstraram maior redução desta gordura, quando comparado ao controle. Nos machos saudáveis, os índices não diferiram entre os tratamentos; já no grupo induzido à DM2, o tratamento IP demonstrou diferença entre os demais tratamentos, indicando que foi mais efetivo na redução dos níveis de triglicérides no sangue.

Entre os grupos saudáveis e induzidos à DM2 nas fêmeas, os tratamentos IP, IA e IPA tiveram uma redução mais acentuada dos níveis de triglicérides no grupo induzido.

No grupo de fêmeas saudáveis, os tratamentos IP e IA reduziram em aproximadamente 56 e 35% os níveis de colesterol total, respectivamente, e no grupo induzido à DM2, IPA reduziu em 55%. O tratamento IA também foi efetivo nos machos saudáveis, com uma redução de 42% em relação ao controle, e os induzidos à DM2, IPA demonstrou uma redução de quase 51% nos níveis, indicando que a relação do extrato de araquá e/ou combinado com o probiótico, pode auxiliar na redução dos níveis de colesterol sanguíneo. As fêmeas tratadas com IP e IA, e o

controle demonstraram níveis inferiores desta gordura no grupo que recebeu a dieta padrão. Níveis mais elevados da fração HDL foram verificados para o tratamento IP, nas fêmeas do grupo saudável. Já nos machos, não se verificou diferença entre os tratamentos e o controle. E entre os grupos, os machos induzidos à DM2 demonstraram níveis superiores de HDL no tratamento I e controle, que os saudáveis.

A fração LDL nas fêmeas saudáveis demonstrou quantidades inferiores no tratamento IP, e no grupo induzido à DM2 todos os tratamentos foram efetivos em comparação ao controle, principalmente os tratamentos contendo extrato de araquá, evidenciando uma redução de quase 60% nos níveis de LDL. Para os machos saudáveis, o tratamento IA foi, também, mais efetivo na redução dos níveis de LDL no sangue, seguido de IPA. O mesmo foi verificado para o grupo induzido à DM2, onde os tratamentos mais efetivos foram IA e IPA, com uma redução de 50% e 55%, respectivamente. Os tratamentos IP e IA no grupo saudável demonstraram níveis inferiores de LDL quando comparados ao grupo induzido à DM2 nas fêmeas, assim como nos machos, que os saudáveis apresentaram índices inferiores desta lipoproteína.

Foi observada uma redução significativa nos níveis do colesterol VLDL nas fêmeas saudáveis, pelo tratamento IPA. E nas induzidas à DM2 todos os tratamentos foram efetivos, porém IP e IA demonstraram mais efetividade. Nos animais machos saudáveis, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos; já nos induzidos, IP demonstrou níveis inferiores de VLDL nos tratamentos comparados ao controle. E ainda, o grupo afetou os níveis de VLDL em IPA, onde se verificou teor menos elevado nos saudáveis.

As enzimas ALT e AST são enzimas presentes nos hepatócitos e a elevação dos níveis no sangue podem ser indicadores de doença hepática. As fêmeas saudáveis que receberam o tratamento IPA apresentaram níveis inferiores de ALT, já nas induzidas à DM2, níveis inferiores foram observados no tratamento IP. Nos animais machos os níveis de ALT variaram em relação ao controle, onde apenas IA nos saudáveis, foi inferior; e nos induzidos, IP, IA e IPA demonstraram redução. Ainda, os níveis desta enzima foram superiores no grupo saudável quando comparada aos induzidos.

Os menores índices de AST nas fêmeas saudáveis foram em I e IP; e nas induzidas à DM2, no tratamento IPA. Nos machos saudáveis, o valor de AST foi

menor em IP e nos induzidos à DM2, todos os tratamentos demonstraram níveis inferiores de AST quando comparados ao controle. Os níveis de AST foram superiores nos tratamentos do grupo saudável.

Tabela 7 – Perfil bioquímico comparando o efeito do tratamento com I, IP, IA e IPA e controle em grupos de camundongos saudáveis e induzidos à DM2

	Fêmeas saudáveis					Fêmeas induzidas à DM 2				
	Controle	I	IP	IA	IPA	Controle	I	IP	IA	IPA
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	77±4,24 <sup>b*</sup>	71,2±1,69 <sup>a</sup>	76,8±2,54 <sup>b*</sup>	66,1±2,40 <sup>a</sup>	62,7±3,25 <sup>a*</sup>	94,8±2,00 <sup>c</sup>	80,3±1,34 <sup>b</sup>	60,9±1,55 <sup>a</sup>	65,1±1,55 <sup>ab</sup>	72,3±1,55 <sup>b</sup>
Triglicérides (mg.dL <sup>-1</sup> )	62,5±2,12 <sup>c</sup>	52±2,89 <sup>b</sup>	59,6±0,91 <sup>bc*</sup>	62±1,48 <sup>c*</sup>	41±2,96 <sup>a*</sup>	68±1,41 <sup>c</sup>	48,3±0,91 <sup>b</sup>	37,5±0,70 <sup>a</sup>	40,2±2,54 <sup>a</sup>	51,5±2,12 <sup>b</sup>
Colesterol (mg.dL <sup>-1</sup> )	110±7,07 <sup>b*</sup>	137,5±2,12 <sup>c</sup>	59,1±4,54 <sup>a*</sup>	72±2,82 <sup>a*</sup>	130,3±5,23 <sup>c*</sup>	185±4,94 <sup>d</sup>	144±1,48 <sup>c</sup>	158,8±1,65 <sup>c</sup>	122,5±3,53 <sup>b</sup>	82,1±3,04 <sup>a</sup>
HDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	25±4,88 <sup>b</sup>	30,6±4,88 <sup>ab</sup>	43,5±2,12 <sup>a</sup>	36,1±2,68 <sup>ab</sup>	26,6±1,89 <sup>ab</sup>	35,4±3,39 <sup>a</sup>	29,1±3,39 <sup>a</sup>	32,7±1,76 <sup>a</sup>	26±2,82 <sup>a</sup>	21,5±7,75 <sup>a</sup>
LDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	72,4±0,84 <sup>c*</sup>	94,4±4,90 <sup>d</sup>	10,1±2,65 <sup>a*</sup>	29,6±3,40 <sup>b*</sup>	90,7±3,90 <sup>d*</sup>	136±1,90 <sup>d</sup>	104,3±1,90 <sup>b</sup>	114,25±6,01 <sup>c</sup>	89,2±3,05 <sup>b</sup>	54,91±1,69 <sup>a</sup>
VLDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	12,5±0,42 <sup>c</sup>	10,4±0,60 <sup>bc</sup>	11,9±0,18 <sup>c*</sup>	12,4±0,29 <sup>c*</sup>	8,18±0,59 <sup>a*</sup>	13,6±0,28 <sup>c</sup>	9,37±0,60 <sup>b</sup>	7,5±0,14 <sup>a</sup>	8,0±0,50 <sup>ab</sup>	10,3±0,29 <sup>b</sup>
ALT (U.L <sup>-1</sup> )	27±1,41 <sup>a*</sup>	49±2,79 <sup>b*</sup>	45,5±2,12 <sup>b*</sup>	76±4,24 <sup>c*</sup>	21±2,86 <sup>a*</sup>	109±2,80 <sup>c</sup>	93,5±3,53 <sup>b</sup>	26,5±3,53 <sup>a</sup>	113±4,24 <sup>c</sup>	92±2,82 <sup>b</sup>
AST (U.L <sup>-1</sup> )	143±4,24 <sup>b</sup>	106±2,54 <sup>a</sup>	103±1,41 <sup>a</sup>	178±2,82 <sup>c</sup>	214±5,65 <sup>d</sup>	151,9±1,55 <sup>b</sup>	164,2±3,88 <sup>b</sup>	185±2,47 <sup>c</sup>	187,3±3,74 <sup>c</sup>	127,6±3,32 <sup>a</sup>
	Machos saudáveis					Machos induzidos à DM2				
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	63±1,41 <sup>a*</sup>	74±3,95 <sup>b</sup>	61,4±2,26 <sup>a</sup>	63,2±2,54 <sup>a</sup>	73,4±1,97 <sup>b</sup>	97,4±0,84 <sup>c</sup>	69,6±2,33 <sup>a</sup>	63,0±1,76 <sup>a</sup>	70,5±1,20 <sup>ab</sup>	72,5±0,70 <sup>b</sup>
Triglicérides (mg.dL <sup>-1</sup> )	50±2,82 <sup>a*</sup>	53±2,82 <sup>a</sup>	42,5±3,53 <sup>a</sup>	48,1±3,04 <sup>a</sup>	50±2,82 <sup>a</sup>	64,5±3,53 <sup>b</sup>	63±1,14 <sup>b</sup>	41,5±2,12 <sup>a</sup>	54,55±3,4 <sup>b</sup>	56,5±4,94 <sup>b</sup>
Colesterol (mg.dL <sup>-1</sup> )	91,2±1,76 <sup>b*</sup>	87,5±0,70 <sup>b*</sup>	102±1,41 <sup>b*</sup>	52,7±7,49 <sup>a*</sup>	80±4,24 <sup>b*</sup>	193±4,94 <sup>c</sup>	147,1±5,86 <sup>b</sup>	146±1,41 <sup>b</sup>	101±1,48 <sup>a</sup>	95,5±2,12 <sup>a</sup>
HDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	20,75±3,18 <sup>a*</sup>	20,2±3,95 <sup>a*</sup>	22,3±2,40 <sup>a</sup>	21,7±3,18 <sup>a</sup>	17,2±2,54 <sup>a</sup>	38,7±0,98 <sup>a</sup>	32,1±2,68 <sup>ab</sup>	31,7±3,25 <sup>ab</sup>	22,2±2,53 <sup>ab</sup>	21,7±3,25 <sup>ab</sup>
LDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	65,2±1,13 <sup>bc*</sup>	60,3±2,40 <sup>bc*</sup>	72,2±3,11 <sup>c*</sup>	30,9±4,34 <sup>a*</sup>	52,6±1,97 <sup>b*</sup>	145,6±1,97 <sup>c</sup>	106,1±2,96 <sup>b</sup>	104,8±6,78 <sup>b</sup>	73,6±3,35 <sup>a</sup>	64,8±1,13 <sup>a</sup>
VLDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	10±1,69 <sup>a*</sup>	10,6±0,56 <sup>a</sup>	8,5±0,70 <sup>a</sup>	9,63±0,60 <sup>a</sup>	10±0,56 <sup>a</sup>	12,9±0,70 <sup>b</sup>	12,6±0,28 <sup>b</sup>	8,3±0,42 <sup>a</sup>	10,9±0,69 <sup>b</sup>	11,3±0,98 <sup>b</sup>
ALT (U.L <sup>-1</sup> )	65±1,41 <sup>b</sup>	122,5±2,12 <sup>d*</sup>	86±2,83 <sup>c*</sup>	50±1,41 <sup>a*</sup>	78,5±3,53 <sup>c*</sup>	71±1,41 <sup>d</sup>	86±2,80 <sup>e</sup>	44,5±2,12 <sup>a</sup>	38,5±0,70 <sup>a</sup>	55,5±2,12 <sup>c</sup>
AST (U.L <sup>-1</sup> )	166,5±4,95 <sup>bc</sup>	172±2,82 <sup>c*</sup>	21,5±0,70 <sup>a*</sup>	155±1,41 <sup>b</sup>	158,5±2,12 <sup>b*</sup>	212,1±2,68 <sup>d</sup>	117,5±3,53 <sup>a</sup>	141,5±2,12 <sup>b</sup>	156,5±4,94 <sup>c</sup>	128±2,89 <sup>a</sup>

I: iogurte; IP: iogurte probiótico; IA: iogurte com araçá; IPA: iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho. Letras na mesma linha dentro de cada grupo são consideradas diferentes pelo teste de Tukey (p<0,0001). \*Diferença significativa comparando o mesmo tratamento entre os grupos saudáveis e induzidos à DM2. Lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT).

Cardoso *et al.* (2017), verificaram atividades anti-hiperglicêmica, antidislipidêmica e antioxidante para o extrato de araçá, após avaliarem *in vivo*, o efeito do consumo de extratos desta fruta durante 21 dias, frente a injeção de dexametasona - DEX (fármaco utilizado como indutor de hiperglicemia em animais). Outro estudo avaliou o efeito protetor e o potencial antioxidante do extrato de araçá em animais tratados com cisplatina. Após o tratamento, foi observada redução nos níveis de glicose, colesterol LDL e colesterol total, e ainda, melhora nos níveis de gordura no fígado (NORA *et al.*, 2014). Assim como neste estudo, os tratamentos com extrato de araçá também influenciaram na redução dos níveis glicêmicos de fêmeas, saudáveis e induzidas à DM2.

A inibição da digestão de carboidratos pela inibição da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase salivar e pancreática na borda em escova do intestino delgado, influenciando na inibição da absorção de glicose e estimulação da secreção de insulina é uma das principais evidências dos mecanismos de ação dos compostos polifenólicos, que estão bastante presentes no extrato de araçá, sob os efeitos hipoglicemiantes no organismo (HANHINEVA *et al.*, 2010). Pereira *et al.* (2020), já demonstraram o potencial de inibição destas enzimas digestivas por extratos de araçá do mesmo genótipo utilizado neste estudo (AC87).

Outro mecanismo de ação está relacionado a ativação da AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato), que desempenha um papel crítico na proteção das células  $\beta$  pancreáticas contra a glicolipototoxicidade; inclusive, algumas drogas antidiabéticas como metformina e tiazolidinedionas (TZDs) são conhecidas por ativar a AMPK. Há relatos de que a quercetina, presente no araçá vermelho, inibiu o dano das células  $\beta$  pancreáticas induzidas por citocinas através da supressão da ativação do fator nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B) nas células RINmF5 (KIM *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2009).

Níveis elevados de triglicérides, colesterol total e colesterol LDL foram verificados neste estudo, no grupo que recebeu dieta hipercalórica para indução de DM2, e o tratamento IPA diminuiu significativamente estes índices, atuando assim, como potencial agente redutor de gordura sanguínea. A circulação aumentada de colesterol LDL e triglicérides no sangue altera a atividade das proteínas adiponectina e leptina, estando assim envolvidas em várias síndromes como esteatose da obesidade, diabetes e aterosclerose (O'CONNELL *et al.*, 2010). Os altos níveis de triglicérides, colesterol total, colesterol LDL e baixos níveis de HDL no plasma são

fortemente associados ao aumento do risco de doença cardíaca coronariana (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

Pereira *et al.* (2021) avaliaram a atividade inibitória *in vitro* da lipase em extratos de araçá AC87 (o mesmo acesso utilizado na presente pesquisa na formulação do iogurte – IA e IPA), e verificaram potencial inibição desta enzima, e de forma mais eficiente que o Orlistat (medicamento com ação inibidora da lipase). Também foi verificada quantidades elevadas de compostos fenólicos com ação antioxidante para o AC87.

Além disso, a ação de bactérias probióticas está relacionada com atividades biológicas, como a redução dos níveis de colesterol e glicose sanguíneos (ORLANDO *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2021). Barz *et al.* (2018) verificaram que *L. rhamnosus* (Lb102) e *Bifidobacterium* (Bf141) administradas por oito semanas em uma concentração de  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>, reduziram a obesidade induzida pela dieta, acúmulo de gordura visceral e inflamação, concomitantemente com melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Ainda, aumentaram os marcadores de integridade intestinal em associação com mudanças seletivas na composição da microbiota intestinal.

Alguns mecanismos de ação dos probióticos podem estar relacionados com este potencial, como a colonização e normalização de comunidades microbianas intestinais; exclusão competitiva de patógenos e produção de bacteriocinas; modulação das atividades enzimáticas relacionadas à metabolização de uma série de carcinógenos e outras substâncias tóxicas; e produção de ácidos graxos voláteis (PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

Para determinação de lesões hepáticas, a concentração da enzima ALT é considerada um melhor indicador para avaliar a integridade das células do fígado do que a AST (XU *et al.*, 2015), provavelmente por ser predominantemente encontrada neste órgão, especificamente nas mitocôndrias dos hepatócitos (BOTROS e SIKARIS, 2013). Neste estudo, as duas enzimas encontram-se em níveis elevados no sangue, indicando uma possível lesão hepática.

#### **6.4. Conclusão**

Camundongos C57BL/6 adultos alimentados com dieta padrão (grupo saudável) e também hipercalórica (induzidos à DM2), não demonstraram diferença

significativa de peso e consumo entre animais do mesmo sexo, e dos parâmetros de estresse oxidativo entre os tratamentos.

Os tratamentos I, IA e IPA em animais fêmeas e machos induzidos à DM2 foram efetivos para a diminuição da glicemia em 60 minutos no TTG, e I, IA e IP demonstraram efetividade na proteção contra a resistência à insulina em ITT, indicando que estes animais foram afetados positivamente, evitando o risco de desenvolver resistência à insulina.

O potencial hipoglicêmico foi verificado em iogurtes contendo extrato de araçá e a bactéria probiótica *L. lactis* R7, concomitante ou isoladamente. E, além disso, estes tratamentos afetaram positivamente os níveis de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL dos camundongos, chegando a uma redução de 60% nos níveis de colesterol LDL após tratamentos com IPA.

O iogurte IPA poderá ser uma formulação promissora para a população que busca um alimento funcional, especialmente, por estar relacionada à redução dos níveis de glicemia, triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL, conforme constatado em camundongos.

## **7 CAPITULO 5**

### **Probiotics: therapeutic strategy on the prevention and treatment of obesity, type 2 diabetes mellitus and celiac disease - Review**

As páginas 85 a 110 não serão disponibilizadas, por motivo de sigilo.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nicho de desenvolvimento de novos produtos que apresentam a adição de compostos bioativos e que possuam alegações funcionais é uma tendência, a fim de incentivar uma alimentação mais saudável e proporcionar benefícios à saúde. O iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá vermelho foi desenvolvido com o objetivo de modular os níveis glicêmicos de indivíduos, e, para isso, uma série de análises de caracterização são necessárias a fim de garantir a qualidade do produto.

Após o processo de digestão *in vitro*, alguns compostos fenólicos permaneceram, como o ácido cafeico, hidroxibenzóico, e sinápico. E ainda, a atividade inibitória de radicais como hidroxila e enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase aumentam após o processo de digestão simulado. A caracterização do iogurte probiótico suplementado com *Lactococcus lactis* R7 e extrato de araçá vermelho demonstrou teor elevado de sólidos solúveis totais, carboidratos e proteínas, e menor quantidade de gordura, comparado aos tratamentos sem adição do extrato de araçá. E ainda, quantidades superiores de compostos fenólicos e antocianinas, e maior atividade antioxidante, visto a presença do extrato da fruta. A bactéria probiótica incorporada no iogurte, resistiu à passagem pelo trato gastrointestinal, e sua viabilidade ficou acima de  $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , e ainda, demonstrou boa aceitabilidade sensorial.

O experimento *in vivo*, não evidenciou diferença entre os parâmetros de estresse oxidativo em nenhum dos tratamentos - iogurte (I), iogurte e probiótico (IP), iogurte e extrato de araçá (IA), iogurte com probiótico e extrato de araçá (IPA), e com soro fisiológico (Controle). Os tratamentos I, IA e IPA foram efetivos na redução da glicemia em 60 minutos no teste de tolerância a glicose, evitando o risco de desenvolver resistência à insulina. Os tratamentos contendo araçá e o probiótico afetaram positivamente os níveis glicêmicos, de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL dos camundongos. Isso indica que a formulação do IPA, poderá ser promissora para a população que busca um alimento funcional, e que forneça benefícios à saúde.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, S.M.; ZAHEDANI, M.R.; RAHMDEL, S.; HEMMATI, F.; MAZLOOMI, S.M. Development of *Lactobacillus acidophilus* - fermented milk fortified with date extract. **LWT**, v. 98, p. 577-582, 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. RDC Nº 239, DE 26 DE JULHO DE 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Guia nº 21/2021 – versão 2, 2021.
- ALDI, Y.; HUSNI, E.; YESIKA, R. Activity of kincung flowers (*Etilingera Elatior* (Jack) RM Sm.) on total leukocytes and percentage of leukocytes in allergic male white mice. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, 2020.
- ALMEIDA, M.H.; ZOELLNER, S.S.; CRUZ, A.G.; MOURA, M.R.; CARVALHO, L. M.; FREITAS, M.C.J. Potentially probiotic açai yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 2, p. 178-182, 2008.
- ALMEIDA, N.E.C.; ESTEVES, F.G.; DOS SANTOS-PINTO, J.R.A.; PERES DE PAULA, C.; DA CUNHA, A.F.; MALAVAZI, I.; PALMA, M.S.; RODRIGUES-FILHO, E. Digestion of intact gluten proteins by *Bifidobacterium* species: Reduction of cytotoxicity and proinflammatory responses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 15, p. 4485-4492, 2020.
- AL-TOMA, A.; VOLTA, U.; AURICCHIO, R.; CASTILLEJO, G.; SANDERS, D.S.; CELLIER, C.; MULDER, C.J.; LUNDIN, K.E.A. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. **United European Gastroenterol Journal**, v 7, n 5, p. 583-613, 2019.
- AMABEBE, E.; ROBERT, F.; AGBALALAH, T.; ORUBU, E. Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homoeostasis of energy metabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1127-1137, 2020.
- AMBALAM, P.; RAMAN, M.; PURAMA, R.K.; DOBLE, M. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119-131, 2016.
- AMIN, G.; MERVAT HAMED, K.B. Functional Properties of Yoghurt Fortified with Fruits Pulp. Ismailia. **Dairy Science and Technology**, v. 7, p. 1–9, 2020.
- AOAC (2006) Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 18th edn. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.
- AVERY, G.S.; VERNON, M.P.; CROCKETT, W.M.; MCLEAN, L.D. Cleaning fluid comprising glycerin and a culture of microorganisms. U.S. Patent n. 8,951,953, 2015.
- BARZ, M.L.; DANIEL, N.; VARIN, T. V.; NAIMI, S.; DEMERS-MATHIEU, V.; PILON, G.; MARETTE, A. *In vivo* screening of multiple bacterial strains identifies *Lactobacillus rhamnosus* Lb102 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bf141 as

probiotics that improve metabolic disorders in a mouse model of obesity. **The FASEB Journal**, v. 33, p. 4921-4935, 2019.

BELLINAZO, P.L.; VITOLA, H.R.S.; CRUXEN, C.E.D.S.; BRAUN, C.L.K.; HACKBART, H.C.D.S.; DA SILVA, W.P.; FIORENTINI, Â.M. Probiotic butter: Viability of *Lactobacillus casei* strains and bixin antioxidant effect (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 9, p. e14088, 2019.

BESLE, J.M.; VIALA, D.; MARTIN, B.; PRADEL, P.; MEUNIER, B.; BERDAGUÉ, J.L.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J.L.; COULON, J.B. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. **Dairy Science and Technology**, v. 93, p. 2846–2856, 2010.

BHUPATHIRAJU, S.N.; HU, F.B. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1723-1735, 2016.

BIEGELMEYER, R.; MARIA, J.; ANDRADE, M.; ANA, L.; APEL, M.A.; DRESCH, R.R.; MARIN, R. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry Guava fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C991-C996, 2011.

BOKE, H.; ASLIM, B.; ALP, A.V.C.I. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, 2010.

BORGONOV, T.F.; CASAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B. *Lacticaseibacillus casei* SJRP38 and buriti pulp increased bioactive compounds and probiotic potential of fermented milk. **LWT**, v. 143, p. 111-124, 2021.

BOTROS, M.; SIKARIS, K.A. The de Ritis ratio: the test of time. **Clinical Biochemistry**, v. 34, p. 117-30, 2013.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, p. 14-21, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Vigitel Brasil 2018: Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 2, de jan de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Diário Oficial da União 7 de jul de 2002.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2011: percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 161, de 01 de julho de 2022. Listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 2007.

BRESTOFF, J.R.; ARTIS, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolismo and the immune system. **Nature Immunology**, v. 14, p.676–84, 2013.

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU-LACANAL, C.; BOUTROU, R.; CARRIÈRE, F.; CLEMENTE, A.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EDWARDS, C.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; FEUNTEUN, S.L.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.R.; MARTINS, C.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D.J.; MÉNARD, O.; MINEKUS, M.; PORTMANN, R.; SANTOS, C.N.; SOUCHON, I.; SINGH, R.P.; VEGARUD, G.E.; WICKHAN, M.S.J.; WEITSCHIES, W.; RECIO, I. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, p. 991-1014, 2019.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAU, M.; REVOLJUNELLES, A.M.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 213, p. 21-35, 2014.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; DOS SANTOS, J.M.; ROSA, M.R.D.; QUINÁIA, S.P.; EBERLIN, M.N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

BURITI, F.C.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 315 – 317, 2007.

CALCINARO, F.; DIONISI, S.; MARINARO, M.; CANDELORO, P.; BONATO, V.; MARZOTTI, S.; FERRETTI, E.; GULINO, A.; GRASSO, F.; SIMONE, U.; MÁRIO, D.I.; FALORNI, A.; BOIRIVANT, M.; DOTTA, F. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. **Diabetologia**, v. 48, n. 8, p. 1565-75, 2005.

CAMINERO, A.; GALIPEAU, H.J.; MCCARVILLE, J.L.; JOHNSTON, C.W.; BERNIER, S.P.; RUSSELL, A.K.; JURY, J.; HERRAN, A.R.; CASQUEIRO, J.; TYE-DIN, J.A. Duodenal bacteria from patients with celiac disease and healthy subjects distinctly affect gluten breakdown and immunogenicity. **Gastroenterology**, v. 151, p.670–83, 2016.

CAMINERO, A.; HERRAN, A.R.; NISTAL, E.; PEREZ-ANDRES, J.; VAQUERO, L.; VIVAS, S. Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, p. 309–19, 2014.

CAMPOS, M.T.G.; LEME, F.D.O.P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v. 12, p. 139, 2017.

- CANI, P.D.; VAN HUL, M. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome. **Current opinion in biotechnology**, v. 32, p. 21-27, 2015.
- CARDOSO, J.S.; OLIVEIRA, P. S.; BONA, N. P.; VASCONCELLOS, F. A.; BALDISSARELLI, J.; VIZZOTTO, M., STEFANELLO, F.M. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Report**, v. 23, p. 41-46, 2018.
- CARDOSO, J.S.; OLIVEIRA, P.S.; BONA, N.P.; VASCONCELLOS, F.A.; BALDISSARELLI, J.; VIZZOTTO, M.; STEFANELLO, F.M. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox report**, v. 23, n. 1, p. 41-46, 2018.
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.
- CELEP, E.; CHAREHSAZ, M.; AKYÜZ, S.; ACAR, E.T.; YESILADA, E. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. **Food Research International**, v. 78, p. 209-215, 2015.
- CHADHA, D.; HAMID, N.; KANTONO, K.; MARSAN, M. Changes in temporal sensory profile, liking, satiety, and postconsumption attributes of yogurt with natural sweeteners. **Journal of Food Science**, 2022.
- CHEN, C.; ZHAO, S.; HAO, G.; YU, H.; TIAN, H.; ZHAO, G.L. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. S316–S330, 2017.
- CHEN, P.; ZHANG, Q.; DANG, H.; LIU, X.; TIAN, F.; ZHAO, J.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65-72, 2014.
- CHENG, J.; KALLIOMÄKI, M.; HEILIG, H.G.H.J.; PALVA, A.; LÄHTEENOJA, H.; DE VOS, W.M.; SALOJÄRVI, J.; SATOKARI, R. Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. **BMC Gastroenterology**, v. 13, p.113, 2013.
- CHERNG, Y.G.; TSAI, C.C.; CHUNG, H.H.; LAI, Y.W.; KUO, S.C.; CHENG, J.T. Antihyperglycemic action of sinapic acid in diabetic rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12053-12059, 2013.
- CHO, M.; HAN, J.H.; YOU, S. Inhibitory effects of fucan sulfates on enzymatic hydrolysis of starch. **LWT**, v. 44, p. 1164-1171, 2011.
- CHO, N.; SHAW, J.E.; KARURANGA, S.; HUANG, Y.; DA ROCHA FERNANDES, J.D.; OHLROGGE, A.W.; MALANDA, B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271-281, 2018.
- CHOUCHOULI, V.; KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S.J.; KARVELA, E.; MAKRIS, D.P.; KARATHANOS, V.T. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **LWT**, v. 53, p. 522–529, 2013.
- COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>

- COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008.
- COSTA, G.M.; PAULA, M.M.; BARÃO, C.E.; KLOSOSKI, S.J.; BONAFÉ, E.G.; VISENTAINER, J.V.; CRUZ, A.G.; PIMENTEL, T.C. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 139–148, 2019.
- COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013.
- CRUXEN, C.E.; HOFFMANN, J.F.; ZANDONÁ, G.P.; FIORENTINI, Â.M.; ROMBALDI, C.V.; CHAVES, F.C. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT**, v. 75, p. 379-385, 2017.
- CUNHA, C.; UECKER, J.N.; JASKULSKI, I.B.; ROSOLEN, M.D.; BORDINI, F.W.; ANDREAZZA, R.; HUBNER, S.A.; FIORENTINI, A.M.; SILVA, W.P.; PIENIZ, S. Probiotic Characterization And Safety Assessment of *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* R7 Isolated From Ricotta Cheese. **Research Square**, p. 1-24, 2021.
- CUTRIM, C.S.; CORTEZ, M.A.S. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, p. 564-578, 2018.
- D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1321-1342, 2010.
- D'ARIENZO, R.; STEFANILE, R.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; RICCA, E.; TRONCONE, R.; Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, p. 335–41, 2011.
- DALLA NORA, C.; DANELLI, D.; SOUZA, L.F.; RIOS, A.D.O.; DE JONG, E.V.; FLÔRES, S.H. Protective effect of guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand) and red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) against cisplatin-induced hypercholesterolemia in rats Brazilian. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 483-491, 2014.
- DALLA NORA, C.; JABLONSKI, A.; RIOS, A.; HERTZ, P.F.; JONG, E.V.; FLÔRES, S.H. The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 1842–1849, 2014.
- DANTAS, A.; JESUS, V.; SILVA, R.; ALMADA, C.; ESMERINO, A.; CAPPATO, L.; SILVA, M.; RAICES, R.; CAVALCANTI, R.; CARVALHO, C.; SANT'ANA, A.; BOLINI, H.; FREITAS, M.; CRUZ, A. Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal Dairy Science**, v. 99, p. 1-13, 2016.

- DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.
- DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J.P.E. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1818–1892, 2013.
- DEROSA, G.; D'ANGELO, A.; BONAVENTURA, A.; BIANCHI, L.; ROMANO, D.; MAFFIOLI, P. Effects of berberine on lipid profile in subjects with low cardiovascular risk. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 13, p. 475-482, 2013.
- DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biology**, v. 6, p. 280, 2008.
- DIMITRELLOU, D.; SOLOMAKOU, N.; KOKKINOMAGOULOS, E.; KANDYLIS, P. Yogurts Supplemented with Juices from Grapes and Berries. **Foods**, v. 9, p. 1158, 2020.
- DOLATKHAH, N.; HAJIFARAJI, M.; ABBASALIZADEH, F.; AGHAMOHAMMADZADEH, N.; MEHRABI, Y.; ABBASI, M. M. Is there a value for probiotic supplements in gestational diabetes mellitus? A randomized clinical trial. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2015.
- DUAN, F.F.; LIU, J.H.; MARCH, J.C. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes. **Diabetes**, v. 64, p. 1794-803, 2015.
- DUAN, F.F.; LIU, J.H.; MARCH, J.C. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes. **Diabetes**, v. 64, p. 1794-803, 2015.
- DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 1996.
- EDWARDS, R.L.; LYON, T.; LITWIN, S.E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J.D.; JALILI T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **Journal Nutrition**, v. 13, p. 2405-11, 2007.
- EGERT, S.; BOSY-WESTPHAL, A.; SEIBERL, J.; KÜRBITZ, C.; SETTLER, U.; PLACHTA-DANIELZIK, S.; WAGNER, A.E.; FRANK, J.; SCHREZENMEIR, J.; RIMBACH, G.; WOLFFRAM, S.; MÜLLER, M.J. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. **The British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1065-74, 2009.
- EJTAHED, H.S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFID, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, p. 539-43, 2012.
- EJTAHED, H.S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFID, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, p. 539-43, 2012.

- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.
- ESPÍRITO SANTO, A.P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. **LWT**, v. 47, p. 393–399, 2012.
- FANG, L.; MENG, W.; MIN, W. Phenolic compounds and antioxidant activities of flowers, leaves and fruits of five crabapple cultivars (*Malus Mill. species*). **Scientia Horticulturae**, v. 235, p. 460-467, 2018.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Available At: [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
- FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 174- 181, 2007.
- FASANO, A.; BERTI, I.; GERARDUZZI, T.; NOT, T.; COLLETTI, R.B.; DRAGO, S. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, p. 286–92, 2003.
- FERRIGO, A., FRAGA, C., MEDEIROS, H., DALTOÉ, L., DEMOLINER, F. Ação dos compostos bioativos no diabetes mellitus tipo 2: revisão. In: XI Mostra Integrada de Iniciação Científica. 2021.
- FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. S35-S50, 2013.
- FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. S35-S50, 2013.
- FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. **Immunological Investigation**, v. 39, p. 429-448, 2010.
- FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. A Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados (eds Tondo. E. C.). Artmed Editora. p. 132-147, 2002.
- FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA. p. 174 a 187, 2013.
- FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L. **Fundamentals of Cheese Science**, 2000.
- FRANCAVILLA, R.; PICCOLO, M.; FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; SEMERARO, F.; CRISTOFORI, F.; CASTELLANETA, S.; BARONE, M.; INDRIIO, F.; GOBBETTI, M.; Clinical and Microbiological Effect of a Multispecies Probiotic Supplementation in Celiac Patients with Persistent IBS-type Symptoms: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled, Multicenter Trial. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 53, p. e117, 2018.
- FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.D.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. Araçás do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados, 2009.

- FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantative methods for analysis. 2. Determination of total anthocyanin and degeadition index in cranberries. **Food Science**, v. 33, p. 78–83, 1969.
- FUSTER, V.P.; PÉREZ, A.P.; GÓMEZ, J.C.; PEDRAGÓS, A.C.; GOMEZ-HUELGAS, R.; PEREZ-MARTINEZ, P. Atualizações para o tratamento dietético de pré-diabetes e diabetes mellitus tipo 2. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, v. 68, p. 277-287, 2021.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, p. 1, 2006.
- GALIPEAU, H.J.; MCCARVILLE, J.L.; HUEBENER, S.; LITWIN, O.; MEISEL, M.; JABRI, B.; SANZ, Y.; MURRAY, J.A.; JORDANA, M.; ALAEDINI, A. Intestinal microbiota modulates gluten-induced immunopathology in humanized mice. **The American Journal of Pathology**, v. 185, p. 2969-2982, 2015.
- GASMI BENAHMED, A.; GASMI, A.; ARSHAD, M.; SHANAIDA, M.; LYSIUK, R.; PEANA, M.; BJØRKLUND, G. Health benefits of xylitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 7225–7237, 2020.
- GIÃO, M.S.; GOMES, S.; MADUREIRA, A.R.; FARIA, A.; PESTANA, D.; CALHAU, C.; PINTADO, M.E.; AZEVEDO, I.; MALCATA, F.X. Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 761-767, 2012.
- GOMES, A.C.; HOFFMANN, C.; MOTA, J.F. Gut microbiota is associated with adiposity markers and probiotics may impact specific genera. **European Journal of Nutrition**, v. 59, p. 1751-1762, 2020.
- GONZÁLEZ REVELLO, Á.; CARRO, S.; CAL, K.; GIACAMAN, S.; ALDROVANDI, A. *Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo. **Innotec**, n. 12, 2016.
- GONZALEZ, N.J.; ADHIKARI, K.; SANCHO-MADRIZ, M.F. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. **LWT**, v. 44, p. 158-163, 2011.
- GOYAL, R.; JIALAL, I. **Diabetes mellitus type 2**, 2018.
- GRANATO, D.; BARBA, F.J.; BURSAĆ KOVAČEVIĆ, D.; LORENZO, J.M.; CRUZ, A.G.; PUTNIK, P.L. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 93–118, 2020.
- GREEN, P.H.; CELLIER, C. Celiac disease. **New England Journal of Medicine**, n. 357, p. 1731-1743, 2007.
- GUARNER, F.; SANDERS, M.E.; ELIAKIM, R.; FEDORAK, R.; GANGL, A.; GARISCH, J.; SALMINEN, S. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. **Probióticos e Prebióticos**, 2017.
- GUPTA, A.; MANN, B.; KUMAR, R.; & SANGWAN, R. B. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 339–347, 2009.
- HÅKANSSON, Å.; ANDRÉN ARONSSON, C.; BRUNDIN, C.; OSCARSSON, E.; MOLIN, G.; AGARDH, D. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus*

*paracasei* on the peripheral immune response in children with celiac disease autoimmunity: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Nutrients**, v. 11, p. 1925, 2019.

HAMINIUK, C.W.I.; SIERAKOWSKI, M.R.; VIDAL, J.R.M.B.; MASSON, M.L. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araçá pulp (*Psidium cattleianum* Sabine). **LWT**, v. 39, p. 427–431, 2006.

HARNETT, J.; MYERS, S.P.; ROLFE, M. Probiotics and the microbiome in celiac disease: a randomised controlled trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–16, 2016.

HAYASHI, T.; IGUCHI, A. Possibility of the regression of atherosclerosis through the prevention of endothelial senescence by the regulation of nitric oxide and free radical scavengers. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 10, p. 115-130, 2010.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, p. 39–51, 2013.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 8, p. 506–14, 2014.

HOFFMANN, J.F.; CRIZEL, R.L.; MADRUGA, N.A.; BARBIERI, R.L.; ROMBALDI, C.V.; CHAVES, F.C. Flavan-3-ol, flavanone, flavone, flavonol, phenolic acid, and stilbene contents of four *Butia* species (Arecaceae) **Fruits**, v. 73, n. 2, p. 125-137, 2018.

HOLLAND, R.; LIU, S.Q.; CROW, V.L.; DELABRE, M.L.; LUBBERS, M.; BENNETT, M. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification, **International Dairy Journal**, v. 15, p. 711–718, 2005.

HOLST, J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1409-39, 2007.

HOMAYONI, R.; VAGHEF, M.; ALIPOOR, L.V.M. The comparison of food and supplement as probiotic delivery vehicles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 896-909, 2016.

HUANG, I.; LIM, M.A.; PRANATA, R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia—a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 395-403, 2020.

HUANG, I.; LIM, M.A.; PRANATA, R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, p. 395-403, 2020.

HURSEL, R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. Catechin-and caffeine-rich teas for control of body weight in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1682S-1693S, 2013.

IKEDA, D.M.; WEINERT J.R.E.; CHANG, K.C.S.; MCGINN, J.M.; MILLER, S. A.; KELIIHOOMALU, C.; DUPONTE, M.W. Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. **Sustainable Agriculture**, v. 8, 2013.

ISLAM, S.U. Clinical uses of probiotics. **Medicine**, v. 95, p. e2658, 2016.

ISO. Sensory analysis: Methodology-General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area (ISO 11136:2014). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2014.

IVARSSON, A.; HERNELL, O.; STENLUND, H.; PERSSON, L.A. Breast-feeding protects against celiac disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 914–21, 2002.

JABRI, B.; SOLLID, L.M. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, p. 516-525, 2006.

JASKULSKI, I. B.; UECKER, J.; BORDINI, F.; MOURA, F.; GONÇALVES, T.; CHAVES, N. G.; CAMARGO, F.; GRECCO, F.B.; FIORENTINI, A.M.; SILVA, W.P.; ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S. *In vivo* action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 165-171, 2020.

JIAO, Y.; KILMARTIN, P.A.; FAN, M.; QUEK, S.Y. Assessment of phenolic contributors to antioxidant activity of new kiwifruit cultivars using cyclic voltammetry combined with HPPLC. **Food Chemistry**, v. 268, p. 77-85, 2018.

JUNG, J.; PAIK, H.D.; YOON, H.J.; JANG, H.J.; JEEWANTHI, R.K.C.; JEE, H.S.; LEE, S.K. Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of yogurt fortified with red ginseng extract. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, p. 412, 2016.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1317-1322, 2008.

KANMANI, P.; SATISH KUMAR, R.; YUVARAJ, N.; PAARI, K.A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Probiotics and its functionally valuable products-a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 6, p. 641-58, 2013.

KAPUR, R.; ZUFFEREY, A.; BOILARD, E.; SEMPLE, J.W. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 5579–5587, 2015.

KARIMI, O.; PEÑA, A.S.; BODEGRAVEN, A.A.; Probiotics (VSL# 3) in arthralgia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: A pilot study. **Drugs of Today**, v. 41, n. 7, p. 453-460, 2005.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V.P. “Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats,” **General Physiology and Biophysics**, v. 29, n. 1, p. 23–30, 2010.

- KASINSKA, M.A.; DRZEWOSKI, J. Effectiveness of probiotics in type 2 diabetes: a meta-analysis. **Polish Archives of Internal Medicine**, v. 125, p. 803-13, 2015.
- KASINSKA, M.A.; DRZEWOSKI, J. Effectiveness of probiotics in type 2 diabetes: a meta-analysis. **Polish Archives of Internal Medicine**, v. 125, p. 803-13, 2015.
- KHAN, A.Z.; KHAN, I.U.; KHAN, S.; AFZAL, S.; HAMID, M.; TARIQ, M.; LIU, R. Selenium-enriched probiotics improve hepatic protection by regulating pro-inflammatory cytokines and antioxidant capacity in broilers under heat stress conditions. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 6, p. 355, 2019.
- KIMOTO, H.; KURISAKI, J.; TSUJI, N. M.; OHMOMO, S.; OKAMOTO, T. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 313-316, 1999.
- KIMOTO, H.; NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; OKAMOTO, T. OHMOMO, S. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 38, n. 2, p. 111-117, 2004.
- KLEESSEN, B.; BEZIRTOGLOU, E.; MATTO, J. Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, p. 53–63, 2000.
- KLEMENAK, M.; DOLINŠEK, J.; LANGERHOLC, T.; DI GIOIA, D. Administration of *Bifidobacterium breve* Decreases the Production of TNF- $\alpha$  in Children with Celiac. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, p. 3386–3392, 2015.
- KOBYLIAK, N.; FALALYEYEVA, T.; MYKHALCHYSHYN, G.; KYRIIENKO, D.; KOMISSARENKO, I. Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: randomized clinical trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 12, p. 617-624, 2018.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.
- KORBKANDI, H.; MORTAZAVIAN, A.M.; IRAVANI, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks. **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the Human Health**, v. 1, p. 131-167, 2011.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945–960, 2006.
- KOURKOUTAS, Y.; BOSNEA, L.; TABOUKOS, S.; BARAS, C.; LAMBROU, D.; & KANELLAKI, M. Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1439-1451, 2006.
- KUDOH, Y.; MATSUDA, S.; IGOSHI, K.; & OKI, T. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* IFO13953. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)**, v. 48, p. 44–50, 2001.
- KUMAR, V.; SANDHU, P.P.; AHLUWALIA, V.; MISHRA, B.B.; YADAV, S.K. Improved upstream processing for detoxification and recovery of xylitol produced from corncob. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121931, 2019.

- KUMARI, S.; KHURANA, S. M. Nutraceuticals: Let The Food Be Your Medicine. **Biotech Today**, v. 3, p. 44-47, 2013.
- LAPARRA, J.M.; OLIVARES, M.; GALLINA, O.; SANZ, Y. *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. **PLoS ONE**, v. 7, p. e30744, 2012.
- LIANG, Y.; LIU, M.; PU, J.; ZHU, Z.; GAO, Z.; ZHOU, Q.; QING, G.; LI, P. Probiotics and Their Metabolites Ameliorate Inflammatory Bowel Disease: A Critical Review. **Infectious Microbes & Diseases**, v. 3, p. 4-13, 2021.
- LIMA, C.; LIMA, L.; CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p. 266-272, 2009.
- LINDFORS, K.; BLOMQUIST, T.; JUUTI-UUSITALO, K.; STENMAN, S.; VENÄLÄINEN, J.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 152, p. 552-558, 2008.
- LINDFORS, K.; KOSKINEN, O.; KAUKINEN, K. An update on the diagnostics of celiac disease. **International Reviews of Immunology**, v. 30, p. 185–96, 2011.
- LIONG, M.T.; LEE, B.H.; CHOI, S.B.; LEW, L.C.; LAU, A.S.Y.; DALIRI, B.M.E. Cholesterol- lowering effects of probiotics and prebiotics. **Probiotics and Prebiotics**, p. 429–447, 2015.
- LIU, X.; CHUNG, Y.K.; YANG, S.T.; YOUSEF, A.E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 13-24, 2005.
- LIU, Z.; LIU, W.; RAN, C.; HU, J.; ZHOU, Z. Abrupt suspension of probiotics administration may increase host pathogen susceptibility by inducing gut dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23214, 2016.
- LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAYGERIN, J.P.; MANKHETORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 323-331, 2005.
- LOHI, S.; MUSTALAHTI, K.; KAUKINEN, K.; LAURILA, K.; COLLIN, P.; RISSANEN, H.O.; LOHI, E.; BRAVI, M.; GASPARINA, A.; REUNANEN. Increasing prevalence of coeliac disease over time. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 1217–25, 2007.
- LOPEZ-DIAZ, T.M.; ALONSO, C.; ROMAN, C.; GARCIA-LOPEZ, M.L.; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p.23-32, 2000.
- LOURES, M.M.R.; MINIM, V.P.R.; CERESINO, E.B.; CARNEIRO, R.C.; MINIM, L.A. Análise descritiva por ordenação na caracterização sensorial de iogurte diet sabor morango enriquecido com concentrado protéico de soro. **Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.661-668, 2010.

- LUDVIGSSON, J.F.; LEFFLER, D.A.; BAI, J. C.; BIAGI, F.; FASANO, A.; GREEN, P.H.R. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, v. 62, p. 43–52, 2013.
- MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465–470, 2011.
- MARCHIANI, R.; BERTOLINO, M.; BELVISO, S.; GIORDANO, M.; GHIRARDELLO, D.; TORRI, L.; ZEPPA, G. Yogurt enrichment with grape pomace: Effect of grape cultivars on physicochemical, microbiological and sensory properties. **Journal of Food Quality**, v. 39, p. 77-89, 2016.
- MARILD, K.; STEPHANSSON, O.; MONTGOMERY, S.; MURRAY, J.A.; LUDVIGSSON, J.F. Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: a nationwide case-control study. **Gastroenterology**, v. 142, p. 39–45, 2012.
- MARTIN, R.; MIQUEL, S.; ULMER, J.; LANGELLA, P.; BERMUDEZ-HUMARAN, L.G. Gut ecosystem: how microbes help us. **Beneficial Microbes**, v. 5, p. 219–233, 2014.
- MAYER, E.A. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, p. 453–466, 2011.
- MBARA, K.C.; RAMBHAROSE, S.; BAIJNATH, H.; NLOOTO, M.; OWIRA, P.M; Efeitos antidiabéticos do extrato de folhas de *Psidium x durbanensis* Baijnath & Ramcharun ined. (Myrtaceae) no diabetes induzido por estreptozotocina em ratos. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 297, p. 115542, 2022.
- MEDINA, A.L.; HAAS, L.I.R.; CHAVES, F.C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R.C.; DA SILVA, W.P.; NORA, L.; ROMBALDI, C.V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v 128, p 916–922, 2011.
- MEDINA, M.; DE PALMA, G.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. *Bifidobacterium* strains suppress *in vitro* the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. **Journal of Inflammation Research**, v. 5, p.19, 2008.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V. L. A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 193-201, 2008.
- MEYBODI, N.M.; MORTAZAVIAN, A.M.; ARAB, M.; NEMATOLLAHI, A. Viability of probiotics in yogurt: a review of influential factors. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104793, 2020.
- MICHAIL, S.; WEI, S.; MACK, D.R. *Escherichia coli* strain 2348/69 *in vitro* adhesion is reduced in the presence of a Lactobacillus species. **Gastroenterology**, v. 112, p.1042, 1997.
- MINIGHIN, E.C. Composição centesimal, perfil de ácidos graxos e efeitos da digestão *in vitro* sobre o teor de minerais, compostos fenólicos e atividade antioxidante de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) roxo e branco [dissertation][Minas Gerais (Brazil)]: Federal University of Minas Gerais.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- BRASIL.  
Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. VIGITEL BRASIL 2020. VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. 1ª edição, 2021.

MIYOSHI, M.; OGAWA, A.; HIGURASHI, S.; KADOOKA, Y. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasser* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. **European Journal of Nutrition**, v. 53, p. 599-606, 2014.

MOHAMMADI, H.; GHAVAMI, A.; FAGHIHIMANI, Z.; SHARIFI, S.; NATTAGH-ESHTIVANI, E.; ZIAEI, R.; MIRAGHAJANI, M. Efeitos de produtos lácteos fermentados com probióticos na medida da obesidade em adultos: uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos. **Journal of Functional Foods**, v. 82, p. 104494, 2021.

MOORE, J.B.; SUTTON, E.H.; HANCOCK, N. Sugar Reduction in Yogurt Products Sold in the UK between 2016 and 2019. **Nutrients**, v. 12, p. 171, 2020.

MORGUN, A.; DZUTSEV, A.; DONG, X.; GREER, R.L.; SEXTON, D.J.; RAVEL, J.; SCHUSTER, M.; HSIAO, W.; MATZINGER, P. SHULZHENKO, N. Unraveling the effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. **Gut**, v. 64, p. 1732-1743, 2015.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NADAL, I.; DONAT, E.; DONANT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with celiac disease. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1669–74, 2008.

NAGPAL, R.; NEWMAN, T.M.; WANG, S.; JAIN, S.; LOVATO, J.F.; YADAV, HI. with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet. **Journal of Diabetes Research**, v. 3462092, 2018.

NIMALARATNE LA (2015). Antioxidants in Chicken Egg Yolk: Effects of Cooking Storage and Gastrointestinal Digestion. Edmonton: University of Alberta, 2019.

NISHIYAMA, K.; KOBAYASHI, T.; SATO, Y.; WATANABE, Y.; KIKUCHI, R.; KANNO, R.; SUZUTANI, T. A double-blind controlled study to evaluate the effects of yogurt enriched with *Lactococcus lactis* 11/19-b1 and *Bifidobacterium lactis* on serum low-density lipoprotein level and antigen-specific interferon- $\gamma$  releasing ability. **Nutrients**, v. 10, p. 1778, 2018.

NISTAL, E.; CAMINERO, A.; HERRÁN, A.R.; ARIAS, L.; VIVAS, S.; RUIZ, D.E.; MORALES, J.M.; CALLEJA, S.; SÁENZ DE MIERA, L.E.; ARROYO, P.; CASQUEIRO, J. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, p. 649 –656, 2012.

NORA, C.D.; DANELLI, D.; SOUZA, L.F.; RIOS, A.D.O.; JONG, E.V.D.; FLÔRES, S.H. Protective effect of guabiju (*Myrcianthespungens* (O. Berg) D. Legrand) and red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) against cisplatin-induced hypercholesterolemia in rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 483-491, 2014.

- O'CONNELL, J.; LYNCH, L.; CAWOOD, T.J.; KWASNIK, A.; NOLAN, N.; GEOGHEGAN, J.; MCCORMICK, A.; O'FARRELLY, C.; O'SHEA, D. The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. **PLoS One**, v. 5, p. 9997, 2010.
- O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO reports**, v. 7, p. 688–93, 2006.
- OGUNTIBEJU, O.O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 11, p. 45, 2019.
- OH, N.S.; JOUNG, J.Y.; LEE, J.Y.; KIM, Y. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. **PLoS ONE**, v. 13, 2018.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.
- OKUNOGBE, A.; NUGENT, R.; SPENCER, G. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for eight countries. **BMJ Global Health**, 2021.
- OLIVARES, M.; CASTILLEJO, G.; VAREA, V.; SANZ, Y. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. **British Journal of Nutrition**, v. 112, p. 30–40, 2014.
- OLIVARES, M.; LAPARRA, M.; SANZ, Y. Influence of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 and gliadin peptides on intestinal epithelial cell proteome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 59, p. 7666–71, 2011.
- OLIVEIRA, M.N.D.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.
- ORDÓÑEZ, J.Á.; RODRIGUEZ, M.I.C.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; & CORTECERO, M.D.S. Tecnología de alimentos: alimentos de origen animal. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 280, 2005.
- ORLANDO, A.; CLEMENTE, C.; D'ATTOMA, B.; RUSSO, F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the serotonergic pathway in a gliadin-induced enteropathy animal model. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104077, 2020.
- ORLANDO, A.; CLEMENTE, C.; D'ATTOMA, B.; RUSSO, F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the serotonergic pathway in a gliadin-induced enteropathy animal model. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104077, 2020.
- OSTADRAHIMI, A.; TAGHIZADEH, A.; MOBASSERI, M.; FARRIN, N.; PAYAHOO, L.; GHESHLAGHI, Z.B., VAHEDJABBARI, M. Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Iranian Journal of Public Health**, v. 44, p. 228, 2015.
- PAIS, P.; ALMEIDA, V.; YILMAZ, M.; TEIXEIRA, M.C. *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic?. **Journal of Fungi**, v. 6, P. 78, 2020.
- PAPADOPOULOU, O.S.; ARGYRI, A.A.; VARZAKIS, E.E.; TASSOU, C.C.; CHORIANOPOULOS, N.G. Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and

safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. **Food Microbiology**, v. 74, p. 21–33, 2018.

PAPADOPULOU, O.S.; ARGYRI, A.A.; VARZAKIS, E.E.; TASSOU, C.C.; Chorianopoulos, N.G. Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. **Food Microbiology**, v. 74, p. 21-33. 2018.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171-1185, 2006.

PATEL, S. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: A review on prospects and threats. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, p. 243-248, 2012.

PEREIRA, E.D.S.; VINHOLES, J.R.; CAMARGO, T.M.; RAPHAELLI, C.D.O.; FERRI, N.M.L.; NORA, L.; VIZZOTTO, M. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine): bioactive compounds, antioxidant activity and pancreatic lipase inhibition. **Ciência Rural**, v. 51, 2021.

PEREIRA, E.S.; VINHOLES, J. R.; CAMARGO, T. M.; NORA, F. R.; CRIZEL, R. L.; CHAVES, F.; NORA, L.; VIZZOTTO, M. Characterization of araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine): Phenolic composition, antioxidant activity and inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **Food Bioscience**, 2020.

PEREIRA, E.S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R.C.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v 258, p 95-103, 2018.

PEREIRA, E.S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R.C.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p 95-103, 2018.

PEREIRA, E.S.; VINHOLES, J.R.; CAMARGO, T.M.; NORA, F.R.; CRIZEL, R.L.; CHAVES, F.; VIZZOTTO, M. Characterization of araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine): Phenolic composition, antioxidant activity and inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **Food Bioscience**, v. 37, p. 100665, 2020.

PHUAPAIBOON, P.; LEENANON, B.; LEVIN, R.E. Effect of *Lactococcus lactis* immobilized within pineapple and yam bean segments, and jerusalem artichoke powder on its viability and quality of yogurt. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2751-2762, 2013.

PINTO-SÁNCHEZ, M.I.; SMECUOL, E.C.; TEMPRANO, M.P.; SUGAI, E.; GONZÁLEZ, A.; MORENO, M.L.; HUANG, X.; BERCIK, P.; CABANNE, A.; VÁZQUEZ, H. *Bifidobacterium infantis* NLS Super Strain Reduces the Expression of  $\alpha$ -Defensin-5, a Marker of Innate Immunity, in the Mucosa of Active Celiac Disease Patients. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 51, p. 814–81, 2017.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F.J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v 10, p. 49-66, 2019.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F.J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of Action of Probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, p. S49–S66, 2019.

PONTES, K.S.; GUEDES, M.R.; CUNHA, M.R.; MATTOS, S.D.S.; BARRETO SILVA, M.I.; NEVES, M.F.; KLEIN, M.R.S.T. Effects of probiotics on body adiposity and cardiovascular risk markers in individuals with overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Nutrition**, v. 40, p. 4915-4931, 2021.

PONTES, K.S.; GUEDES, M.R.; CUNHA, M.R.; SOUZA MATTOS, S.; SILVA, M.I.B.; NEVES, M.F.; KLEIN, M.R.S.T. Effects of probiotics on body adiposity and cardiovascular risk markers in individuals with overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 8, p. 4915-4931, 2021.

PRADEEP, P.M.; SREERAMA, Y.N. Phenolic antioxidants of foxtail and little millet cultivars and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. **Food Chemistry**, v. 247, p. 46-55, 2018.

PRADO, F.C.; LINDNER, J.D.; INABA, J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BRAR, S.K.; SOCCOL, C.R.; Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal Function Foods**, v. 12, p. 489–497, 2015.

PRESTES, A.A.; VERRUCK, S.; VARGAS, M.O.; CANELLA, M.H.M.; SILVA, C.C.; BARROS, E.L.; PRUDENCIO, E.S. Influence of guabiroba pulp (*Campomanesia xanthocarpa* O. berg) added to fermented milk on probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 141, p. 110135, 2021.

PRIMEC, M.; KLEMENAK, M.; DI GIOIA, D.; ALOISIO, I.; BOZZI CIONCI, N.; QUAGLIARIELLO, A.; GORENJAK, M.; MICETIC-TURK, D.; LANGERHOLC, T. Clinical intervention using *Bifidobacterium* strains in celiac disease children reveals novel microbial modulators of TNF- $\alpha$  and short-chain fatty acids. **Clinical Nutrition**, v. 38, p. 1373–81, 2019.

QIN, Z.; YING, P.; BENHUA, Z.; XIAOJIAO, Z.; HAIFANG, W.; XUEYING, S.; HUI, L.; QIAN, J.; JIAXU, Z.; ZHUO-XIAN, M.; PINGPING, L.; ZHENGJUN, C.; HONG, WEI.; ZHIHUA, L. Intestinal lysozyme liberates Nod1 ligands from microbes to direct insulin trafficking in pancreatic beta cells. **Cell Research**, v. 29, p.516-532, 2019.

QUAGLIARIELLO, A.; ALOISIO, I.; BOZZI CIONCI, N.; LUISELLI, D.; D'AURIA, G.; MARTINEZ-PRIEGO, L.; PÉREZ-VILLARROYA, D.; LANGERHOLC, T.; PRIMEC, M.; MICETIC-TURK, D.; Effect of *Bifidobacterium breve* on the Intestinal Microbiota of Coeliac Children on a Gluten Free Diet: A Pilot Study. **Nutrients**, v. 8, p. 660, 2016.

RADÜNZ, M.; CAMARGO, T.M.; HACKBART, H.C.S.; BLANK, J.P.; HOFFMANN, J.F.; STEFANELLO, F.M.; ZAVAREZE, E.R. Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of *in vitro* simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. **Food Chemistry**, v. 339, 2021.

RANDHAWA, M.K.; BHATIA, A.; BALGIR, P. Effect of Supplementation of Probiotic and their DNA alone or in Combination with Glyburide on Hyperglycemic Swiss Albino Mice. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 71-76, 2015.

RANDHAWA, M.K.; BHATIA, A.; BALGIR, P. Effect of Supplementation of Probiotic and their DNA alone or in Combination with Glyburide on Hyperglycemic Swiss

- Albino Mice. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 71-76, 2015.
- RAPHAELLI, C.O.; PEREIRA, E.S.; FLORES, T.R.; RIBEIRO, J.A.; DALMAZO, G.O.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. Types of ultra-processed foods consumed in Brazil: A systematic review. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, p. 100-143, 2021.
- RAZMPOOSH, E.; JAVADI, M.; EJTAHED, H.S.; MIRMIRAN, P. Probiotics as beneficial agents in the management of diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes/metabolism Research and Reviews**, v. 32, p. 143-168, 2016.
- REISSIG, G.N.; VERGARA, L.P.; FRANZON, R.C.; RODRIGUES, R.D.S.; CHIM, J.F. Bioactive compounds in conventional and no added sugars red strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) jellies. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v 38, p. 1-7, 2016.
- RIBEIRO, A.B.; CHISTÉ, R.C.; FREITAS, M.; SILVA, A.F.; VISENTAINER, J.V.; FERNANDES, E. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140-148, 2014.
- RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M.; FRANCESCHI, F.; MIGGIANO, A.D.; GASBARRINI, A. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, p. 14, 2019.
- ROCHA, B.R.; MACIEL, E.A.; DE OLIVEIRA, S.R.M.; TERENCE, Y.S.; SILVA, B.A. Influência dos alimentos funcionais na incidência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). **Intercontinental Journal on Physical Education** v. 3, p. 1-20, 2021.
- ROSOLEN, M.D.; BORDINI, F.W.; DA LUZ, G.Q.; DIAZ, P.S.; CONCEIÇÃO, F.R.; FIORENTINI, Â.M.; PIENIZ, S. Survival of Microencapsulated *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* R7 applied in different food matrices. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 194, p. 2135–2150, 2022.
- SABEENA FARVIN, K.H.; BARON, C.P.; NIELSEN, N.S.; OTTE, J.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterization of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1090–1097, 2010.
- SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Opportunities for improving the health and nutrition of the human infant by probiotics. **Nestle Nutrition Workshop Series Pediatric Program**, v. 62, p. 223-233, 2008.
- SANDBERG-BENNICH, S.; DAHLQUIST, G.; KÄLLÉN, B. Coeliac disease is associated with intrauterine growth and neonatal infections. **Acta Paediatrica**, v. 91, p. 30–3, 2002.
- SANTONICOLA, A.; IOVINO, P.; CAPPELLO, C.; CAPONE, P.; ANDREOZZI, P.; CIACCI, C. From menarche to menopause: the fertile life span of celiac women. **Menopause**, v. 18, p. 1125–30, 2011.
- SANTOS, E.W.; DE OLIVEIRA, D.C.; HASTREITER, A.; SILVA, G.B.; DE OLIVEIRA BELTRAN, J.S.; TSUJITA, M.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

- SANTOS, R.B.; DE LIMA BARBOSA, L.P.J.; BARBOSA, F.H.F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, 2011.
- SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M.A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, p. 199-212, 2011.
- SANZ, Y.; DE PAMA, G.; LAPARRA, M. Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. **International Reviews of Immunology**, v. 30, p. 207–18, 2011.
- SARKAR, S. Whether viable and dead probiotic are equally efficacious?. **Nutrition & Food Science**, 2018.
- SATOH, T.; IGARASHI, M.; YAMADA, S.; TAKAHASHI, N.; WATANABE, K. Inhibitory effect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 147-155, 2015.
- SAVILAHTI, E.M.; ILONEN, J.; KUKKONEN, A.K.; SAVILAHTI, E.; KUITUNEN, M. Celiac disease by the age of 13 years is not associated with probiotics administration in infancy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 66, p. 937–40, 2018.
- SBAI, W.; BOURGAIN, G.; LUCIANO, L.; BRARDJANIAN, S.; THEFENNE, L.; AL SHUKRY, A. Celiac crisis in a multi-trauma adult patient. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 40, p. e31–2, 2016.
- SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Editora Clannad, 2019.
- SCHIASSI, M. C. E. V.; DE SOUZA, V.R.; LAGO, A.M.T.; CAMPOS, L.G.; QUEIROZ, F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305-311, 2018.
- SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 955–962, 2007.
- SCHMIDT, C.A.P.; PEREIRA, C.; ANJOS, G.; LUCAS, S.D.M. Formulação e avaliação sensorial hedônica de iogurte com polpa de acerola. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v.1, p.10-14, 2012.
- SCHNEIDER, I.; KRESSEL, G.; MEYER, A.; KRINGS, U.; BERGER, R.G.; HAHN, A.; Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. **Journal Function Foods** . 3, 17-24. 2011.
- SCHOINA, V.; TERPOU, A.; GIALLELI, A.I.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M.; BOSNEA, L. Use of *Pistacia terebinthus* resin as immobilization support for *Lactobacillus casei* cells and application in selected dairy products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5700-5708, 2014.
- SCHULZ, M.; BILUCA, F.C.; GONZAGA, L.V.; BORGES, G.D.S.C.; VITALI, L.; MICKE, G.A.; FETT, R. Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447-454, 2017.

- SCHULZE, M.B.; SCHULZ, M.; HEIDEMANN, C.; SCHIENKIEWITZ, A.; HOFFMANN, K.; BOEING, H. Fiber and magnesium intake and incidence of type 2 diabetes: A prospective study and meta-analysis. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, p. 956–965, 2007.
- SCHÜTZ, F.; FIGUEIREDO-BRAGA, M.; BARATA, P.; CRUZ-MARTINS, N. Obesity and gut microbiome: review of potential role of probiotics. **Porto Biomedical Journal**, v. 6, p. 1, 2021.
- SENA, D.N.; ALMEIDA, M.M.B.; NASCIMENTO, L.G.L.; BRITO, S.A.; SOUSA, P.H.M.; FERNANDES, M.D.F.L. Farinhas provenientes do processamento de frutas: bioacessibilidade de compostos antinutricionais. **Arquivos Brasileiros de Alimentação**, v. 2, p.156-163, 2017.
- SENADEERA, S.S.; PRASANNA, P.H.P.; JAYAWARDANA, N.W.I.A.; GUNASEKARA, D.C.S.; SENADEERA, P.; CHANDRASEKARA, A. Antioxidant, physicochemical, microbiological, and sensory properties of probiotic yoghurt incorporated with various *Annona* species pulp. **Heliyon**, v. 4, p. 00955, 2018.
- SHABBIR, H.; KAUSAR, T.; NOREEN, S.; HUSSAIN, A.; HUANG, Q.; GANI, A.; NAWAZ, A. *In Vivo* Screening and Antidiabetic Potential of Polyphenol Extracts from Guava Pulp, Seeds and Leaves. **Animals**, v. 10, p. 1714, 2020.
- SHAHIDI, F.; YEO, J. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1573, 2018.
- SHARIFI, S., BEHZADI, S., LAURENT, S., FORREST, M. L., STROEVE, P., MAHMOUDI, M., MAISTRIAU, A. Toxicity of nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2323–2343, 2012.
- SHARIFUDDIN, Y.; CHIN, Y.X.; LIM, P.E.; PHANG, S.M. Potential bioactive compounds from seaweed for diabetes management. **Marine Drugs**, v. 13, p. 5447-5491, 2015.
- SHOKRYAZDAN, P.; SIEO, C. C.; KALAVATHY, R.; LIANG, J. B.; ALITHEEN, N. B.; JAHROMI, M. F.; HO, Y. W. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. **BioMed Research International**, p. 1-16, 2014.
- SHORI, A.B.; PENG, C.W.; BAGHERI, E.; BABA, A.S. Physicochemical analysis, proteolysis activity and exopolysaccharides production of herbal yogurt fortified with plant extracts. **International Journal of Food Engineering**, v. 17, p. 227-236, 2021.
- SILVA, L.E.Q.; PONTES FERREIRA, E.D.; ALMEIDA BRASIL, R.N.; LIMÃO, A. E.; BORELLA, V.C.M. Uma revisão narrativa: Uso de antioxidantes em doenças Neurodegenerativas. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, p. 10661-10669, 2022.
- SILVA, N.A.D.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A.Z.; ROSSO, V.V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5072-5084, 2014.
- SILVA, S.V. Desenvolvimento de logurte Probiótico com Prebiótico. Dissertação. Santa Maria - Rio Grande do Sul. 2007.

SINGH, B.; SINGH, J.P.; KAUR, A.; SINGH, N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatu* L.) peel: a review. **Food Chemistry**, v. 261, p. 75-86, 2018.

SIQUEIRA, K.B. O Mercado Consumidor de Leite e Derivados. Circular técnica n. 120, Embrapa, 2019.

SMECUOL, E.; HWANG, H.J.; SUGAI, E.; CORSO, L.; CHERŃAVSKY, A.C.; BELLAVITE, F.P.; GONZÁLEZ, A.; VODÁNOVICH, F.; MORENO, M.L.; VÁZQUEZ, H.; Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of *Bifidobacterium infantis* Natrene life start strain super strain in active celiac disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, p. 139–147, 2013.

SONG, E.J.; HAN, K.; LIM, T.J.; LIM, S.; CHUNG, M.J.; NAM, M.H.; KIM, H.; NAM, Y.D. Effect of probiotics on obesity-related markers per enterotype: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. **EPMA Journal**, v. 11, p. 31-51, 2020.

SOUZA CARDOSO, J.; OLIVEIRA, P.S.; BONA, N.P.; VASCONCELLOS, F.A.; BALDISSARELLI, J.; VIZZOTTO, M.; ..., STEFANELLO, F.M. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

STENMAN, L.K.; WAGET, A.; GARRET, C.; BRIAND, F.; BURCELIN, R.; SULPICE, T.; LAHTINEN, S. Probiotic B420 and prebiotic polydextrose improve efficacy of antidiabetic drugs in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, p. 75, 2015.

STENMAN, L.K.; WAGET, A.; GARRET, C.; BRIAND, F.; BURCELIN, R.; SULPICE, T.; LAHTINEN, S. Probiotic B420 and prebiotic polydextrose improve efficacy of antidiabetic drugs in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, p.75, 2015.

STENMAN, L.K.; WAGET, A.; GARRET, C.; BRIAND, F.; BURCELIN, R.; SULPICE, T.; LAHTINEN, S. Probiotic B420 and prebiotic polydextrose improve efficacy of antidiabetic drugs in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, p. 75, 2015.

SUN, D.; HUANG, S.; CAI, S.; CAO, J.; HAN, P. Digestion property and synergistic effect on biological activity of purple rice (*Oryza sativa* L.) anthocyanins subjected to a simulated gastrointestinal digestion *in vitro*. **Food Research International**, v. 78, p. 114-123, 2015.

SURENDRAN, N.M.M.A.; AMALARADJOU, A.N.D.; VENKITANARAYANAN, K. Antivirulence Properties of Probiotics in Combating Microbial Pathogenesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 98, p. 1–29, 2017.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*. I.—The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. **Journal Science Food Agriculture**, v. 10, p. 33, 1959.

SZOŁTYSIK, M.; KUCHARSKA, A.Z.; DĄBROWSKA, A.; ZIĘBA, T.; BOBAK, Ł.; CHRZANOWSKA, J. Effect of Two Combined Functional Additives on Yoghurt Properties. **Foods**, v. 10, p. 1159, 2021.

TABUCHI, M.; OZAKI, M.; TAMURA, A.; YAMADA, N.; ISHIDA, T.; HOSODA, M.; HOSONO, A. Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, p. 1421-4, 2003.

- TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, p. 149-153, 2006.
- TAMANG, J.P.; SHIN, D. H.; JUNG, S. J.; CHAE, S.W. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- TAO, Y.W.; GU, Y.L.; MAO, X.Q.; ZHANG, L.; PEI, Y.F. Effects of probiotics on type II diabetes mellitus: a meta-analysis. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, p. 1-11, 2020.
- TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I.K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L.A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, v. 11, p. 1591, 2019.
- TONUCCI, L.B.; DOS SANTOS, K.M.O.; DE OLIVEIRA, L.L.; RIBEIRO, S.M.R.; MARTINO, H.S.D. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 85-92, 2017.
- TRIBOLO, S.; LODI, F.; CONNOR, C.; SURIC, S.; WILSON, V.G.; TAYLOR, M.A.; NEEDS, P.W.; KROON, P.A.; HUGHES, D.A. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 197, p 50-6, 2008.
- TUOMILEHTO, J.; HU, G.; BIDEL, S.; LINDSTRÖM, J.; JOUSILAHTI, P. "Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged finnish men and women,". **Journal of the American Medical Association**, v. 291, p. 1213–1219, 2004.
- TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027-1031, 2006.
- UUSITALO, U.; ANDREN ARONSSON, C.; LIU, X.; KURPPA, K.; YANG, J.; LIU, E. Early probiotic supplementation and the risk of celiac disease in children at genetic risk. **Nutrients**, 2019.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v 39, p. 44-84, 2007.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.
- VELLOSA, J.C.R.; BIAVATTI, M.; FRANÇÓIA, P.C.O.; MELLO, B.J.; ALMEIDA, A.C.; BUENO, G.E. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 10152-10168, 2021.
- VERMA, A.K.; RAJKUMAR, V.; BANERJEE, R.; BISWAS, S.; DAS, A.K. Guava (*Psidium guajava* L.) powder as an antioxidant dietary fibre in sheep meat nuggets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, p. 886–895, 2013.
- VERRUCK, S.; PRUDÊNCIO, E.S.; VIEIRA, C.R.W.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.D.M.C. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of

- Bifidobacterium* BB-12 under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **LWT**, v. 63, p. 1179-1183, 2015.
- VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, P.B.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; PINHO, P.G.; FERRERES, F. *In vitro* studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, p. 454-462, 2011.
- VINHOLES, J.; LEMOS, G.; BARBIERI, R. L.; FRANZON, R. C.; VIZZOTTO, M. *In vitro* assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, v. 19, p. 92-100, 2017.
- VINHOLES, J.; REIS, S.F.; LEMOS, G.; BARBIERI, R.L.; FREITAS, V.; FRANZON, R.C.; VIZZOTTO, M. Effect of *in vitro* digestion on the functional properties of *Psidium cattleianum* Sabine (araçá), *Butia odorata* (Barb. Rodr.) *Noblick* (butiá) and *Eugenia uniflora* L. (pitanga) fruit extracts. **Food & Function**, v. 9, p. 6380-6390, 2018.
- VITOLA, H.R.S.; DOS SANTOS CRUXEN, C.E.; DA SILVA, F.T.; THIEL, P.R.; DE LIMA MARQUES, J.; DA SILVA, W.P.; FIORENTINI, Â.M. *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell immobilization, viability during storage in Petit Suisse cheese and passage through gastrointestinal transit *in vitro*. **LWT**, v. 127, p. 109381, 2020.
- WACKLIN, P.; KAUKINEN, K.; TUOVINEN, E.; COLLIN, P.; LINDFORS, K.; PARTANEN, J. The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, p. 934–41, 2013.
- WANG, Y.; WU, Y.; WANG, B.; XU, H.; MEI, X.; XU, X.; ZHANG, X.; NI, J.; LI, W. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 Protects Mice Against High-Fat Diet-Induced Obesity and Liver Injury via Regulating Host Metabolism and Gut Microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1161, 2019.
- WARDANI, A. K.; EGAWA, S.; NAGAHISA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 220-230, 2006.
- WEI, S.H.; CHEN, Y.P.; CHEN, M.J. Selecting probiotics with the abilities of enhancing GLP-1 to mitigate the progression of type 1 diabetes *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 473, 2015.
- WEINERT, L.S, CAMARGO, E.G, SILVEIRO, S.P. Tratamento Medicamentoso da Hiperglicemia no Diabetes Mellitus Tipo 2. **Clinical & Biomedical Research**, v. 30, 2015.
- WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e Alimentos Lácteos Fermentados – Uma Revisão. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v 68, p 49-57, 2013.
- WICIŃSKI, M.; GĘBALSKI, J.; GOŁĘBIEWSKI, J.; MALINOWSKI, B. Probiotics for the treatment of overweight and obesity in humans — a review of clinical trials. **Microorganisms**, v. 8, p. 1148, 2020.
- WIDGEROW, A.D. Cellular resolution of inflammation—catabasis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, p. 2-7, 2012.

- WILLIAMSON, C. Functional foods: what are the benefits? **British Journal of Community Nursing**, v.14, p. 230–236, 2009.
- WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p. 48-57, 2013.
- WOO, V.; ALENGHAT, T. Host-microbiota interactions: epigenomic regulation. **Current Opinion in Immunology**, v. 44, p. 52–60, 2017.
- WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION GLOBAL GUIDELINES. Doença Celíaca, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on non-communicable diseases. 2010.
- WU, H.J.J.; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, p. 4-14, 2012.
- XU, Q.; HIGGINS, T.; CEMBROWSKI, G.S. Limiting the Testing of AST. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 144, p. 423-426, 2015.
- YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 189-95, 2008.
- YAMASHITA, Y.; OKABE, M.; NATSUME, M.; ASHIDA, H. Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 527, p. 95-104, 2012.
- YAN, F.; LI, N.; YUE, Y.; WANG, C.; ZHAO, L.; EVIVIE, S.E.; HUO, G. Screening for potential novel probiotics with dipeptidyl peptidase IV-inhibiting activity for type 2 diabetes attenuation *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2855, 2020.
- YATSUNENKO, T.; REY, F.E.; MANARY, M.J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; CONTRERAS, M. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, p. 222–7, 2012.
- YIN, M.C.; LIN, M.C.; MONG, M.C.; LIN, C.Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7697-7701, 2012.
- ZANOTTI, I.; DALL'ASTA, M.; MENA, P.; MELE, L.; BRUNI, R.; RAY, S.; DEL RIO, D. Atheroprotective effects of (poly) phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. **Food & Function**, v.6, p. 13-31, 2015.
- ZENG, Z.; YUAN, Q.; YU, R.; ZHANG, J.; MA, H.; CHEN, S. Ameliorative effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* NL41 on insulin sensitivity, oxidative stress, and beta-cell function in a type 2 diabetes mellitus rat model. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, p. 1900457, 2019.
- ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C.M.A.P.; HARRIS, H.M.B.; MATTARELLI, P. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782–2858, 2020.

ZIENA, H.M.; ABD-ELHAMID, A.M. Production of functional yogurt: effect of natural antioxidant from guava (*Psidium guajava*) leaf extract. **Journal of Agriculture and Food Science Technology**, v. 8, p. 102-116, 2009.

## APÊNDICES

### Apêndice A

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa – iogurte probiótico enriquecido com extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) no controle da diabetes - no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone do pesquisador (a), podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

**OBJETIVOS:** Fui informado de que o objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento iogurte probiótico enriquecido com extrato de araçá vermelho.

**PROCEDIMENTOS:** Fui informado de que receberei uma amostra iogurte probiótico enriquecido com extrato de araçá vermelho e que responderei uma ficha de aceitabilidade e de intenção de compra.

**RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES:** Fui informado que o iogurte contém lactose e que indivíduos com intolerância, devem evitar o consumo deste produto.

**BENEFÍCIOS:** O benefício de participar desta pesquisa está relacionado com a elaboração de um novo produto que apresenta elevado valor nutricional, o que torna importante por ser uma opção saudável para pessoas diabéticas e para a população em geral.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:** A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e poderei retirar meu consentimento em qualquer momento da análise. Sendo que nenhum tipo de penalidade será aplicado caso não seja do meu interesse participar.

**CONFIDENCIALIDADE:** Estou ciente que a minha identidade permanecerá preservada durante o estudo e que os dados coletados serão utilizados apenas para fins de pesquisa.

**CONSENTIMENTO:** Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial dos produtos elaborados na pesquisa.

Pelo presente consentimento livre e esclarecido eu \_\_\_\_\_, declaro que fui informado (a), de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa e da metodologia desta pesquisa, através de encontro individual e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção.

DATA:        /        /

ASSINATURA DO PARTICIPANTE

\_\_\_\_\_

ASSINATURA PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_

TELEFONE

\_\_\_\_\_

## ANEXOS

### Anexo A

#### Ficha de avaliação

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

Faixa etária: ( ) < 19 anos ( ) 19 a 45 anos ( ) 45 a 56 anos ( ) > 56 anos

Gênero: ( ) feminino ( ) masculino ( ) outro

Você está recebendo uma amostra de iogurte probiótico enriquecido com extrato de açafrão vermelho. Primeiro visualize a cor e preencha o tracejado com a nota da escala abaixo. A seguir faça isso para o odor, a textura e o sabor.

9 - gostei muitíssimo	CARACTERÍSTICA	AMOSTRA xxx
8 - gostei muito		
7 - gostei moderadamente	COR	
6 - gostei ligeiramente	AROMA	
5 - nem gostei/nem desgostei	TEXTURA	
4 - desgostei ligeiramente	SABOR	
3 - desgostei moderadamente		
2 - desgostei muito		
1 - desgostei muitíssimo		

Agora marque sua intenção de compra do iogurte (Amostra xxx):

- ( ) certamente compraria
- ( ) provavelmente compraria
- ( ) talvez compraria
- ( ) provavelmente não compraria
- ( ) certamente não compraria

## Anexo B

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IOGURTE PROBIÓTICO ENRIQUECIDO COM EXTRATO DE ARAÇÁ VERMELHO (Psidium cattleianum Sabine) NO TRATAMENTO DA DIABETES TIPO II

**Pesquisador:** ELISA DOS SANTOS PEREIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 26087219.0.0000.5317

**Instituição Proponente:** Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.784.797

#### Apresentação do Projeto:

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são um problema de saúde global. Dentre elas, destaca-se a diabetes tipo II, que é caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou ação de insulina ou ambos. Visto o crescente no número de diabéticos tipo II, evidencia-se a importância do desenvolvimento de novos produtos com potencial de prevenção e/ou tratamento desta doença. Devido a isso, o interesse da população a respeito de alimentos mais saudáveis e que proporcionem benefícios à saúde, está aumentando. Destaca-se a crescente procura e consumo de alimentos com alegações funcionais, estes definidos como: todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (BRASIL, 2002). Os alimentos funcionais podem ser empregados para auxiliar na redução do risco de diversas doenças (AGOSTONI et al., 2004). Dentre estes alimentos, podem ser destacados os probióticos, definidos como micro-organismos vivos, que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). O uso de probióticos pode ser utilizado no controle e na reconstrução da microbiota intestinal, aumentando o número de micro-organismos benéficos e suas atividades (SANTOS; VARAVALHO, 2011), participam na modulação da resposta imune de diversas maneiras: competindo com os patógenos por nutrientes e sítios de fixação (KANMANI et al., 2013) promovendo benefícios à saúde.

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3301-1801

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.784.797

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial de iogurte probiótico, adicionado de extrato de araçá vermelho como agentes moduladores, no tratamento da diabetes tipo II.

Objetivos Secundários:

- Obter o extrato de araçá vermelho;
- Avaliar *in vitro* a atividade moduladora do extrato de araçá na diabetes tipo II, bem como do *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, na diabetes tipo II;
- Avaliar a atividade dos compostos do extrato de araçá, através do trânsito gastrointestinal simulado;
- Desenvolver e caracterizar iogurte suplementado com *L. lactis* R7 e adicionado de extrato de araçá;
- Avaliar *in vitro* a atividade moduladora do iogurte probiótico (*L. lactis* R7 e extrato de araçá), na diabetes tipo II;
- Determinar a concentração do IC50 para *L. lactis* R7, o extrato de araçá e para o iogurte (*L. lactis* R7 e extrato de araçá);
- Verificar *in vitro* a atividade antihiperlipidêmica do iogurte com *L. lactis* R7 e extrato de araçá.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES:** não existem riscos em consumir o produto. No entanto, o consumidor não deve possuir nenhum tipo de alergia e/ou reação adversa a este produto, cuja formulação será composta de: leite integral, adoçante Stevia e extrato de araçá.

**BENEFÍCIOS:** O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato de que os resultados irão contribuir para diversificação de produtos lácteos probióticos com adição de araçá, uma fruta nativa, proporcionando benefícios para saúde do consumidor, inclusive com potencial no tratamento da Diabetes tipo II.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O probiótico utilizado será *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, o iogurte terá adição de Stevia e será suplementado ainda, com extrato de araçá vermelho, cuja atividade antidiabética já foi

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250  
**Bairro:** Fragata **CEP:** 96.030-001  
**UF:** RS **Município:** PELOTAS  
**Telefone:** (53)3301-1801 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.784.797

evidenciada. Será avaliada atividade antidiabética do iogurte através da inibição das enzimas digestivas alfa-amilase e alfa-glicosidase. As demais análises realizadas com o iogurte serão sólidos solúveis totais, acidez, pH, cor, reologia, compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante. Também serão realizadas no iogurte, análises microbiológicas e posterior análise sensorial. A atividade de inibição das enzimas digestivas (IC50) dos extratos de araçá serão expressos em g/mL, e analisados através do programa GraphPad Prism. Os compostos bioativos, composição físico-química e análises microbiológicas serão submetidos à análise de variância e variáveis com efeito significativo serão comparados pelo teste de Tukey a 5% nível de confiança. Espera-se obter um produto inovador que proporcione benefícios à saúde do consumidor, assim como aumentar a diversidade de produtos para diabéticos. Os frutos de araçá vermelho (AC 87) serão obtidos do Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Estes serão armazenados e/ou processados no Núcleo de Alimentos desta mesma unidade.

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

OK

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

OK

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	TCLE_17_12.pdf	19/12/2019 16:06:18	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Outros	TCLE_17_12.pdf	19/12/2019 16:06:18	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Outros	projeto_iogurte.pdf	19/12/2019 16:06:04	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Outros	projeto_iogurte.pdf	19/12/2019 16:06:04	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1474653.pdf	19/11/2019 11:27:25		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	19/11/2019 11:25:23	ELISA DOS SANTOS PEREIRA	Aceito
Outros	Ficha.pdf	19/11/2019 11:12:51	ELISA DOS SANTOS PEREIRA	Aceito
Outros	Oficio.pdf	19/11/2019 11:10:05	ELISA DOS SANTOS PEREIRA	Aceito
Projeto Detalhado	PROJETO.pdf	19/11/2019	ELISA DOS SANTOS	Aceito

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3301-1801

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 3.784.797

/ Brochura Investigador	PROJETO.pdf	11:02:04	PEREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/11/2019 10:59:45	ELISA DOS SANTOS PEREIRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 19 de Dezembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Patricia Abrantes Duval**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250  
**Bairro:** Fragata **CEP:** 96.030-001  
**UF:** RS **Município:** PELOTAS  
**Telefone:** (53)3301-1801 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

## Anexo C



PARECER Nº  
PROCESSO Nº

112/2020/CEEA/REITORIA  
23110.018783/2020-98

### Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Potencial antihiperlicêmico de iogurte com *Lactococcus lactis* R7 e extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) no tratamento de diabetes tipo II**”, registrada com o nº 23110.018783/2020-98, sob a responsabilidade de **Ângela Maria Fiorentini** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **11 de setembro de 2020**.

Finalidade	( x ) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	03/10/2020 a 02/10/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL6
Nº de animais	72
Idade	90 dias
Sexo	36 machos e 36 fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 18783-2020