UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Avaliação da potencialidade da farinha de banana verde como
ingrediente funcional: estudo *in vivo* e *in vitro*

Milana Cara Tanasov Dan

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Elizabete Wenzel de Menezes

São Paulo

2011

Milana Cara Tanasov Dan

Avaliação da potencialidade da farinha de banana verde como
ingrediente funcional: estudo *in vivo* e *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais, *Luiz e Sandra*,
que me ensinaram que tudo é possível,
desde que sejamos honestos, íntegros e persistentes;
que me ensinaram o que é amor, respeito e companheirismo;
que sempre estiveram ao meu lado, incondicionalmente,
e que me fazem acreditar, todos os dias,
que eu sou a pessoa mais capaz do mundo!

Agradecimentos

À minha avó Vera, por ser minha fã número 1 e me achar a pessoa mais linda e inteligente do universo! Sou privilegiada em tê-la comigo e agradeço todos os dias por ser sua neta! Я тебя люблю!

Ao Lú, meu irmão, meu companheiro, amigo e conselheiro!

Ao Edu, por acreditar mais em mim do que eu mesma! Graças a você, essa reta final foi menos árdua e mais divertida! Eu te amo!

À Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes, minha orientadora e amiga, pelos ensinamentos e carinho durante os últimos 9 anos. Vou sentir saudades!

A todos do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, em especial às minhas queridas “irmãs” Eliana Giuntini e Juliana Ferreira, pela amizade e ajuda em todas as horas.

À técnica Aline e aos estagiários Claudio e Lia. Sem vocês, eu ainda estaria na bancada, pipetando!! Obrigada!

Às minhas queridas amigas Amanda e Fernanda, por tornarem o trabalho mais prazeroso e por fazerem parte da minha vida!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos funcionários do Biotério da FCF-IQ/USP, por todo apoio e colaboração constantes durante os experimentos.

À Profa. Dra. Patrícia Gama, do Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do Departamento de Histologia e Embriologia (ICB/USP), pela orientação, e por estar sempre pronta a ajudar. Obrigada por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e pessoal!

Ao técnico Júnior, do Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do ICB/USP, pela confecção das lâminas. Sem você, minhas lâminas seriam um desastre! Obrigada pela amizade e carinho!

Ao Prof. Dr. Ângelo Carpinelli, do Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina do ICB/USP, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e pessoal. Agradeço em especial à técnica Laila, pela realização dos experimentos de secreção de insulina. Sua disposição e ajuda foram imprescindíveis!

À Profa. Dra. Carmen Tadini, por disponibilizar espaço e pessoal para confecção dos primeiros lotes de farinha e por sua participação imprescindível na elaboração da farinha de banana verde. Obrigada por seu carinho em todas as horas!

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL-Campinas), especialmente à Profa. Dra. Michele Berteli, do GPEC, pelo espaço e equipamentos cedidos.

À Sadia S/A, por fornecer as refeições para os ensaios com humanos.

Ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da USP, e a todo o pessoal de enfermagem, pela dedicação e amizade durante os ensaios.

A todos os voluntários que participaram desta pesquisa, principalmente às queridas voluntárias: Alexandra, Aline, Ana Mara, Beatriz, Claudinéia, Erika, Helena, Juliana, Lucia, Marcela, Michele, Nelaine, Neuza e Vanilda, por terem, literalmente, dado o sangue para este trabalho! Sem vocês, isso tudo seria impossível! Muito obrigada!

*“If we knew what we were doing, it wouldn’t be called research.”
(Albert Einstein)*

Resumo

A cada dia cresce o interesse por alimentos ricos em carboidratos não disponíveis em virtude da relação inversa entre seu consumo e o risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). No presente trabalho, foi avaliado o potencial fisiológico da farinha de banana verde (FBV) como ingrediente funcional. Em ratos adultos, foi realizado ensaio de média duração (28 dias) para avaliação do efeito trófico da FBV sobre o intestino grosso e de parâmetros relacionados à tolerância à glicose. Em humanos, foram realizados ensaios clínicos de curta e média duração para avaliação dos efeitos sobre resposta glicêmica; liberação de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade; *status* antioxidante; fome e saciedade; e funcionamento intestinal. A FBV foi produzida com banana verde, *Musa acuminata*, de acordo com patente depositada pelo grupo (Patente (RPI - 1941), 2008). A FBV é uma fonte concentrada de carboidratos não disponíveis, com 56% de AR e 8% de FAT na base integral. A adição de FBV nas rações provocou efeito trófico no ceco dos animais, evidenciado por aumento no índice metafásico, número de células da cripta e profundidade das criptas. Além disso, a ração com FBV proporcionou melhora nos parâmetros relacionados à tolerância à glicose. Em voluntários saudáveis, a ingestão de uma única refeição adicionada de 8 g de FBV proporcionou aumento na saciedade e boa correlação entre os parâmetros fome/saciedade e níveis plasmáticos de grelina e insulina, melhorou o funcionamento intestinal, além de resultar em alta fermentabilidade *in vitro* em relação à lactulose. Após ingestão diária da FBV por 14 dias, os resultados da ingestão de RC0 (refeição controle antes do tratamento) e de RC14 (RC0 após 14 dias de tratamento) mostraram que ocorre melhora na tolerância à glicose, evidenciada pela menor liberação de insulina durante o GTT. O efeito positivo sobre funcionamento intestinal, sobre saciedade e sobre liberação de hormônios gastrintestinais no plasma permaneceu após ingestão prolongada da FBV. A adição da FBV na refeição resultou em aumento da capacidade antioxidante *in vitro*. A FBV apresenta inúmeros atributos positivos para elaboração de produtos que ampliem as opções para uma alimentação saudável, bem como propiciem saúde intestinal, visando a diminuição do risco de DCNT.

Palavras-chave: farinha de banana verde (FBV); ingrediente funcional; amido resistente, carboidrato não disponível; hormônios gastrintestinais; fome; saciedade; funcionamento intestinal; resposta glicêmica.

Abstract

The study of unavailable carbohydrates has been of great concern due to their inverse relation with the risk for non-transmissible chronic diseases (NTCD). In the present study, the functional potential of unripe banana flour (UBF) was evaluated. In rats, a medium-term assay was carried in order to evaluate parameters related to glucose tolerance and the trophic effect of UBF on the large bowel. In healthy volunteers, short and medium-term clinical assays were carried to evaluate the effects of UBF on glycemic response; release of gastrointestinal hormones related to satiety (ghrelin, leptin and insulin); antioxidant status; hunger and satiety; and intestinal health. UBF was produced with unripe banana, *Musa acuminata*, subgroup Cavendish, maturation stage I, in industrial scale and according to a patent deposited by the group (Patent (RPI - 1941), 2008). UBF is a concentrated source of unavailable carbohydrates, with 56% RS and 8% DF (wet weight). Adding UBF in rat rations resulted in a trophic effect in the animals' cecum, which was evidenced by increase in the metaphasic index, number of crypt cells and crypt depth. Moreover, the ration with UBF resulted in better glucose tolerance parameters. In healthy volunteers, adding UBF (8 g) to an only meal provided significant satiety and good correlation between the parameters hunger/ satiety and plasmatic levels of ghrelin and insulin, improved bowel habit, as well as resulted in high *in vitro* fermentability in relation to lactulose. After daily intake of UBF for 14 days, the results of the intake of RC0 (control meal before treatment) and RC14 (RC0 after 14 days treatment) showed that there is a positive post-prandial variation in the plasmatic concentrations of gastrointestinal hormones, as well as improvement in glucose tolerance, evidenced by lower insulin release during GTT. The positive effect on bowel habit, satiety and release of gastrointestinal hormones in plasma was kept after prolonged intake of UBF. Adding UBF to the meal provided significant increase in the *in vitro* antioxidant capacity. UBF presents several positive attributes for the elaboration of products that may increase the options for healthy eating habits, as well as provide intestinal health, always aiming to decrease the risk for NTCD.

Key words: unripe banana flour (UBF); functional ingredient; resistant starch; unavailable carbohydrate; gastrointestinal hormones; hunger, satiety, bowel habit; glycemic response.

Abreviações

AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta

AGL - Ácidos graxos livres

AR - Amido resistente

b.i. - Base integral

b.s. - Base seca

CG - Carga glicêmica

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

DCV - Doença cardiovascular

FBV - Farinha de banana verde

FA - Fibra alimentar

FAT - Fibra alimentar total

FND - Fração não disponível

GTT - Teste de tolerância à glicose

h - horas

IG - Índice glicêmico

IMC - Índice de massa corporal

min – minutos

SM – Síndrome metabólica

VAS - *Visual Analogue Scale* (Teste de escala visual)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Ingredientes utilizados na preparação das rações controle (R-C) e adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)	49
Quadro 2.	Características e ingredientes das refeições congeladas controle e adicionada de farinha de banana verde (FBV)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química (g/ 100 g amostra base integral e seca) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral e seca) da farinha de banana verde (FBV)	75
Tabela 2.	Fração não disponível (FND) (g/ 100 g amostra base integral e base seca) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral e base seca) da farinha de banana verde (FBV)	77
Tabela 3.	Variação de pH e pressão final resultante da fermentação <i>in vitro</i> da fração não disponível da farinha de banana verde (FBV), pectina e lactulose	81
Tabela 4.	Fermentabilidade <i>in vitro</i> da fração não disponível da farinha de banana verde (FBV) e pectina	82
Tabela 5.	Proporção molar de AGCC produzidos na fermentação <i>in vitro</i> da lactulose e da fração não disponível da farinha de banana verde (FBV)	83
Tabela 6.	Composição química (g/ 100g) e valor energético da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)	84
Tabela 7.	Conteúdo de amido resistente (AR), amido total (AT) e amido disponível (AD) da ração controle (R-C) e ração adicionada de FBV (R-FBV) (g/ 100g)	85
Tabela 8.	Variação de pH e pressão final resultante da fermentação <i>in vitro</i> da fração não disponível da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)	86
Tabela 9.	Fermentabilidade <i>in vitro</i> da fração não disponível da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)	86
Tabela 10.	Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação <i>in vitro</i> da fração não disponível da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)	87
Tabela 11.	Parâmetros nutricionais e peso e umidade das fezes dos animais do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV)	91
Tabela 12.	Peso de diferentes partes do ceco de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV)	94
Tabela 13.	Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em relação ao total produzido no ceco de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV)	97

Tabela 14.	Composição química (g/ 100 g amostra base integral) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral) das refeições controle (RC) e RC adicionada de farinha de banana verde (RF)	103
Tabela 15.	Fração não disponível (FND) (g/ 100 g amostra base integral) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral) das refeições controle (RC) e RC adicionada de farinha de banana verde (RF)	104
Tabela 16.	Variação de pH e pressão resultantes da fermentação <i>in vitro</i> da fração não disponível da refeição controle (RC), refeição adicionada de farinha de banana verde (RF), lactulose e pectina	106
Tabela 17.	Fermentabilidade <i>in vitro</i> da fração não disponível da refeição controle (RC) e refeição adicionada de farinha de banana verde (RF)	106
Tabela 18.	Proporção molar de AGCC produzidos na fermentação <i>in vitro</i> da fração não disponível da refeição controle (RC) e refeição adicionada de FBV (RF)	107
Tabela 19.	Capacidade antioxidante, avaliada por três diferentes métodos, de farinha de banana verde (FBV) e refeições controle (RC) e adicionada de FBV (RF)	110
Tabela 20.	Resposta glicêmica (mmol/ L) de voluntários saudáveis (n=15) durante 120 min e ASC, após a ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV)	112
Tabela 21.	Índice glicêmico (IG) (%) e carga glicêmica (CG) de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=15)	113
Tabela 22.	Concentrações média, mediana, mínima e máxima de grelina plasmática (pg/ mL) e variação percentual em relação ao jejum (t 0), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	116
Tabela 23.	Concentrações média, mediana, mínima e máxima de leptina plasmática (pg/ mL) e variação percentual em relação ao jejum (t 0), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	118
Tabela 24.	Concentrações média, mediana, mínima e máxima de insulina plasmática (pg/ mL) e variação percentual em relação ao jejum (t 0), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	119
Tabela 25.	Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina e insulina, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	120

Tabela 26.	Resposta glicêmica (mmol/ L) durante 180 min e ASC, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	121
Tabela 27.	Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina, insulina e glicose, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	122
Tabela 28.	Correlação entre parâmetros de fome e saciedade e hormônios gastrintestinais no plasma de voluntárias saudáveis (n=14), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV)	125
Tabela 29.	Ingestão energética (média, mediana, mínima e máxima (kJ)) e variação percentual (%) em duas refeições subseqüentes (lanche e jantar), após ingestão de RC e RF em voluntários saudáveis (n=50)	127
Tabela 30.	Capacidade antioxidante no plasma (% dados normalizados), analisada pelos métodos capacidade sequestrante do DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)	132
Tabela 31.	Concentrações média, mediana, mínima e máxima de grelina plasmática (pg/ mL), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	138
Tabela 32.	Concentrações média, mediana, mínima e máxima de leptina plasmática (pg/ mL), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	139
Tabela 33.	Concentrações média, mediana, mínima e máxima de insulina plasmática (pg/ mL), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	140
Tabela 34.	Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina e insulina, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	141
Tabela 35.	Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina, insulina e glicose, após ingestão de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	142
Tabela 36.	Correlação entre parâmetros de fome e saciedade e hormônios gastrintestinais plasmáticos, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	148
Tabela 37.	Ingestão energética (média, mediana, mínima e máxima (kJ)) e variação percentual (%) em duas refeições subseqüentes (lanche e almoço), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)	148

Tabela 38. Capacidade antioxidante no plasma (% dados normalizados), analisada pelos métodos capacidade sequestrante do DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Escala bipolar de Holt.	65
Figura 2.	Fatias de polpa de banana verde (<i>Musa acuminata</i> , subgrupo Cavendish) secas a 55 °C e farinha de banana verde (FBV)	74
Figura 3.	Microscopia eletrônica da farinha da polpa de banana verde (<i>Musa acuminata</i> , subgrupo Cavendish) seca a 55 °C	79
Figura 4.	Imagens de cortes histológicos do ceco de ratos do grupo controle (Grupo C) (1) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV) (2). Coloração H&E. Aumento 40x. Setas indicam células metafásicas. Gráficos: (A) Índice metafásico (%); (B) número de células por cripta; (C) profundidade das criptas (µm). Valores expressos como média ± DP. n=5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) (Teste t de Student)	99
Figura 5.	Resposta glicêmica de voluntários saudáveis (n=15) após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV	111
Figura 6.	Variação percentual em relação ao jejum da concentração plasmática de grelina (A), insulina (B) e leptina (C), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) por voluntários saudáveis (n=14). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV	115
Figura 7.	Área sob a curva (ASC) para escala bipolar de Holt, para avaliação de fome/saciedade (fome extrema=0) em voluntários saudáveis (n=50), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$)	123
Figura 8.	Variação da (A) fome, (B) perspectiva de consumo, (C) saciedade e (D) desejo de comer em voluntários saudáveis (n=50), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$)	124
Figura 9.	Ingestão energética posterior (lanche - 180 min e jantar - 360 min) à ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=50). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. Total = lanche + jantar. *diferença significativa entre RC e RF (teste de Tukey, $p < 0,05$)	127

Figura 10.	Atividade antioxidante da urina, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14). RC – refeição controle. RF – RC adicionada de FBV. Dados normalizados (%)	133
Figura 11.	Efeito da ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) sobre o funcionamento intestinal. Resultados expressos em porcentagem de voluntários saudáveis (n= 50) antes e após 24 h da ingestão das diferentes refeições (RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV). *Flatulência, dor e distensão abdominal	134
Figura 12.	Variação percentual em relação ao jejum da concentração plasmática de grelina (A), insulina (B) e leptina (C), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=15). RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento	137
Figura 13.	Área sob a curva (ASC) de glicose em voluntários saudáveis (n=14), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em ensaio de curta duração (A) e após ingestão diária de FBV por 14 dias (B). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. RC0 - refeição controle antes do tratamento. RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$)	141
Figura 14.	Teste de tolerância à glicose (GTT) de voluntários saudáveis (n=14), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 12 dias. GTT1 - teste antes do tratamento; GTT 2 - teste após 12 dias de tratamento	144
Figura 15.	Área sob a curva (ASC) de glicose (A) e insulina (B) de voluntários saudáveis (n=14), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 12 dias. GTT 1 - teste antes do tratamento; GTT 2 - teste após 12 dias de tratamento	145
Figura 16.	Área sob a curva (ASC) para escala bipolar de Holt, para avaliação de fome/saciedade (fome extrema=0) em voluntários saudáveis (n=14), durante 180 min, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias. RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$)	146
Figura 17.	Variação da (A) fome, (B) perspectiva de consumo, (C) saciedade e (D) desejo de comer em voluntários saudáveis (n=14) durante 180 min, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias. RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC após 14 dias de tratamento	147

- Figura 18. Ingestão energética posterior (lanche - 180 min e almoço - 360 min) à ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14). RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. Total = lanche + almoço. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$) 149
- Figura 19. Atividade antioxidante da urina após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14). RC0 - refeição controle antes do tratamento. RC14 – RC0 após 14 dias de tratamento. Dados normalizados (%) 150
- Figura 20. Funcionamento intestinal em voluntários saudáveis (n=14), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias. Resultados expressos em porcentagem de voluntários antes e após 24 h da ingestão das refeições (RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento). *Flatulência, dor e distensão abdominal 152

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Curva de crescimento dos animais do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 24 ratos/grupo	89
Gráfico 2.	Consumo semanal de ração do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 24 ratos/grupo	89
Gráfico 3.	Umidade de pool de fezes do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 24 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$)	87
Gráfico 4.	Peso médio semanal de fezes secas (g/100 g de rato) do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 24 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$)	90
Gráfico 5.	Curvas de concentração de glicose (mmol/ L) (A) e insulina (ng/ mL) (B) do teste de tolerância à glicose (GTT) de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$)	92
Gráfico 6.	Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas (pg/ ilhota), incubadas com diferentes concentrações de glicose (5,6 e 16,7 nM), de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$)	93
Gráfico 7.	pH do conteúdo cecal de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). Valores expressos como média $\pm$ DP. n = 5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$)	96

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	OBJETIVOS	37
3.	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Farinha de banana verde (FBV)	38
3.1.1	Análises químicas realizadas na FBV	39
3.1.1.1	Composição centesimal	39
3.1.1.2	Amido resistente (AR)	39
3.1.1.3	Amido total e amido disponível (AD)	40
3.1.1.4	Fibra alimentar total (FAT)	41
3.1.1.5	Açúcares solúveis	41
3.1.1.6	Frutanos	41
3.1.1.7	Fração não disponível (FND) solúvel e insolúvel	42
3.1.1.8	Isolamento da fração não disponível (FND)	43
3.1.1.9	Fermentação <i>in vitro</i>	43
3.1.1.10	Ácidos graxos de cadeia curta	45
3.1.1.11	Microscopia eletrônica de varredura	45
3.1.1.12	Capacidade antioxidante in vitro (três diferentes métodos)	46
3.2	Animais	48
3.2.1.	Rações	48
3.2.1.1.	Ração comercial do biotério da FCF/IQ-USP	48
3.2.1.2	Ração controle (R-C)	48
3.2.1.3	Ração adicionada de FBV (R-FBV)	48
3.2.2	Análises químicas realizadas nas rações	49
3.2.2.1	Composição centesimal	49
3.2.2.2	Frações de amido (AR, AT e AD)	50
3.2.2.3	Fibra alimentar total (FAT)	50
3.2.2.4	Quantificação da fração não disponível (FND) solúvel e insolúvel	50
3.2.2.5	Isolamento da fração não disponível (FND)	50
3.2.2.6	Fermentação <i>in vitro</i>	50
3.2.2.7	Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	51
3.2.3	Protocolo experimental	51

3.2.3.1	Teste de tolerância à glicose (GTT)	52
3.2.3.2	Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas	52
3.2.3.3	Análises histológicas	54
3.2.3.4	Fermentação <i>in vivo</i>	57
3.3	Humanos	58
3.3.1	Refeições congeladas	58
3.3.2	Análises químicas realizadas nas refeições	59
3.3.2.1	Composição centesimal	59
3.3.2.2	Frações de amido (AR, AT e AD)	59
3.3.2.3	Fibra alimentar total (FAT)	60
3.3.2.4	Açúcares solúveis	60
3.3.2.5	Frutanos	60
3.3.2.6	Quantificação da fração não disponível (FND) solúvel e insolúvel	60
3.3.2.7	Isolamento da fração não disponível (FND)	60
3.3.2.8	Fermentação <i>in vitro</i>	60
3.3.2.9	Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	61
3.3.2.10	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	61
3.3.3	Análises químicas, bioquímicas e parâmetros fisiológicos realizados nos ensaios clínicos	61
3.3.3.1	Determinação de capacidade antioxidante <i>in vivo</i> (dois diferentes métodos)	61
3.3.3.2	Glicose sanguínea	62
3.3.3.3	Hormônios gastrintestinais	63
3.3.3.4	Insulina	63
3.3.3.5	Creatinina	63
3.3.3.6	Índice glicêmico (IG) e carga glicêmica (CG)	63
3.3.3.7	Teste de tolerância à glicose (GTT)	64
3.3.3.8	Avaliação da saciedade	64
3.3.3.9	Avaliação do funcionamento intestinal	65
3.3.4	Ensaios clínicos	65
3.3.4.1	Protocolo experimental do ensaio de resposta glicêmica	66

3.3.4.2	Protocolo experimental do ensaio de avaliação do funcionamento intestinal	67
3.3.4.3	Protocolo experimental do ensaio de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade e capacidade antioxidante no plasma e urina	68
3.3.4.4	Protocolo experimental do ensaio para avaliação de fome e saciedade	70
3.4	Análise estatística	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	Farinha de banana verde (FBV)	74
4.1.1	Perfil químico, nutricional, microscópico e microbiológico da farinha de banana verde (FBV)	74
4.1.2	Fermentação <i>in vitro</i> da FBV	80
4.2	Ensaio com animais	84
4.2.1	Perfil químico e nutricional das rações	84
4.2.2	Fermentação <i>in vitro</i> das rações	85
4.2.3	Ensaio biológico: Parâmetros e efeitos avaliados	88
4.2.3.1	Crescimento, consumo e peso e umidade das fezes	88
4.2.3.2	GTT	91
4.2.3.3	Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas	93
4.2.3.4	Fermentação <i>in vivo</i> e características cecais	94
4.2.3.5	Efeito trófico no ceco	98
4.3	Ensaio com humanos	102
4.3.1	Perfil químico e nutricional das refeições congeladas	102
4.3.2	Perfil de fermentação <i>in vitro</i> das refeições congeladas	105
4.3.3	Capacidade antioxidante da farinha de banana verde (FBV) e refeições congeladas	108
4.3.4	Ensaio clínico de curta duração	110
4.3.4.1	Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre a resposta glicêmica	111
4.3.4.2	Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade	114

4.3.4.3	Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre a fome e saciedade	123
4.3.4.4	Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre o <i>status</i> antioxidante	131
4.3.4.5	Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre o funcionamento intestinal	133
4.4	Ensaio clínico de média duração	135
4.4.1	Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade	135
4.4.2	Teste de tolerância à glicose (GTT) antes e após a ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias	144
4.4.3	Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre fome e saciedade	146
4.4.4	Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre o <i>status</i> antioxidante	149
4.4.5	Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre o funcionamento intestinal	151
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	153
6	CONCLUSÃO	156
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
8	ANEXOS	169

1 INTRODUÇÃO

Alimentos Funcionais

Sabe-se que a nutrição é um dos principais determinantes da saúde. O consumo exacerbado de dietas ricas em gordura (principalmente gordura saturada) e açúcar e deficientes em carboidratos não disponíveis e micronutrientes, combinado ao sedentarismo, são fatores que favorecem o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como é o caso de obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, osteoporose e câncer de cólon (JENKINS et al., 2004; LAJOLO, 2002).

A dieta não auxilia apenas no alcance de uma ótima saúde e bem-estar, mas pode também desempenhar um papel importante na minimização de certas patologias. Esta ampliação dos conceitos de nutrição é a nova proposta da ciência dos alimentos funcionais (DIPLOCK et al., 1999; LAJOLO, 2002; ROBERFROID, 2005).

Por definição, os alimentos funcionais são alimentos ou bebidas que, além de desempenhar a função básica de nutrir, possuem substâncias específicas (os compostos bioativos) que fornecem benefícios fisiológicos ao organismo, melhorando a saúde ou auxiliando na diminuição do risco de desenvolver DCNT. Os compostos bioativos estão presentes nos alimentos *in natura* ou são ingredientes adicionados a alimentos industrializados (MILNER, 2000; ARAI et al., 2001; JONES, 2002; ROBERFROID, 2005; OHAMA; IKEDA; MORIYAMA, 2006).

O desenvolvimento de alimentos funcionais é extremamente importante quando se trata de DCNT, como é o caso da obesidade. A obesidade e o sobrepeso têm sido apontados como um sério problema de saúde pública. De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004), apenas 4% da população adulta apresenta déficit de peso, ao passo que 40% apresenta excesso, sendo que 11% dos adultos brasileiros são obesos. A obesidade está relacionada com a síndrome metabólica (SM), que tem como base a resistência à ação da insulina, e pode levar ao diabetes. A SM deve ser evitada ao máximo, pois aumenta em duas vezes o risco de doença cardiovascular (DCV),

cinco vezes o risco de diabetes e em três vezes o risco de DCV no diabético (GRUNDY, 2006); cerca de 25% da população mundial apresenta diagnóstico positivo para SM.

Esses dados apontam a importância do desenvolvimento de alimentos funcionais não apenas para o controle da obesidade, mas também de outras doenças relacionadas à dieta, seja pela deficiência ou pelo excesso, como é o caso de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer de cólon (LAJOLO, 2002).

O processo de digestão envolve uma série de fases, que inclui desde a mastigação, esvaziamento gástrico, digestão, absorção pelos enterócitos do intestino delgado, até a penetração dos nutrientes na corrente sanguínea, processo esse que resulta na alteração dos níveis de glicose plasmática. O aumento dessa glicose eleva os níveis plasmáticos de insulina e podem provocar resistência à insulina; esses e outros fatores (alta ingestão de energia, obesidade, falta de atividade física) estão envolvidos na etiologia de diabetes, obesidade, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e câncer. Os carboidratos não disponíveis, como o amido resistente (AR), frutanos, proporcionam moderado aumento de glicose e insulina plasmática, mesmo após refeição com elevada quantidade de carboidratos, e permitem a prolongada entrada de glicose na corrente sanguínea, e têm mostrado positivos efeitos no controle da saciedade, da resistência à insulina e dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios.

O balanço energético, equilíbrio entre a ingestão e gasto energético dos alimentos, pode ser regulado pelo tamanho e frequência das refeições, que por sua vez respondem a uma série de biomarcadores relacionados à reserva energética, como a insulina e a leptina, ou ao trato digestório, como a grelina. Assim refeições que atuem sobre a supressão desses hormônios podem contribuir para o equilíbrio energético.

Hormônios gastrintestinais, saciedade e fibra alimentar

Segundo Mattes et al. (2005), embora a ligação entre os mecanismos de ingestão e gasto energético não esteja totalmente esclarecida, acredita-se que o apetite, sensação que promove a ingestão ou rejeição alimentar, é o ponto

central do balanço energético. O apetite pode ser dividido em três componentes: fome, saciação e saciedade. A fome está relacionada às sensações que promovem o consumo dos alimentos e envolve fatores metabólicos, sensoriais e cognitivos. A saciação está relacionada à diminuição de apetite, e pode ser quantificada pela duração ou tamanho da presente refeição. A saciedade, por outro lado, diz respeito à próxima refeição, podendo reduzir seu volume ou diminuir o intervalo de tempo entre elas, sendo estes seus parâmetros de avaliação (MATTES et al., 2005; BURTON-FREEMAN, 2000).

Um alimento que produza maior saciedade, ou seja, eleve o tempo em que um indivíduo sentirá fome entre duas refeições, pode ser utilizado como fator de controle de peso corporal. Há evidências, também, de que o aumento de consumo de fibra alimentar (FA) seja um fator favorável à perda/controle de peso (WHO/FAO, 2003). A fibra alimentar tem sido apontada como fator de saciação e saciedade, pois pode promover a distensão gástrica, redução do tempo de trânsito gastrointestinal e modulação de absorção de nutrientes (HOWARTH; SALTZMAN; ROBERTS, 2001).

Apesar de existir pouca informação sobre o assunto, há algum tempo estudos têm avaliado o efeito do consumo de fibra alimentar sobre a saciedade. Uma comparação entre cafés-da-manhã contendo 12,5 g ou 3 g de fibras demonstrou que a maior ingestão de fibras causou significativo aumento da saciedade após 60 minutos da ingestão (BURLEY; LEEDS; BLUNDELL, 1987). Em outro estudo, quando 29 g de fibra alimentar foram incorporadas ao café da manhã de voluntários, Burley et al. (1993a) não verificaram significativo aumento da saciedade, porém esta refeição rica em FA causou diminuição significativa do consumo energético na refeição seguinte (diminuição de 14%). Benini et al. (1995) observaram, em estudo comparativo, que o consumo de refeições ricas em FA levou à diminuição significativa da fome após 120 e 180 minutos. Segundo Burley et al. (1993b), ao comparar os efeitos causados pelo consumo de refeições contendo 3 g ou 13 g de FA, no almoço, esta última levou a um significativo aumento da saciedade após 4 horas da ingestão, e significativa diminuição no consumo energético (diminuição de 18%) no jantar.

Moorhead et al. (2006), em estudo com mulheres que consumiram refeições com e sem fibras provenientes de cenoura, observaram significativo aumento da saciedade e diminuição do consumo energético (diminuição de 22%) na refeição seguinte, naquelas voluntárias que consumiram a refeição rica em fibras.

Cani et al. (2006) realizaram um estudo objetivando avaliar os possíveis efeitos do consumo de oligofrutose sobre a saciedade. Neste estudo, 8 g de oligofrutose ou maltodextrina (placebo) foram fornecidos duas vezes ao dia (no café da manhã e no jantar) e foi observado que a oligofrutose causou aumento significativo na saciedade tanto após o café da manhã como o jantar, além de reduzir a fome e o consumo alimentar após o jantar.

Paralelamente, com a reduzida resposta glicêmica proporcionada por alguns tipos de fibra alimentar, ocorre a liberação de peptídeos gastrintestinais que atuam sobre a saciedade, como é o caso da leptina e da grelina (MATTES et al., 2005).

A insulina é produzida pelas células β do pâncreas, e a sua concentração plasmática responde à glicemia, mas também é proporcional à adiposidade; seu efeito anabólico aumenta a captação de glicose, e a queda da glicemia é um estímulo para o aumento do apetite (WOODS et al., 1998). A insulina promove também a síntese de glicogênio no fígado, músculos e tecido adiposo, assim como a glicólise nos tecidos adiposo e muscular; eleva o estoque de triacilglicerol em células adiposas, reduz a lipólise depois das refeições e eleva o metabolismo protéico. Nos adipócitos pode regular a expressão da leptina, contribuindo para a redução da ingestão de alimentos; porém reservas lipídicas excessivas podem provocar a resistência insulínica e contribuir para o desenvolvimento de síndrome metabólica e hiperglicemia (WILLIAMS; MOBARHAN, 2003).

A insulina ainda interfere na secreção de entero-hormônios como *glucagon-like-peptide* (GLP-1), que atua inibindo o esvaziamento gástrico e promove uma sensação de saciedade prolongada; e tem também uma função essencial no sistema nervoso central para promover a saciedade, aumentar o gasto energético e regular a ação da leptina (SCHWARTZ, 2000).

A leptina, hormônio liberado pelo tecido adiposo, possui propriedades anorexígenas, ou seja, induz a saciedade. A concentração de leptina é diretamente proporcional à massa de tecido adiposo e age sobre o hipotálamo como um sinal da quantidade de energia armazenada na forma de gordura (ARA et al., 2006). Portanto, o aumento de gordura resulta em maiores níveis de leptina, o que por sua vez, induz a saciedade. Por outro lado, a diminuição da gordura corpórea resulta em proporcional diminuição dos níveis circulantes de leptina (HOUMARD et al., 2000; THONG et al., 2000).

A grelina, hormônio entérico recentemente identificado, é um dos peptídeos gastrintestinais envolvidos no consumo alimentar. Níveis circulantes de grelina aumentam antes das refeições e diminuem logo após as refeições, em indivíduos eutróficos (MARCHESINI et al., 2004), porém, apesar de poucos estudos terem sido realizados, isto não parece acontecer em indivíduos obesos (LE ROUX et al., 2005). A distensão gástrica *per se* não causa redução dos níveis plasmáticos de grelina (TSCHOP; SMILEY; HEIMAN, 2000; WILLIAMS et al., 2003; GIL-CAMPOS et al., 2006); entretanto, a ingestão de fibra alimentar parece causar esta redução (NEDVIDKOVA et al., 2003).

A regulação de grelina e seus efeitos fisiológicos parecem ser contrários aos da leptina (WILLIAMS; MOBARHAN, 2003). Entretanto, são moléculas complementares com o mesmo sistema regulatório para o balanço energético (TSCHOP et al., 2001).

Uma das formas de controle de peso é a redução da energia ingerida, porém alimentos isoenergéticos podem produzir efeitos fisiológicos distintos, que se refletem em variados efeitos na saciedade, na termogênese e na estocagem de carboidratos e lipídios (HOLT et al., 1995). Dessa forma, um alimento que produza maior saciedade, ou seja, eleve o tempo em que um indivíduo sentirá fome entre duas refeições, pode ser utilizado como fator de controle de peso corporal. Há evidências, também, que o aumento de consumo de fibra alimentar (FA) é um fator favorável à perda/controle de peso (WHO/FAO, 2003). A FA tem sido apontada como fator de saciação e saciedade, pois pode promover a distensão gástrica, redução do tempo de trânsito gastrintestinal e modulação de absorção de nutrientes. Paralelamente, com a reduzida resposta glicêmica proporcionada pela FA, ocorre a liberação

de peptídeos gastrintestinais que atuam sobre a saciedade (MATTES et al., 2005). A adição de uma fonte de FA a um produto tradicional pode oferecer ao consumidor alternativas de alimento saudável, ou seja, um alimento que produza maior saciedade e reduza a ingestão energética subsequente (ARCHER et al., 2004; CANI et al., 2006).

Resposta glicêmica

A hiperglicemia está relacionada com a resistência à insulina uma vez que a primeira aumenta demasiadamente a produção de insulina nas células β . A secreção elevada e constante deste hormônio diminui a capacidade de resposta das células β tornando-as menos sensíveis a maiores aumentos de glicose sangüínea. O pâncreas detecta alta glicemia constantemente, produzindo liberação de insulina na mesma frequência (GUYTON; HALL, 1998). Este mecanismo pode deixar de ser eficiente uma vez que o número de receptores de insulina é limitado e, sob novo aumento de glicemia, sua capacidade pode estar esgotada. Estes efeitos se acentuam com o tempo podendo levar a resistência à insulina e ao diabetes tipo 2. Este, geralmente se desenvolve após os 40 anos de idade (CHACRA; DIB, 2003). Para resposta glicêmica, a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM, 2005) (CARVALHO, 2005) recomenda como meta para o tratamento da SM, os seguintes níveis de glicemia: jejum < 110 mg/ dL; pós-prandial (2 h) < 140 mg/ dL.

Alguns carboidratos como a FA tem mostrado eficácia no controle dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios e da saciedade, pois proporcionam um aumento moderado de glicemia e insulinemia, e permitem prolongada entrada de glicose na corrente sangüínea. Os carboidratos podem ser classificados em carboidratos disponíveis, que são rapidamente digeridos, e carboidratos não disponíveis como fibra alimentar, carboidratos análogos (amido resistente, maltodextrina resistente, frutanos, transgalactooligossacarídeos, polidextrose) e compostos associados (BRAND-MILLER, 2003; DANONE VITAPOLE/FAO, 2001). O índice glicêmico (IG) e a carga glicêmica (CG) são marcadores utilizados na avaliação dos efeitos nutricionais proporcionados por esses tipos de carboidratos. O IG foi definido

como o aumento da área abaixo da curva glicêmica produzido pela ingestão de um alimento teste (50 g de carboidratos “disponíveis”) em relação à mesma quantidade de carboidrato do alimento referência (pão branco ou glicose), sendo expresso em porcentagem (JENKINS et al., 1981).

O conceito de carga glicêmica (CG) foi introduzido, em 1997, por pesquisadores da Harvard School (SALMERON et al., 1997). Esse índice tem por finalidade relacionar a resposta glicêmica da dieta como um todo, e não só a quantidade de carboidrato ingerida, com o risco de aparecimento das DCNT. A CG foi definida como o produto do IG do alimento e da quantidade de carboidrato disponível presente na porção consumida $[CG = (IG \times \text{teor de carboidrato disponível na porção}) / 100]$. Através da soma da CG individual dos alimentos pode-se calcular a CG total da dieta. O valor de CG da dieta, quando ajustado ao total de energia ingerida, representa uma combinação da quantidade com a qualidade dos carboidratos da dieta ingerida (MENEZES; LAJOLO, 2006). Considerando a glicose como controle, os alimentos que apresentam $CG \leq 10$ são considerados de baixa CG e são constituídos de carboidratos lentamente digeridos. Já os alimentos com $CG \geq 20$ são considerados de alta CG e são constituídos de carboidratos rapidamente digeridos (Harvard School of Public Health, 2010).

A dieta com baixo IG e baixa CG tem efeitos benéficos sobre vários aspectos metabólicos e fisiológicos envolvidos nas DCNT, como diabetes e doenças cardiovasculares, e grande parte destes efeitos pode ser extrapolado para as dietas com carboidratos não disponíveis, uma vez que os alimentos de baixo IG contêm elevado conteúdo desta fração e estão associados à redução do risco para diversas DCNT. Essa proteção é comparável com a observada em estudos envolvendo elevado consumo de grãos integrais e fibra alimentar, cujos resultados dão suporte à hipótese de que a hiperglicemia pós-prandial é um mecanismo universal para progressão dessas doenças (BARCLAY et al., 2008). Além disso, os carboidratos não disponíveis são fermentados no intestino grosso, resultando na produção de vários compostos, sendo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em maior proporção. Esses compostos, além de fornecerem certa quantidade de energia, estão envolvidos na redução do risco de câncer e dos níveis séricos de colesterol.

Howlett e Ashwell (2008) avaliando informações de um *workshop* sobre resposta glicêmica afirmam que a carga glicêmica está mais relacionada com saúde que o IG, e que embora o impacto sobre indivíduos saudáveis ainda não esteja claro, dietas com baixo IG e CG são benéficas para pessoas com metabolismo de glicose comprometido.

Com os estudos disponíveis até o momento, a associação de IG com saciedade e controle de peso ainda é controverso, pois muitos fatores podem interferir, como a presença da FA, tipo de carboidrato, volume da refeição e quantidade de proteína (WOLEVER et al., 2009). Assim, são necessários mais estudos referentes à saciedade, com dietas rigorosamente controladas, onde a única variável seja a resposta glicêmica. Segundo Ford e Frost (2010), existem evidências convincentes, em estudos de curta duração, de que o IG de uma refeição está relacionado à diminuição de apetite na refeição seguinte. Porém, os resultados de estudos de longa e média duração não são conclusivos.

Bornet et al. (2007) revisaram uma série de estudos a fim de verificar a associação entre resposta glicêmica, saciedade e controle de peso, e observaram que, embora alguns sejam inconclusivos, em 16 dos 26 avaliados foi possível associar alimentos produtores de baixo IG com maior saciedade em ensaios de curta duração.

Carboidratos não disponíveis e fermentação colônica

Do ponto de vista químico, os carboidratos não disponíveis podem ser representados pela fração não disponível (FND), que é composta pelos principais substratos de fermentação para a microbiota colônica, como é o caso da fibra alimentar, amido resistente, frutanos, proteína resistente e outros compostos associados, tais como os polifenóis (SAURA-CALIXTO, 2006).

Os possíveis efeitos dos carboidratos não disponíveis, assim como da FND, sobre o metabolismo da glicose podem estar relacionados com diferentes eventos que ocorrem no trato gastrointestinal. Entre esses efeitos, pode-se mencionar a redução da motilidade intestinal e/ou absorção dos carboidratos devido às propriedades viscosas dos componentes da fibra alimentar, ou a redução da velocidade de digestão e/ou absorção dos carboidratos decorrente da encapsulação do substrato pela parede celular. Por outro lado, os ácidos

graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos durante a fermentação colônica dos carboidratos não digeridos estão relacionados com efeitos sistêmicos no metabolismo da glicose e dos lipídios (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991). Dessa forma, tem sido mencionado que a fermentação dos carboidratos não disponíveis leva a uma diminuição dos níveis de glicemia de jejum e aumenta a tolerância à glicose pela supressão dos níveis de ácidos graxos não esterificados e da produção de glicose hepática (THORBURN; MUIR; PROIETTO, 1993). De maneira geral, alimentos com elevado teor de FND, além de produzirem moderada elevação da resposta glicêmica, são constituídos por substratos que podem ser fermentados pela microbiota intestinal, e gerar produtos que estão envolvidos em uma série de efeitos fisiológicos positivos.

Também na FND, uma série de compostos bioativos (vitaminas e compostos polifenólicos) estão associados. Esses compostos podem ser fermentados no intestino grosso e degradados ou eliminados, favorecendo a excreção de lipídios, com efeitos positivos no trato intestinal (proteção da mucosa contra estresse oxidativo) e metabolismo lipídico (eliminação de colesterol e outros ácidos graxos), além de apresentarem capacidade antioxidante (SAURA-CALIXTO, 2006). Alimentos como frutas e hortaliças têm sido associados à redução de risco para o desenvolvimento de DCNT não só em função dos polissacarídeos presentes, mas também pela presença de compostos bioativos como as vitaminas C, A e E, e os compostos fenólicos como os flavonóides, que apresentam capacidade antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; SEIFRIED et al., 2007).

Fermentação colônica - os componentes da dieta que não são digeridos por enzimas intestinais e nem absorvidos no intestino delgado chegam ao intestino grosso, onde podem ser degradados pelas bactérias ali presentes. Este processo denomina-se fermentação colônica e consiste na degradação anaeróbia de substratos, principalmente carboidratos, pela microbiota intestinal (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). São substratos utilizados pelas bactérias colônicas humanas na fermentação, a fração não disponível (FND) da

dieta, além de uma porção considerável de mucina, células epiteliais, enzimas e outros produtos de origem endógena (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991).

O microssistema da biota intestinal é composto de microrganismos benéficos, patogênicos e neutros. A microbiota intestinal é formada por 90% de microrganismos anaeróbicos, bacteróides e bifidobactérias. As bifidobactérias produzem vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido nicotínico, ácido fólico e biotina. Além disso, têm efeito protetor sobre o fígado, ao evitar o predomínio de organismos patogênicos produtores de substâncias tóxicas. Com isso, diminui o trabalho do fígado de purificar as substâncias absorvidas pelo intestino delgado. No intestino grosso, as bifidobactérias fermentam os carboidratos que não foram digeridos no intestino delgado, formando gases (hidrogênio, dióxido de carbono, oxigênio, amônia, metano) e produzindo ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (GUYTON; HALL, 1998; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; TOPPING; CLIFTON, 2001).

Os principais fatores determinantes da fermentação são a quantidade, a estrutura físico-química e o grau de fermentabilidade dos substratos; o número de bactérias presentes no cólon e o tempo de contato entre a microbiota e os substratos fermentativos (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003).

A fermentação colônica resulta em um aumento da massa bacteriana e, principalmente, na produção de AGCC (acetato, propionato e butirato), gases (hidrogênio, metano e dióxido de carbono) e ATP (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). Outros produtos também são gerados com a fermentação, tais como lactato, piruvato, etanol e succinato, e estas substâncias são formadas para manter o balanço das reações de óxido-redução durante o processo fermentativo. Além disso, estes produtos atuam como metabólitos intermediários, pois são metabolizadas a AGCC por outras espécies (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; GIBSON et al., 1999; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; WONG et al., 2006).

A fermentação colônica possui importantes repercussões sobre a saúde do hospedeiro. Alguns metabólitos bacterianos são substâncias tóxicas para o organismo (amoníaco, aminas e nitrosaminas carcinógenas); outros podem

reduzir a biodisponibilidade de vitaminas e minerais. Entretanto, o aumento da massa bacteriana e dos AGCC (acetato, propionato e butirato) trazem benefícios para o organismo e se relacionam com a etiologia e menor risco de diferentes DCNT, como o câncer de cólon e doenças cardiovasculares (VELÁZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1996).

Uma vez que a quantificação da fermentação colônica *in vivo* em humanos é difícil, diversos modelos em animais e *in vitro* têm sido utilizados (TOPPING; ILLMAN; TAYLOR, 1985; VAREL, 1987; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; TOPPING; CLIFTON, 2001).

A fermentação *in vitro* é um modelo amplamente utilizado para prever o comportamento dos carboidratos não disponíveis e os possíveis efeitos fisiológicos que os produtos de fermentação desempenham no organismo (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). A fermentação *in vitro* envolve basicamente incubação de FND de carboidratos com inóculo fecal ou cecal e pode prover valiosas informações, desde que diversas precauções sejam tomadas para diminuir a variabilidade dos doadores do inóculo (TOPPING; CLIFTON, 2001). Outros fatores, como meio tamponante, tamanho e origem do inóculo, tempo de fermentação e tipo de substrato, também devem ser considerados quando da comparação de resultados (WYATT; HORN, 1988; BARRY et al., 1995).

Os carboidratos não disponíveis de elevada fermentabilidade podem ser utilizados na produção de alimentos funcionais que visem reduzido aumento da resposta glicêmica pós-prandial (SARIS et al., 1998; FOLKS; FULLER; GIBSON, 1999; WHO/FAO, 2003; GOVINDJI, 2006).

Amido resistente e farinha de banana verde (FBV)

O amido resistente (AR) é definido como amido e produtos da hidrólise do amido que não são absorvidos no intestino delgado (ASP et al., 1994). O AR tem sido identificado como o principal substrato para a microbiota intestinal humana e parece ter uma participação no organismo humano semelhante à da fibra alimentar.

Embora a atual ingestão de amido resistente na Europa e América Latina seja reduzida (ao redor de 3 - 6 g/ dia) se comparada ao consumo em

outros continentes como a Ásia (8 - 19 g/ dia) (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MENEZES; GIUNTINI; LAJOLO, 2001), existe considerável potencial para o aumento da ingestão deste componente através de alimentos e produtos alimentícios com elevado teor de amido resistente (MENEZES; LAJOLO, 2000; BUTTRISS; STOKES, 2008).

Segundo Champ et al. (2003), o termo “amido resistente” engloba basicamente quatros tipos de amido: amido fisiologicamente inacessível (AR tipo 1), encontrado em grãos e sementes parcialmente triturados, devido à presença de paredes celulares rígidas; grânulos de amido resistente à hidrólise enzimática (AR tipo 2), presente na batata crua e banana verde; amido retrogradado (AR tipo 3), ou seja, com cadeias de amido recristalinizadas após gelatinização sem secagem posterior imediata, formado em alimentos processados (pão e *corn flakes*) e em alimentos cozidos e resfriados (batata cozida) (CUMMINGS; ENGLYST, 1995; BJÖRCK, 1996; ROSIN; LAJOLO; MENEZES, 2002); e amido quimicamente modificado (AR tipo 4). Dependendo da quantidade de cada um destes tipos de AR no alimento, os carboidratos serão utilizados de forma diferenciada.

Embora o AR seja analiticamente quantificado na fração insolúvel, este composto se comporta fisiologicamente como fibra solúvel (HARALAMPU, 2000). Como os frutanos, o AR é fermentado de forma significativa pela microbiota colônica, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, os quais exercem inúmeros efeitos benéficos sobre o metabolismo e manutenção da saúde intestinal (BUTTRISS; STOKES, 2008; BJÖRCK, 1996). A fermentação *in vitro* do AR tem mostrado que este causa aumento na proporção de butirato em relação aos outros AGCC (ENGLYST; MACFARLANE, 1986; MACFARLANE; ENGLYST, 1986; WEAVER et al., 1992), diminuição da excreção fecal de ácidos biliares secundários (VAN MUNSTER; NAGENGAST, 1993) e efeito protetor com relação ao câncer de cólon (FÄSSLER et al., 2007).

O amido resistente tipo 2, presente na banana verde, apresenta uma reduzida susceptibilidade à alfa-amilase tanto *in vitro* quanto *in vivo* em ratos e humanos (ASP et al., 1994; FAISANT et al., 1995). Faisant et al. (1995) verificaram, por técnica de intubação em indivíduos saudáveis, que o amido da banana verde não é digerido no intestino delgado. Resultados semelhantes

foram observados por Englyst et al. (1996), empregando técnicas *in vitro* e *in vivo* com indivíduos ileostomizados.

A velocidade de fermentação do AR é variável de acordo com o tipo de AR (1, 2, 3 ou 4). Alguns tipos desaparecem em um total de 24h de fermentação *in vitro*. Outros são mais resistentes à fermentação pela microbiota não chegando à fermentação total em até 24h (MARTIN; DUMON; CHAMP, 1998). Topping et al. (1997) sugerem que o AR tipo 2 é mais rapidamente fermentado quando comparado com outros tipos de AR.

O Brasil responde por cerca de 10% da produção mundial de banana e é o segundo produtor mundial após a Índia, porém tem uma participação de apenas 0,5% no comércio internacional da fruta (EMBRAPA, 2005), devido, principalmente, à defasagem nas normas de qualidade e a falta de compatibilidade com os padrões básicos vigentes nos mercados compradores da fruta *in natura*. O setor de bananicultura gera hoje mais de 500 mil empregos diretos no país. Muito apreciada no Brasil e no mundo, a banana é a quarta cultura agrícola mais importante do planeta, atrás apenas do arroz, do trigo e do milho. Além disso, tem ainda enorme importância social, pois é uma fonte barata de energia, vitaminas e minerais.

A produção brasileira de banana é de 8 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2005), porém cerca de 60% da colheita nacional se perde antes de chegar ao consumidor final, o que representa um significativo desperdício. Por outro lado, a banana quando ainda verde é mais facilmente transportada e seu armazenamento pode ser feito por mais tempo do que o da banana já madura. Por estes motivos, a banana verde vem sendo considerada um produto ideal para ser industrializado (ZHANG et al. 2005; AURORE; PARFAI; FAHRASMANE, 2009), além de apresentar elevado teor de amido resistente (AR) (OVANDO-MARTINEZ et al., 2009; TRIBESS et al. 2009; MENEZES et al., 2010b) e reduzida concentração de açúcares solúveis (CORDENUNSI et al., 2000).

A aplicação de AR na elaboração de produtos é de interesse tanto para a indústria de alimentos como para o consumidor (LAJOLO et al., 2001; AURORE; PARFAI; FAHRASMANE, 2009; OVANDO-MARTINEZ et al., 2009), pois o AR pode ser utilizado como fonte de fibra alimentar, uma vez que

apresenta efeitos fisiológicos semelhantes aos da fibra e, devido ao seu reduzido conteúdo energético, pode ser empregado como complemento na formulação de produtos com reduzido teor de lipídios e/ou açúcares. O AR beneficia o funcionamento do trato gastrointestinal, a microbiota colônica, os níveis de colesterol plasmático e auxilia no controle de diabetes (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010).

Além de seus efeitos fisiológicos benéficos à saúde, o AR apresenta baixo impacto sobre as propriedades sensoriais dos alimentos se comparado com fontes tradicionais de FA, tais como grãos integrais ou frutas. Dentre suas propriedades físicoquímicas, estão sua capacidade de formar gel e se ligar à água, e viscosidade, as quais o tornam um ingrediente funcional útil em uma variedade de alimentos (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010).

Visando utilizar a banana verde como ingrediente funcional, o Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular, da FCF/USP vêm realizando inúmeros estudos com diferentes tipos de farinhas de banana verde (CARDENETTE, 2006; DAN, 2007; MENEZES et al., 2010a) e em especial, com a farinha de banana verde (FBV) desenvolvida pelo grupo (TRIBESS et al., 2009) (Patente (RPI- 1941), de acordo com Menezes et al., 2008).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial *in vivo* e *in vitro* da farinha de banana verde (FBV) como ingrediente funcional.

Específicos

- Avaliar o perfil de carboidratos não disponíveis da FBV, rações e refeições adicionadas de FBV;
- Avaliar a capacidade antioxidante da FBV e refeições;
- Avaliar o perfil de fermentação *in vitro* da fração não disponível da FBV, rações e refeições;
- Avaliar, em ensaios de curta e média duração com humanos, o efeito da FBV sobre a saciedade, hormônios gastrintestinais, parâmetros relacionados à tolerância à glicose, funcionamento intestinal e status antioxidante;
- Avaliar o efeito trófico no intestino grosso de ratos adultos e parâmetros relacionados à tolerância à glicose, decorrentes da fermentação de carboidratos não disponíveis da FBV, em ensaio de média duração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Farinha de banana verde (FBV)

Para elaboração da farinha de banana verde foi utilizada banana, *Musa acuminata* (grupo AAA), subgrupo Cavendish (chamada de Nanicão no Brasil), estágio de maturação I (DITCHFIELD, 2004; TRIBESS et al., 2009), não submetida à câmara de maturação, proveniente do Vale do Ribeira e comercializada no CEAGESP/SP.

A produção da FBV, em escala semi-industrial, foi realizada nas dependências do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, Brasil, de acordo com o processo proposto por Tribess et al., 2009. As bananas (verdes) foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio (1%) em tanques industriais, descascadas manualmente e imediatamente imersas em solução com ácido cítrico (0,1%). A polpa de banana foi fatiada (4 mm de espessura) e as fatias foram novamente imersas na mesma solução. As fatias foram secas a 55 °C, velocidade do ar de 1,0 m/ s, por 6 h. (Secador Proctor and Schwartz, model K11556, Philadelphia, USA) e trituradas em moinho (MA 680, Marconi, Piracicaba, Brazil) em partículas < 0,250 mm. As amostras de farinha foram empacotadas assepticamente em sacos plásticos aluminizados e estocadas em temperatura ambiente.

Todo o processo de produção de FBV foi desenvolvido de forma conjunta pelo Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA), Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, sob coordenação da Profa. Dra. Carmen Tadini, e Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular, FCF/USP, sob a Coordenação da Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes (Patente (RPI - 1941), (MENEZES et al., 2008).

Foram preparados três lotes de farinha, conforme a necessidade para realização dos ensaios clínicos (armazenamento < 3 meses). Para cada lote (total de 3 lotes), uma porção de FBV foi triturada em partículas menores de 0,250 mm e armazenadas a 15 °C até a realização das análises (resultando em n = 3 para FBV).

3.1.1 Análises químicas realizadas na FBV

3.1.1.1 Composição centesimal

As análises foram realizadas em triplicata, com métodos da AOAC (HORWITZ; LATIMER, 2006) e os resultados expressos em g por 100 g de amostra em base seca e base integral. A determinação de umidade das amostras foi feita em estufa a vácuo 60 °C (método 925.45); de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC 960.52); de lipídios, por extração com Soxhlet (AOAC 2003.06) e de cinzas, em mufla a 550 °C (AOAC 923.03).

3.1.1.2 Amido resistente (AR)

O amido resistente foi quantificado baseado no método AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002), com modificações.

Triplicatas de 100 mg de amostra foram analisadas em tubos de plástico (50 mL) graduados, de fundo cônico, com tampa. As amostras foram pré-lavadas duas vezes com 8 mL de etanol 80% (v/v), centrifugadas (1000 g) por 10 min. Aos resíduos foram adicionados 4 mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1 M (pH = 6) contendo CaCl₂ 1 mM, azida sódica 0,02%, amiloglicosidase (24 U/mL, Sigma A-7255), α -amilase (300 U/mL, sigma A-3176) e pepsina (500 U/mL, Sigma P-7012). Os tubos contendo os resíduos em solução foram agitados, tampados e incubados a 37 °C por 16 h sob agitação. Após a incubação, foram adicionados 8 mL de etanol 99% e os tubos foram agitados e centrifugados (1000 g) por 10 min, o sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido por mais duas vezes com 4 mL de etanol 50%.

Com os tubos contendo resíduos parcialmente submersos em banho de gelo, com barras de agitação e sob agitação magnética, foram adicionados 3 mL de KOH 2 M e deixados sob agitação. Após 20 min, foram adicionados 10 mL de tampão NaAc/HAc 1,2 M (pH = 3,8), as barras de agitação foram removidas e a agitação magnética cessada. O pH foi rapidamente verificado e, se necessário, ajustado com solução de NaOH ou HCl para pH = 4,75. Imediatamente foram adicionados 0,1 mL de amiloglicosidase (3200 U/mL de

tampão NaAc/HAc, pH = 4,75), os tubos foram agitados, tampados e incubados em banho sob agitação a 50 °C por 30 min.

Após a incubação, os tubos tiveram o volume de solução completado a 20 mL com água Milli-Q e então foram centrifugados (1000 g) por 10 min. No sobrenadante foi determinado o teor de glicose livre pelo método enzimático (glicoseoxidase/ peroxidase/ABTS) (BERGMEYER; BERNET, 1974). Uma amostra de feijão carioca cozida foi utilizada como material de referência (*in house*). O total de amido resistente (AR) foi calculado pela multiplicação da glicose livre por 0,9. A determinação foi feita em triplicata, e os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra na base integral.

3.1.1.3 Amido total (AT) e amido disponível (AD)

Para quantificar o AT, foi utilizado o método de Cordenunsi e Lajolo (1995). Cerca de 1 g de amostra foi homogeneizada com NaOH 0,5 M e, logo em seguida, neutralizada com 0,5 M de ácido acético e diluída a 100 mL. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e lavada duas vezes com etanol (absoluto e 80%, nesta ordem) com o intuito de precipitar o amido (os sobrenadantes foram desprezados). Todo o etanol foi evaporado e o precipitado seco foi incubado em banho-maria a 37 °C com AMG (4 U/mL, Sigma A-7255), por 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 0,1 mL de ácido perclórico 0,6 M para interromper a reação. Alíquotas de 0,1 mL de amostras foram incubadas com 1,5 mL de GOD/POD-ABTS por 15 min em banho-maria a 37 °C e, posteriormente, a absorbância foi determinada a 450 nm. O amido (Sigma S-1514) foi utilizado como material de referência padrão. O total de amido foi calculado pela multiplicação da glicose livre por 0,9. A determinação foi feita em triplicata, e os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra na base integral.

A concentração de amido disponível foi obtida pela diferença entre amido total e resistente ($AD = AT - AR$).

3.1.1.4 Fibra alimentar total (FAT)

Nas amostras liofilizadas, o conteúdo de fibra alimentar total foi determinado pelo método enzimico-gravimétrico AOAC 991.43 (LEE; PROSKY; VRIES, 1992) com modificações propostas por McCleary e Rossiter (2004). A modificação incluiu a adição de 200 µL de frutanasase (Megazyme® 2200U/ mL) para excluir os frutanos da FA e pré-tratamento das amostras com DMSO em banho a 100 °C por 30 min para solubilizar o AR, eliminando o AR da FA. Estes procedimentos evitam a sobreposição de valores de frutanos e amido resistente na determinação de FA. A determinação foi feita em quadruplicata, e os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra na base integral.

3.1.1.5 Açúcares solúveis (AS)

Os açúcares solúveis foram extraídos com etanol (80%) a 80 °C por três vezes. Os sobrenadantes foram combinados e o etanol evaporado sob vácuo. Os resíduos foram reconstituídos com água, filtrados em membrana (< 0,22 µm) e analisados por HPLC-PAD (Dionex DX 500, Sunnyvale, CA, USA), utilizando uma coluna Carbowax PA1 (250 x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi com tampão 18 mM NaOH e a velocidade de fluxo foi mantida constante (1,0 mL/ min). As injeções (25 µL) foram feitas usando injetor automático AS 500. Glicose, frutose, galactose e sacarose (Sigma, Chemical CO, Saint Louis, MO, USA) foram utilizadas como material de referência. A determinação foi feita em triplicata, e os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra na base integral (CORDENUNSI; SHIGA; LAJOLO, 2008).

3.1.1.6 Frutanos

Os frutanos totais foram extraídos a partir de 1,0 g de amostra por duas vezes com água destilada (10 mL) a 80 °C, por 15 min; posteriormente, a solução foi centrifugada (3.000 g) a 15 °C, por 15 min. Os sobrenadantes foram combinados e seu volume completado com água (50 ou 100 mL) em

temperatura ambiente. Os frutanos foram determinados pelo método AOAC 999.03 (McCLEARY; MURPHY; MUGFORD, 2002), utilizando *Fructan kit* (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Ireland). A determinação foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra na base integral.

3.1.1.7 Fração não disponível (FND) solúvel e insolúvel

A fração não disponível (FND) foi quantificada de acordo com o método proposto por Saura-Calixto et al. (2000) e Serrano; Goñi; Saura-Calixto (2005), com modificações. Em tubos de ensaio de 30 mL, previamente secos e tarados, foram pesados 300 mg de amostra, em triplicatas. Foram adicionados 8 mL de tampão KCl/HCl 0,1 M (pH = 1,5) para homogeneização das amostras em homogeneizador (Brinkmanm, Polytron); em seguida foram adicionados 0,2 mL de pepsina (P-7012, Sigma, St. Louis, Mo, USA) (65000 U/ mL tampão KCl/HCl 0,1 M, pH = 1,5). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 40 °C por 60 min.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 4 M (aproximadamente 150 µL). Em seguida, foram adicionados 8 mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1 M (pH = 7,0) contendo 5 mg de pancreatina (Sigma P-1750), 14 mg de lipase (Sigma L-3126), 35 mg de extrato de bile de porco (Sigma B-8631) e 120 mg de α -amilase (Sigma A-3176). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 37 °C por 16 h.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas (1500 g) por 15 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de plástico de 50 mL com tampa. Os resíduos foram lavados com 10 mL de água Milli-Q e centrifugados novamente, sendo este ciclo repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e os resíduos reservados.

Fração não disponível insolúvel – os resíduos foram colocados em estufa a 105 °C, por 18 h e quantificados gravimetricamente.

Fração não disponível solúvel – o pH dos sobrenadantes foi ajustado para 4,75 com HCl 1 M. Em seguida foi adicionado 1 mL de amiloglicosidase

(12 mg/ mL tampão NaAc/HAc 1,2 M, pH = 4,75); a seguir os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 60 °C por 45 min. Após a incubação, as soluções foram dialisadas em membranas de 12000-14000 MWCO, a 37 °C por 48 h, em água, sob agitação magnética. Os dialisados foram então transferidos para frascos de vidro de boca larga de 50 mL previamente secos e tarados, e secos em estufa a 105 °C por 36 h. Os teores de FDN solúvel foram determinados gravimetricamente.

As determinações foram feitas em triplicata, e os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra na base integral.

Fração não disponível (FND) - foi calculada pela soma de FND insolúvel e FND solúvel.

3.1.1.8 Isolamento de fração não disponível (FND)

A fração não disponível foi isolada baseando-se na quantificação da FND descrita no item anterior (item 3.1.1.7), com modificações. A quantidade de amostra inicial a ser isolada foi equivalente à necessária para obtenção de 0,8 g de FND e as soluções e enzimas adicionadas foram aumentadas proporcionalmente. A FND foi obtida combinando-se os resíduos finais de FND insolúvel e os dialisados com FND solúvel, antes de serem secos em estufa. A secagem foi feita a vácuo em speedvac. A FND foi então congelada a - 20 °C para posterior fermentação.

3.1.1.9 Fermentação *in vitro*

Para avaliar o processo de fermentação *in vitro*, o método foi baseado nas propostas de Cambrodón e Martín-Carrón (2001) e Serrano; Goñi; Saura-Calixto (2005), com modificações (CARDENETTE, 2006). Todo o processo de fermentação *in vitro* foi realizado com a fração não disponível (FND) isolada das amostras.

Foram preparadas seis réplicas de 100 mg de FND de cada amostra em frascos de vidro de 50 mL secos e tarados. Uma triplicata das amostras foi preparada para ser indicativa de 0 h de fermentação e a outra triplicata para

indicar 24 h de fermentação. Brancos de fermentação (frascos sem amostra), padrão (Lactulose - Sigma L-7877) e de pectina de maçã (Sigma P-2157) também foram incluídos. As FND contidas nos frascos de fermentação foram hidratadas com 8 mL de meio de fermentação (MF) ativado e anaeróbio. O MF foi preparado com triptona, água Milli-Q, solução micromineral, tampão bicarbonato, solução macromineral e solução de resazurina (indicador de oxirredução anaeróbio). Os frascos foram tampados com tampas de borracha, agulhas de entrada e saída de gás, com válvulas de três vias nas pontas, foram pinçadas nas tampas e CO₂ foi borbulhado por 1 minuto em cada frasco para certificação de que o meio estava anaeróbio. As válvulas foram fechadas e os frascos armazenados a 4 °C por 16 h.

No dia seguinte, os frascos de fermentação foram retirados da geladeira e reservados até que estivessem em temperatura ambiente. Foi preparado um inóculo com o conteúdo cecal de ratos *Wistar* machos, com aproximadamente 300 g de peso corpóreo, diluído (100 g/ L) em MF ativado e anaeróbio. O inóculo foi misturado em um homogeneizador de amostras Tipo *Stomacher* (Logen Scientific) e filtrado (< 1 mm) antes de sua utilização. Foram adicionados 2,5 mL de inóculo em cada frasco de fermentação e novamente foi borbulhado CO₂ por aproximadamente 1 minuto em cada frasco. Os frascos 24h tiveram as agulhas removidas das tampas, que foram então revestidos com Parafilm®, para evitar vazamentos de gases formados, e foram incubados a 37 °C sob leve agitação por 24 h.

Frascos 0 h - os frascos foram destampados e adicionados 5 mL de água Milli-Q, o pH foi verificado e em seguida foram adicionados de 3 mL de água, para lavar o eletrodo, e 3 mL de NaOH 1 M. Os frascos foram então centrifugados (1500 g) a 4 °C, por 10 min, e os sobrenadantes foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL. Os resíduos foram colocados em estufa a 105 °C para quantificação do resíduo não fermentado (RNF) por gravimetria. Os sobrenadantes foram completados a 25 mL com água Milli-Q e congelados para análise de AGCC.

Frascos 24h - após 24 h, os frascos foram retirados da incubação e resfriados até temperatura ambiente. A pressão interna de cada frasco foi medida com manômetro (Ashcroft, Stratford, CO, USA) com detecção de 0 a 15

psi. Os frascos foram então destampados e o mesmo procedimento efetuado com os frascos 0h foi realizado.

Os parâmetros determinados na fermentação *in vitro* foram: pH; pressão interna dos frascos; resíduo não-fermentado (RNF) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

3.1.1.10 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC produzidos na fermentação *in vitro* foram quantificados em cromatógrafo a gás (CG) HP 6890 Plus (Santa Clara, CA, USA) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar CP7747 de sílica fundida (WCTO), Varian (Palo Alto, CA, USA). A temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C e a pressão foi mantida constante (42,8 kPa). A temperatura inicial da corrida foi de 110 °C, mantida durante 2 min, com rampa de 2 °C/ min até atingir a temperatura de 140 °C e de 40 °C/min até a temperatura final de 200 °C (tempo de corrida de 25 min). As amostras foram injetadas manualmente em volume de 1 µL, com *split* 1:10. A curva padrão foi obtida com soluções de AGCC (Volatile Acid Standard Mix, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em concentrações de 0,9 a 6,0 mM e ácido 2-metil-valérico 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como padrão interno (PI). Os parâmetros utilizados nesta análise foram adaptados de acordo com as indicações de uso da coluna.

3.1.1.11 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de aproximadamente 50 mg de farinha de banana verde foram montadas em *stubs* de alumínio com fita de carbono dupla face e metalizada com platina (com 10 nm de espessura) em equipamento Bal-tec MED-020 Coating System. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 600 FEG, FEI, Eindhoven, Netherlands). As imagens obtidas são de elétrons secundários operando em modo de 10, 5 e 2 kV.

3.1.1.12 Capacidade antioxidante *in vitro* (três diferentes métodos)

Extração para determinação de fenólicos totais e da redução do radical estável DPPH - O procedimento foi realizado em triplicata homogeneizando-se cerca de 1 g de amostra em 20 mL de metanol/ água na proporção de 70: 30. A extração foi realizada utilizando Ultra-Turrax (Polytron®- Kinematica GnbH, Kriens-Luzern), por 1 min a 10.000 g em banho de gelo. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar. A extração para determinação da capacidade antioxidante total pelo método do ORAC está descrita abaixo.

a) Fenólicos totais por redução do reagente de Folin-Ciocalteu - A capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu foi determinada de acordo com o método de Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventós (1999), com modificações. Alíquotas de 0,25 mL dos extratos metanólicos foram adicionadas de 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os tubos foram levados para o banho-maria a 37 °C, por 30 min para desenvolver a coloração. Solução de catequina (0,2 mg/mL metanol) foi utilizada como padrão. As leituras de absorbância foram realizadas em 750 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, USA). Os resultados foram expressos como mg de catequina por 100 g de amostra base integral.

b) Sequestro de radicais livres do DPPH - A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH (1,1-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, segundo descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) com algumas modificações (Duarte-Almeida et al., 2006). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 200 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox (6-hidróxi-2, 5, 7,

8-tetrametil-2-ácido carboxílico, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 min, no escuro. As leituras das absorbâncias foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). A absorbância das amostras (Am) correlacionada à absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte fórmula: $\% \text{ SRL} = ((Ac - Am) \times 100) \times Ac^{-1}$.

A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) nas concentrações de 20 a 80 μM , e os resultados foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/ 100 g de amostra base integral.

c) Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) - A extração foi realizada com 1 g da amostra em 10 mL de metanol (70%), por 2 h sob agitação a 4 °C. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi recuperado (fração hidrofílica). O resíduo foi seco e extraído com 10 mL de acetato de etila e o sobrenadante foi recuperado e seco sob nitrogênio líquido. O extrato foi dissolvido com 1 mL de acetona e 3 mL de β -ciclodextrina metilada e randomizada (7%), preparada em acetona:água (1: 1) (fração lipofílica) (PRIOR et al., 2003). A capacidade antioxidante das duas frações foi determinada pelo método de ORAC de acordo com Dávalos; Gómez-Cardoves e Bartolome (2004), adaptado em cubas individuais de quartzo. Resumidamente, 200 μL dos extratos foram adicionados de 1200 μL de solução de fluoresceína (70 nM) (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e incubados a 37 °C, por 15 min, antes da adição de 600 μL de solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH, Wako Chemicals Inc., Richmond, USA) (24 mM). A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando espectrofotômetro (Hitachi F-3010, Tóquio, Japan) (485 nm excitação e 525 nm emissão), durante 80 min em intervalos de 10 min. Os resultados foram calculados usando as diferenças de área sob a curva de decaimento da fluorescência entre o controle (tampão fosfato x amostra) e a amostra. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/ 100 g de amostra base integral.

3.2 Animais

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar Hannover* obtidos a partir de colônias mantidas no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP).

O experimento com ratos foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) (Anexo).

3.2.1 Rações

As rações foram preparadas e utilizadas dentro do prazo de validade, que é de aproximadamente três meses se armazenadas a 4 °C, ou seis meses a - 20°C (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os ingredientes utilizados em cada ração estão descritos no Quadro 1.

3.2.1.1 Ração comercial do biotério da FCF/IQ-USP

A ração comercial utilizada no biotério da FCF/IQ-USP foi a ração Nuvital, descontaminada por irradiação gama.

3.2.1.2 Ração controle (R-C)

A ração foi elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda., segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para dietas AIN- 93 G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

3.2.1.3 Ração adicionada de FBV (R-FBV)

A ração foi elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda., segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para dietas AIN-93G

(REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), com parte do amido de milho substituído por FBV, de modo a se obter uma ração com 5% de AR.

Quadro 1 – Ingredientes utilizados na preparação das rações controle (R-C) e adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)

Ingredientes (g/kg ração)	R-C	R-FBV
Caseína ¹	200,0	200,0
Óleo de soja	70,0	70,0
L-cisteína	3,0	3,0
Bitartarato de colina ²	2,5	2,5
Mistura vitamínica ³	10,0	10,0
Mistura mineral ⁴	35,0	35,0
<i>Carboidratos</i>		
Sacarose	100,0	100,0
Amido de milho	529,5	429,5
FBV	-	100,0
<i>Fibra alimentar</i>		
Celulose microcristalina ⁵	50,0	42,5
Fibra inerente à FBV	-	7,5

¹Contendo no mínimo 85% de proteína; ²41,1% de colina; ³AIN-93-VX; ⁴AIN-93G-MX; ⁵Solka-Floc, 200 FCC, FS&D, St. Louis, MO (90 a 95% de celulose, 5 a 10% de hemicelulose e 5% de umidade).

3.2.2 Análises químicas realizadas nas rações

3.2.2.1 Composição centesimal

As análises foram realizadas em triplicata, com métodos da AOAC (HORWITZ; LATIMER, 2006) e os resultados expressos em g por 100 g de amostra em base seca e base integral. A determinação de umidade das amostras foi feita em estufa a vácuo 60 °C (método 925.45); de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC 960.52); de lipídios, por extração com Soxhlet (AOAC 2003.06) e de cinzas, em mufla à 550 °C (AOAC 923.03).

3.2.2.2 Frações de amido (AR, AT e AD)

O amido resistente (AR) foi quantificado baseado no método AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002), com modificações, como descrito no item 3.1.1.2.

Para quantificar o AT, foi utilizado o método de Cordenunsi e Lajolo (1995), como descrito no item 3.1.1.3.

O amido disponível (AD) foi calculado a partir da diferença entre as quantidades de AT e AR.

3.2.2.3 Fibra alimentar total (FAT)

O conteúdo de fibra alimentar total foi determinado nas amostras liofilizadas pelo método enzimico-gravimétrico AOAC 991.43 (LEE; PROSKY; VRIES, 1992) com modificações propostas por McCleary e Rossiter (2004), conforme descrito no item 3.1.1.4.

3.2.2.4 Quantificação da fração não disponível (FND) solúvel e insolúvel

A FND das rações foi quantificada de acordo com o método proposto por Saura-Calixto et al. (2000) e Serrano; Goñi; Saura-Calixto (2005), com modificações, como descrito no item 3.1.1.7.

3.2.2.5 Isolamento de fração não disponível (FND)

A FND foi isolada baseando-se em sua quantificação, com modificações, as quais foram descritas no item 3.1.1.8.

3.2.2.6 Fermentação *in vitro*

Todo o processo de fermentação *in vitro* foi realizado com a fração não disponível (FND) isolada das amostras. Para avaliar o processo de fermentação *in vitro*, o método foi baseado nas propostas de Cambrodón e

Martín-Carrón (2001) e Serrano; Goñi; Saura-Calixto (2005), com modificações (CARDENETTE, 2006), como descrito no item 3.1.1.9.

3.2.2.7 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A quantificação dos AGCC produzidos na fermentação *in vitro* das rações seguiu a metodologia descrita no item 3.1.1.10.

3.2.3 Protocolo experimental

Durante o experimento, 48 animais (ratos *Wistar Hannover*) foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C), com ciclo de luz claro:escuro de 12 h. Foram avaliados diversos parâmetros fisiológicos e histológicos decorrentes da fermentação colônica da FBV. Os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo controle (Grupo C), contendo 24 animais, que recebeu a ração controle;
- Grupo FBV (Grupo FBV), contendo 24 animais, que recebeu ração padrão de caseína com substituição do amido de milho por FBV, de forma a conter 5% de AR.

Foram avaliados periodicamente:

- a) Peso corporal: o peso dos animais foi verificado a cada dois dias;
- b) Consumo de ração: ração e água foram oferecidas *ad libitum* e o consumo de ração foi medido diariamente;
- c) Peso e umidade de fezes: as fezes foram coletadas em *pool* nos quatro primeiros dias de cada semana para avaliação da umidade e peso seco ao longo do experimento.

Todo o contato com os animais (alimentação, pesagem, limpeza) foi feito aproximadamente no mesmo horário de cada dia.

Na última semana, os animais foram sacrificados para a coleta de material a ser analisado (sangue, conteúdo cecal e/ou tecidos para análise histológica).

3.2.3.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O GTT foi realizado de acordo com o método proposto por Machado; Nogueira; Carpinelli (1992), com modificações. Foram utilizados 5 animais por grupo para o estudo deste parâmetro.

Para avaliar a tolerância à glicose, a veia jugular externa de 5 animais de cada grupo foi canulada para coleta de sangue e para administração de glicose.

O procedimento cirúrgico foi iniciado sempre entre as 9:00 e 11:00 h da manhã, sacrificando somente três animais por dia, para que todos estivessem em jejum de tempo semelhante (3 a 5 h). Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com uma solução contendo xilazina (Coopazine®) e cloridrato de cetamina (Vetaset®), na proporção de 1: 2 (v/ v) (dose 75 µL/ 100 g de peso corporal) e imobilizado em suporte de isopor com inclinação de aproximadamente 20 °. A temperatura do animal foi mantida a 37 °C durante as coletas de sangue. O pêlo da região do pescoço e tórax superior foi removido (depilado) e a veia jugular externa foi canulada para administração de glicose (0,75 g/ kg peso de corporal). Amostras de sangue (0,4 mL) foram coletadas nos tempos 0 (anterior à injeção de glicose), 5, 10, 15, 20, 30 e 60 min a partir da administração da glicose para quantificação de glicose e insulina. Durante os intervalos de coleta, a cânula esteve constantemente preenchida com solução fisiológica, que foi mantida em banho-maria a aproximadamente 40°C. As amostras de sangue de cada tempo foram depositadas em *eppendorfs* identificados, com anticoagulante (heparina sódica 10 u/ mL), centrifugadas a 800 g por 10 min para obtenção do plasma, o qual foi então armazenado a - 20 °C para as futuras dosagens de glicose e insulina. No final das coletas de sangue, os animais submetidos a este procedimento foram sacrificados por decapitação.

3.2.3.2 Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas

Os procedimentos de isolamento das ilhotas pancreáticas e de secreção e dosagem de insulina foram realizados no Laboratório de Fisiologia da

Secreção de Insulina, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), sob supervisão do Prof. Dr. Angelo Carpinelli. O procedimento visou avaliar a secreção de insulina em resposta a doses de diferentes concentrações de glicose.

a) Isolamento das Ilhotas pancreáticas - Para obter as ilhotas, os animais foram decapitados, esanguinados e submetidos a um banho de álcool a 70% na região abdominal para a assepsia. Foi realizada uma laparotomia mediana e a exposição do ducto biliar, que foi clampeado junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno e injetada retrogradamente cerca de 15 mL de solução de Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1mM, MgSO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 4 mM), equilibrada com carbogênio – mistura de O₂/CO₂ 95: 5 v/ v), com 5,6 mM de glicose e colagenase 0,7 mg/ mL (Collagenase Type V - Sigma Chemical Co).

A solução flui através dos ductos pancreáticos, provocando a distensão do tecido acinar possibilitando a retirada do pâncreas, que foi colocado em placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, tecido adiposo e vasos sanguíneos. Posteriormente, o pâncreas foi colocado em tubo FALCON em banho-maria a 37 °C por 25 min. A seguir foi adicionado 30 mL de Hanks gelado e o tubo foi agitado durante 30 segundos para auxiliar na digestão da porção exócrina do pâncreas. O produto da digestão foi transferido para um becker contendo solução de Hanks gelada. Após a homogeneização, a mistura foi deixada em repouso por 4 min e após este período o sobrenadante foi aspirado. Foram adicionados cerca de 60 mL de Hanks gelado e novamente a mistura (produto de digestão + solução de Hanks) foi homogeneizada. Este procedimento de lavagem foi repetido de 3 a 4 vezes. Em placa de Petri, foi feita a coleta das ilhotas com emprego de lupa e micropipeta.

b) Secreção estática de insulina - Para investigar o efeito do consumo da farinha de banana verde (FBV) sobre a secreção de insulina em 5,6 e 16,7 mM de glicose, foram utilizados grupos de 5 ilhotas isoladas em 500 µL de

solução de KH para pré-incubação, durante 30 min, em 5,6 mM de glicose. Em seguida, a solução foi retirada e substituída pelas concentrações de glicose.

Após o período de incubação, 400 µL do sobrenadante de cada eppendorf foi removido e estocado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio. O conteúdo total de insulina das ilhotas foi obtido após rompimento em sonificador das mesmas 5 ilhotas em 500 µL de solução de álcool/água/ácido clorídrico v: v: v (52 : 17 : 1).

c) Dosagem de insulina - A quantidade de insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio. Uma solução reagente inclui uma quantidade conhecida de anticorpo, uma quantidade conhecida do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – ^{125}I , PerkinElmer, Turku, Finlândia) e uma quantidade desconhecida de hormônio não radioativo (amostra). Como as duas formas do hormônio, radioativos e não-radioativos, competem por um mesmo número de locais de ligação no anticorpo, quanto mais hormônio não-radioativo estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar. O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol (PM 6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo é dada em função da concentração do hormônio não-radioativo. A relação ligado/livre do hormônio radioativo é maior quando menor número de não-radioativo estiver presente. Em seguida, a curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em uma amostra.

3.2.3.3 Análises histológicas

O tecido cecal de 5 animais por grupo (mesmos animais utilizados para avaliação do parâmetro descrito no item 3.2.3.4, a seguir) foi coletado por técnico especializado, sob orientação da Profa. Dra. Patricia Gama, do Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos, do Departamento de Histologia e Embriologia (ICB/USP). Foram preparadas 10 lâminas no total, sendo 1 lâmina por animal.

O conteúdo cecal destes animais foi coletado e o pH foi medido através de pHmetro portátil (Denver Instrument Company®), resultados que serão apresentados juntamente aos resultados de fermentação *in vivo*. Foram pesados aproximadamente 500 mg de conteúdo cecal, em duplicata, de cada rato e colocados em *eppendorfs* previamente tarados contendo 750 µL de solução HgCl₂ 1% (p/ v) e 105 µL de solução H₃PO₄ 5%. As amostras em solução foram homogeneizadas em Vortex e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para serem então armazenadas a - 20 °C até quantificação de AGCC (item 3.2.3.4, a seguir).

Após a retirada do conteúdo cecal, as paredes cecais foram lavadas com solução salina (NaCl 0,09%) e presas em pedaços de cortiça com alfinetes, de forma que a mucosa estivesse posicionada para cima.

Os tecidos passaram pelas seguintes etapas, para elaboração das lâminas histológicas: fixação, desidratação, diafanização, inclusão e coloração em H&E.

Fixação – A fixação foi realizada com formoldeído a 10%, que permaneceu em contato com os tecidos por 20 horas.

Desidratação – A água residual do tecido foi extraída pela passagem do tecido em banhos de concentrações crescentes de etanol, iniciando-se com 70%, até etanol puro. A ação dos desidratantes em cada tecido durou 1 hora.

Diafanização – A diafanização consistiu da passagem do tecido em banhos de xilol, com um tempo de duração de 1 hora para cada tecido.

Inclusão em parafina – Os tecidos foram mergulhados em parafina fundida em um recipiente retangular e, devido à temperatura do meio de inclusão, o xilol evaporou-se e os espaços, primeiramente ocupados por ele, foram preenchidos pela parafina. Em seguida, com o resfriamento da parafina, foram formados blocos contendo o complexo parafina-tecido. Estes blocos de parafina contendo os tecidos foram seccionados por uma navalha de aço do micrótomo. Foram realizados cortes semi-seriados de 6 µm de espessura. Estes cortes foram esticados em água quente e, em seguida, colocados em lâminas histológicas.

Coloração – Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Parâmetros para avaliação do efeito trófico no ceco

Para realização da análise morfométrica dos tecidos do ceco, foram feitas contagens do número total de células por cripta, número total de criptas bifurcadas e profundidade das criptas (μm). Para isto, foram selecionados campos que apresentassem no mínimo duas criptas dispostas longitudinalmente no corte histológico ou perpendicular à lâmina própria e à musculatura (CUMMINS; JONES; THOMPSON, 2006). Foram contadas aproximadamente 2300 células por lâmina, em um total de 5 lâminas por grupo experimental.

Para análise da proliferação celular, foi calculado o índice metafásico (IM), descrito por Whight e Appleton (1980), que consiste na porcentagem de células metafásicas em relação ao número total de células contadas. Além disso, foi avaliada a distribuição das metáfases ao longo cripta. Para identificação das células em divisão, os animais receberam injeção intraperitoneal de sulfato de vincristina (Tecnocris[®]) (dose 1 mg/ kg de peso corporal), que age como agente bloqueador de mitose no estágio da metáfase. Após exatas duas horas da administração da injeção, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados.

A análise das lâminas histológicas foi realizada através de microscopia de luz (Carl Zeiss, Alemanha), utilizando-se uma ocular integradora e objetiva projetando um aumento de 100 vezes o tamanho do material analisado, para a contagem do número total de células contidas em cada cripta, medida de profundidade das criptas e para a realização do IM; ou um aumento de 40 vezes, para a estimativa do número total de criptas bifurcadas. Foram capturadas imagens dos cortes da mucosa intestinal com auxílio do software Image Pro Plus (versão 6.0) adaptado ao microscópio de luz Olympus BX51 (Londres, Inglaterra).

Foram analisadas 10 lâminas, sendo 1 lâmina por animal, ou seja, 5 lâminas por grupo experimental (G-C e G-FBV). Cada lâmina contém de 4 a 6 cortes histológicos.

Os resultados do número total de células da cripta, total de criptas bifurcadas, profundidade das criptas e IM, assim como a distribuição da divisão

celular ao longo da cripta, foram obtidos através do cálculo da média de todos os cortes e todas as lâminas de cada grupo experimental.

3.2.3.4 Fermentação *in vivo*

Ao contrário da fermentação *in vitro*, onde a solução obtida no final (sobrenadante contendo AGCC) é bem límpida, na fermentação *in vivo* é necessária uma etapa de purificação do conteúdo cecal dos ratos (contendo os AGCC) para a obtenção de uma solução também suficientemente límpida para ser analisada em CG.

No momento das análises, as amostras de conteúdo cecal coletadas durante o preparo do tecido cecal para as lâminas histológicas (item 3.2.3.3), foram descongeladas e homogeneizadas em Vortex por 5 min. Alíquotas de 500 µL foram coletadas e a estas foram adicionados 400 µL de padrão interno 0,1% e 100 µL de água. Os homogeneizados foram centrifugados a 6000rpm por 50 min e os sobrenadantes, removidos com agulha e seringa, foram filtrados em membrana de porosidade 0,8 µm (Minisart®, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, França) para quantificação dos AGCC.

Os AGCC foram analisados em cromatógrafo a gás (CG) HP 6890 Plus (Santa Clara, CA, USA) equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor automático (HP 7683) e coluna capilar CP7747 de sílica fundida (WCTO), Varian (Palo Alto, CA, USA). A temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C e a pressão foi mantida constante (42,8 kPa). A temperatura inicial da corrida foi de 110 °C, mantida durante 2 min, com rampa de 2 °C/ min até atingir a temperatura de 140 °C e de 40 °C/ min até a temperatura final de 200 °C (tempo de corrida de 20 min). As amostras foram injetadas em volume de 1 µL, com *split* 1: 10. A curva padrão foi obtida com soluções de AGCC (Volatile Acid Standard Mix, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em concentrações de 0,9 a 6,0 mM e ácido 2-metil-valérico 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como padrão interno (PI). Os parâmetros utilizados nesta análise foram adaptados de acordo com as indicações de uso da coluna.

3.3 Humanos

3.3.1 Refeições congeladas

O estudo foi conduzido utilizando duas refeições (RC e RF). A refeição controle (RC) foi produzida em planta piloto (escala semi-industrial) e congelada pela Empresa Sadia S.A. (unidade de São Paulo), de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos (ANVISA, 2010). De acordo com a empresa Sadia S.A., o desenvolvimento da refeição foi baseado na observação do comportamento de 110 pessoas (adultos e com potencial para consumir as refeições estudadas) em restaurantes do segmento *self-service* por quilo da cidade de São Paulo, em maio de 2007, o que foi determinante de características como porcionamento a ser oferecido por prato (400 g) e valor energético da refeição. A RC foi elaborada de forma a conter os seguintes ingredientes: macarrão fusilli integral, molho tipo bolonhesa com proteína texturizada de soja e vegetais.

A refeição com farinha de banana verde (RF) foi constituída da RC adicionada de 8 g FBV. Esta adição ocorreu após o descongelamento e aquecimento da refeição. O **Quadro 2** apresenta as características e ingredientes das refeições congeladas controle (RC) e adicionada de FBV (RF).

As refeições controle (RC) foram produzidas em lotes, de acordo com a necessidade para realização dos ensaios clínicos (armazenamento < 3 meses) e armazenadas a - 20 °C até o consumo. A adição da FBV ocorreu após o descongelamento e aquecimento da refeição, onde pequena porção de macarrão (8 g) foi retirada e substituída por FBV (8 g), resultando na refeição adicionada de FBV (RF). Para cada lote (total de 3 lotes), 3 amostras da RC ou RF foram liofilizadas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), trituradas em partículas menores de 0,250 mm, misturadas e armazenadas a - 20 °C até a realização das análises (resultando n = 3 para ambas RC e RF). Como as amostras das refeições possuíam teor lipídico maior que 5%, estas foram previamente desengorduradas.

Quadro 2. Características e ingredientes das refeições congeladas controle e adicionada de farinha de banana verde (FBV)

Característica	Refeições	
	RC	RF
Descrição	Macarrão fusilli integral, proteína texturizada de soja e vegetais (milho verde, brócolis, couve-flor, cenoura) (molho à bolonhesa)	
Ingrediente funcional	Sem adição de ingrediente	FBV

FBV - Farinha de banana verde.

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de 8 g de FBV.

3.3.2 Análises químicas realizadas nas refeições

3.3.2.1 Composição centesimal

As análises foram realizadas em triplicata, com métodos da AOAC (HORWITZ; LATIMER, 2006) e os resultados expressos em g por 100 g de amostra em base seca e base integral. A determinação de umidade das amostras foi feita em estufa a vácuo 60 °C (método 925.45); de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC 960.52); de lipídios, por extração com Soxhlet (AOAC 2003.06) e de cinzas, em mufla a 550 °C (AOAC 923.03).

3.3.2.2 Frações de amido (AR, AT e AD)

O amido resistente (AR) foi quantificado baseado no método AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002), com modificações, como descrito no item 3.1.1.2.

Para quantificar o AT, foi utilizado o método de Cordenunsi e Lajolo (1995), como descrito no item 3.1.1.3.

O amido disponível (AD) foi calculado como sendo a diferença entre as concentrações de AT e AR.

3.3.2.3 Fibra alimentar total (FAT)

O conteúdo de fibra alimentar total foi determinado nas amostras liofilizadas pelo método enzimico-gravimétrico AOAC 991.43 (LEE; PROSKY, VRIES, 1992) com modificações propostas por McCleary e Rossiter (2004), conforme descrito no item 3.1.1.4.

3.3.2.4 Açúcares solúveis

A análise de açúcares solúveis foi realizada conforme descrito no item 3.1.1.5.

3.3.2.5 Frutanos

Os frutanos das refeições foram determinados pelo método AOAC 999.03 (McCLEARY et al., 2002), como descrito no item 3.1.1.6.

3.3.2.6 Quantificação da fração não disponível (FND) solúvel e insolúvel

A FND das rações foi quantificada de acordo com o método proposto por Saura-Calixto et al. (2000) e Serrano; Goñi; Saura-Calixto (2005), com modificações, como descrito no item 3.1.1.7.

3.3.2.7 Isolamento de fração não disponível (FND)

A fração não disponível foi isolada baseando-se na quantificação da FND, com modificações, as quais foram descritas no item 3.1.1.8.

3.3.2.8 Fermentação *in vitro*

Assim como realizado com a FBV e as rações, o processo de fermentação *in vitro* foi realizado com a fração não disponível (FND) isolada das refeições. Para avaliação deste processo, o método foi baseado nas

propostas de Cambrodón e Martín-Carrón (2001) e Serrano; Goñi; Saura-Calixto et al. (2005), com modificações (CARDENETTE, 2006), como descrito no item 3.1.1.9.

3.3.2.9 Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A quantificação dos AGCC produzidos na fermentação *in vitro* das refeições seguiu a metodologia descrita na fermentação *in vitro* da FBV, conforme item 3.1.1.10.

3.3.2.10 Capacidade antioxidante *in vitro*

Para avaliação da capacidade antioxidante das refeições, foram utilizados três diferentes métodos: fenólicos totais por redução do reagente de Folin-Ciocalteu; sequestro de radicais livres do DPPH; e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), os quais foram descritos no item 3.1.1.12.

3.3.3 Análises químicas, bioquímicas e parâmetros fisiológicos realizados nos ensaios clínicos

3.3.3.1 Determinação de capacidade antioxidante *in vivo* (dois diferentes métodos)

a) Sequestro de radicais livres do DPPH - A capacidade antioxidante pela redução do radical estável DPPH foi realizada de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Uma solução de DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (0.1 mM) em metanol foi preparada. Uma aliquota de 40 µL de amostra (plasma) desproteínizada com methanol (1: 4, v/ v) ou urina foi adicionada a 200 µL dessa solução. A diminuição da absorbância foi determinada a 517 nm em espectrofotômetro de microplaca (Benchmark Plus, Biorad, Hercules, CA) até atingir um platô (após 20 min). Os resultados foram expressos em µmoles

equivalentes de Trolox/ mL de plasma ou μ moles equivalentes de Trolox/ g creatinina na urina.

b) Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) - A análise foi realizada de acordo com Prior et al., 2003. O plasma foi inicialmente acidificado com ácido perclórico (0,5 M) (1: 1, v/ v) e centrifugado a 10.000 g/ 5 min/ 25 °C para precipitação das proteínas. Uma adequada diluição foi feita com tampão fosfato (75 mM, pH 7,0). 25 μ L das amostras diluídas e 150 μ L de solução de fluoresceína (FL) (40 nM) em tampão fosfato foram adicionadas a microplaca de 96 poços e, em seguida, foi adicionado 25 μ L de solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH, Wako Chemicals Inc., Richmond, USA) (53 mM) em tampão fosfato; as leituras foram realizadas imediatamente. A quantificação da fluorescência foi realizada em Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, US) (37 °C, 485 excitação e 525 emissão) Os resultados foram calculados usando as diferenças de área sob a curva de decaimento da fluorescência entre o branco e a amostra. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/ mL de plasma.

3.3.3.2 Glicose sanguínea

a) Ensaio para avaliação de resposta glicêmica: A glicose sanguínea foi determinada (duplicata) por método enzimático (glicose oxidadase/ peroxidase) no sangue capilar (BROUNS et al., 2005). Para a punção capilar foi utilizado o lancetador Accu-Chek® Softclix® Pro-Roche. Esse lancetador permite obter uma gota de sangue da ponta dos dedos das mãos de forma higiênica e indolor; bem como possibilita selecionar a profundidade de penetração correta da lanceta descartável (Accu-Chek® Softclix® Pro-Lancet Roche), a qual foi trocada a cada coleta de sangue. O aparelho para quantificação de glicose utilizado foi o Accu-Chek® Go-Roche.

b) Ensaio para avaliação de hormônios gastrintestinais: A glicose foi analisada com *Labtest Glucose PAP kit liquid* (Labtest Diagnóstica SA, São Paulo, Brasil). Os valores foram expressos em mmol/ L de plasma ou sangue.

3.3.3.3 Hormônios gastrintestinais

Os hormônios grelina, leptina e insulina foram analisados (duplicata) através de kits LINCOpex® específicos (Linco Research Inc, St. Charles, MO, USA) segundo a tecnologia Luminex™ xMAP (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Os valores foram expressos em pg/ mL de plasma ou soro.

3.3.3.4 Insulina

A insulina no teste de tolerância à glicose foi dosada com kit ELISA (Linco Research, St. Louis, MO, USA). Os valores foram expressos em pmol/ L de plasma ou soro.

3.3.3.5 Creatinina

Creatinina na urina foi analisada (triplicata) com *Labtest Creatinne kit* (Labtest Diagnóstica SA, São Paulo, Brasil).

3.3.3.6 Índice glicêmico (IG) e carga glicêmica (CG)

O índice glicêmico (IG) das refeições foi determinado de acordo com o protocolo proposto pela FAO (FAO/WHO, 1998; BROUNS et al., 2005). Para a elaboração da curva glicêmica foi utilizada a glicemia dos voluntários nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min.

O IG de cada amostra foi estimado usando a relação entre a área sob a curva produzida pelas refeições (RC e RF) e pelo pão (referência - 100%). A área sob a curva foi calculada geometricamente, aplicando-se a regra trapezoidal e ignorando as áreas abaixo da linha de jejum. Os resultados de IG foram expressos em %.

A carga glicêmica (CG) de cada amostra foi calculada pela seguinte equação: $CG = IG \text{ (glicose como referência)} \times \text{conteúdo de carboidrato disponível (g) na porção ingerida} \times 1/100$ (SALMERON et al., 1997). Para a obtenção do valor de IG (com glicose como referência), o valor de IG (com pão como referência) deve ser multiplicado por 0,7.

O pão branco utilizado nos ensaios de índice glicêmico foi obtido no comércio local (padaria fixa), onde é denominado “pão francês”.

3.3.3.7 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os voluntários ingeriram 75 g de glicose (300 mL), sendo tomadas alíquotas de sangue em diferentes tempos (0, 30, 60, 90, 120 min) para análise de glicose e insulina.

3.3.3.8 Avaliação da saciedade

Durante cada comparecimento os voluntários responderam os testes de escala visual (*Visual Analogue Scale* - VAS) (FLINT et al., 2000) e escala bipolar utilizada por Holt et al. (1995), para avaliação de fome/saciedade. Após jejum de 4 h, responderam os testes no tempo zero ($t = 0$) e após o consumo de uma das refeições (nos tempos 30, 60, 90, 120 e 180 min). Posteriormente, o nível de saciedade provocado pela refeição consumida (RC ou RF) foi avaliado pelo valor energético em refeições posteriores (de composição conhecida) - após 180 min e 360 min do tempo zero foi oferecido (*ad libitum*) um lanche e um jantar, respectivamente. Após 15 min da ingestão, as sobras foram retiradas para quantificação do consumo.

O teste *Visual Analogue Scale* (VAS) é um instrumento utilizado para medir características ou atitudes (FLINT et al., 2000). Trata-se de uma linha horizontal, de 100 mm, ancorada por descritores em seus extremos, tais como “nenhuma fome” e “extremamente faminto”. Para reforçar a capacidade do teste, a questão do apetite e saciedade é questionada em vários pontos relacionados, entre eles: Você está com fome agora? Você está com sede

agora? Você poderia comer agora? Você está saciado agora? Você está com vontade de comer agora?

A escala bipolar utilizada por Holt (Figura 1) é ancorada em sete pontos, que vão de - 3 (para “extremamente faminto”), com ponto médio zero (para nenhuma sensação de fome) a + 3 (para “extremamente satisfeito”) (HOLT et al., 1995).

Figura 1. Escala bipolar de Holt (HOLT et al., 1995).

3.3.3.9 Avaliação do funcionamento intestinal

O funcionamento intestinal foi avaliado por questionário baseado em questões sobre sintomas gastrintestinais, que foi respondido pelo próprio voluntário antes e após 24 h do consumo das refeições. O desconforto foi avaliado pela presença de flatulência, dor abdominal e distensão. As notas atribuídas para consistência das fezes foram: 0 (líquida), 1 (pastosa), 2 (regular) e 3 (dura).

3.3.4 Ensaios clínicos

Os ensaios clínicos de resposta glicêmica, avaliação de parâmetros bioquímicos relacionados à saciedade e avaliação da fome/saciedade e funcionamento intestinal foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). O ensaio com hormônios gastrintestinais e capacidade antioxidante também teve a aprovação do CEP-HU/USP, pois a coleta de material biológico foi realizada no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da USP. Todos os voluntários assinaram o TLCE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) antes de sua participação nos ensaios.

3.3.4.1 Protocolo experimental do ensaio de resposta glicêmica

a) Ensaio de curta duração

O ensaio de resposta glicêmica foi realizado de acordo com o protocolo proposto pela FAO (FAO/WHO, 1998; BROUNS et al., 2005). Participaram do estudo voluntários saudáveis ($n = 15$) (mulheres), com idades entre $28,7 \pm 8,7$ (erro padrão) anos, e índice de massa corporal normal (IMC) de $22,4 \pm 1,4 \text{ kg/m}^2$. Foram excluídos indivíduos com: sobrepeso/obesidade ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e baixo peso ($\text{IMC} \leq 18,6 \text{ kg/m}^2$), segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997); diagnóstico prévio de diabetes *mellitus* ou familiares portadores; relatos de doença, gravidez, tratamento de qualquer espécie e no teste de resposta glicêmica ao pão (referência), glicemia de jejum $> 5 \text{ mmol/L}$.

Os voluntários compareceram ao laboratório uma vez por semana, pela manhã, após 10-12 h de jejum. O pão francês (alimento referência) foi testado três vezes, nas três semanas iniciais; nas semanas seguintes os voluntários consumiram uma das duas refeições, RC e RF (RC+ 8 g de FBV), de forma randomizada. Cada porção de pão (61 g) ou RC (390 g) continha exatamente 25 g de carboidratos disponíveis. Os voluntários tiveram 10 a 15 min para consumir cada porção com 250 mL de água. Amostras de sangue foram tomadas, por punção capilar na ponta do dedo, no jejum (tempo zero) e após o consumo do pão ou das refeições (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min) para construção da curva glicêmica (BROUNS et al., 2005).

b) Ensaio de média duração

Durante o período de tratamento (14 dias) os voluntários ($n = 14$) (mulheres), com idade de $29,6 \pm 5,2$ (erro padrão) anos e IMC de $22,8 \pm 1,9 \text{ kg/m}^2$, consumiram diariamente 8 g de FBV adicionada em sua dieta habitual. No primeiro e décimo quarto dia de tratamento, os voluntários em jejum (10-12 h) receberam refeição controle denominada de RC0 (refeição controle no primeiro dia) e RC14 (refeição controle após 14 dias), para avaliação do efeito da ingestão de FBV por 14 dias sobre a resposta glicêmica. Os critérios de inclusão e demais procedimentos do ensaio de curta duração para resposta

glicêmica foram repetidos (item acima). No primeiro dia de tratamento, os voluntários foram orientados sobre a alimentação que deveriam receber durante o período e como deveriam adicionar a FBV na dieta.

3.3.4.2 Protocolo experimental do ensaio de avaliação do funcionamento intestinal

a) Ensaio de curta duração

O estudo foi realizado em voluntários saudáveis ($n = 50$) (mulheres), com idades entre 18 e 40 anos. Os voluntários tinham IMC entre 18,5 e 24,9 kg/ m², classificados como eutróficos de acordo com a World Health Organization (WHO, 1997). Foram excluídos indivíduos com relatos de doença, gravidez, tratamento de qualquer espécie e elevada ingestão de fibra alimentar (> 15 g/dia). Os voluntários chegaram ao laboratório no horário do almoço (após 4 h do jejum). A cada semana, os voluntários consumiram uma refeição (400 g) de forma randomizada (RC, RF) com 250 mL de água em 10 a 15 min. Todos os voluntários responderam a um questionário sobre sintomas gastrintestinais antes e após 24 h do consumo das refeições.

b) Ensaio de média duração

Durante o período de tratamento (14 dias) os voluntários ($n = 14$) (mulheres), com idade de $29,6 \pm 5,2$ (erro padrão) anos e IMC de $22,8 \pm 1,9$ kg/ m², consumiram diariamente 8 g de FBV adicionada em sua dieta habitual. No primeiro e décimo quarto dias de tratamento, os voluntários em jejum (10 - 12 h) receberam a refeição controle, denominada de RC0 (refeição controle no primeiro dia) e RC14 (refeição controle após 14 dias) para avaliação do efeito da ingestão de FBV por 14 dias sobre o funcionamento intestinal.

Os critérios de inclusão e exclusão de voluntários foram os mesmos aplicados no ensaio de avaliação de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade (próximo item), pois se tratam dos mesmos voluntários. Todos os voluntários responderam a um questionário sobre sintomas gastrintestinais antes e após 24 h do consumo das refeições. No primeiro dia de tratamento, os

voluntários foram orientados sobre a alimentação que deveriam receber durante o período e como deveriam adicionar a FBV na dieta.

3.3.4.3 Protocolo experimental do ensaio de avaliação de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade e capacidade antioxidante no plasma e urina

a) Ensaio de curta duração

O estudo foi realizado em voluntários saudáveis ($n = 14$) (mulheres), com idade de $29,6 \pm 5,2$ (erro padrão) anos e IMC de $22,8 \pm 1,9$ kg/m², classificados como eutróficos de acordo com a World Health Organization (WHO, 1997). Foram excluídos indivíduos com: sobrepeso/obesidade (IMC ≥ 25 kg/ m²) e baixo peso (IMC $\leq 18,6$ kg/ m²); diagnóstico prévio de diabetes *mellitus* ou familiares portadores; doenças renais, gastrintestinais; hipertireoidismo; gravidez, amamentação ou relato de terapia hormonal; tratamento de qualquer espécie; possíveis distúrbios alimentares (avaliado através de questionário sobre comportamento alimentar (STUNKARD; MESSIK, 1985); e glicemia de jejum > 5 mmol/ L. Os voluntários foram orientados a manter uma dieta equilibrada, evitando nas 24 h que antecederam a coleta, o consumo de alimentos com alta capacidade antioxidante (foi fornecida lista de alimentos) e álcool.

Os voluntários compareceram ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário uma vez por semana pela manhã, depois de jejum de 10 - 12 h, e tiveram sua veia canulada. A cada semana, consumiram uma refeição (400 g) de forma randomizada (RC ou RF), em 10 a 15 min, com 250 mL de água. Antes e após o consumo da refeição foram tomadas amostras de sangue (8 mL) nos tempos: 0 (antes do consumo), 30, 60, 120 e 180 min e amostras de urina (5 mL) nos tempos: 0 (primeira urina do dia) e 1, 2, 3, 4 e 6 h, sendo estas últimas congeladas para análise posterior.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacutainer® com EDTA. Em seguida, alíquotas de sangue (1 mL) foram transferidas para tubos Eppendorf com ou sem Pefabloc® (Sigma, Aldrich, Switzerland) (10 mg/ mL) e centrifugadas (800 g) a 4 °C, por 10 min. O plasma foi estocado em ultrafreezer

até a análise de grelina, leptina, glicose, creatinina e capacidade antioxidante. Outra alíquota de sangue foi coletada em tubos Vacutainer®, centrifugada (800 g) a 4 °C, por 10 min e o soro foi armazenado para análise de insulina.

b) Ensaio de média duração

Durante o período de tratamento (14 dias) os voluntários (n = 14) (mulheres), com idade de $29,6 \pm 5,2$ (erro padrão) anos e IMC de $22,8 \pm 1,9$ kg/m², consumiram diariamente 8 g de FBV adicionada em sua dieta habitual. Para avaliação do efeito da ingestão de FBV por 14 dias sobre os hormônios gastrintestinais e tolerância à glicose, foram adotados os procedimentos descritos a seguir.

No primeiro dia comparecimento, os voluntários em jejum (10 - 12 h) tiveram sua veia canulada. Neste dia receberam 75 g de glicose (300 mL). Antes e após a ingestão da glicose foram tomadas amostras de sangue (5 mL) nos tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 min, para determinação do GTT e de insulina.

No segundo comparecimento (primeiro dia de tratamento), os voluntários em jejum (10 - 12 h) tiveram sua veia canulada. Neste dia consumiram a refeição controle (400 g) denominada de RC0, em 10 a 15 min, com 250 mL de água. Antes e após o consumo da refeição foram tomadas amostras de sangue (8 mL) nos tempos: 0, 30, 60, 120 e 180 min, para análise dos hormônios gastrintestinais. Neste dia os voluntários iniciaram o consumo diário de FBV (8 g/ dia), sendo orientados sobre a alimentação que deveriam receber durante o período, como deveriam adicionar a FBV na dieta e como registrar o consumo alimentar diário durante os 14 dias de tratamento.

No terceiro comparecimento (após 12 dias de consumo de FBV), os voluntários em jejum (10 - 12 h) tiveram sua veia canulada. Neste dia receberam 75 g de glicose (300 mL). Antes e após a ingestão da glicose foram tomadas amostras de sangue (5 mL) nos tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 min, para determinação de GTT e de insulina.

No quarto comparecimento (décimo quarto dia de tratamento), os voluntários (jejum de 10-12 h) tiveram sua veia canulada. Neste dia consumiram a refeição controle (400 g) denominada de RC14, em 10 a 15 min, com 250 mL de água. Antes e após o consumo da refeição foram tomadas

amostras de sangue (8 mL) nos tempos: 0, 30, 60, 120 e 180 min, para análise dos hormônios gastrintestinais.

Os critérios de inclusão e exclusão e demais procedimentos descritos no ensaio de curta duração para avaliação de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade foram repetidos (item anterior).

3.3.4.4 Protocolo experimental do ensaio para avaliação de fome e saciedade

a) Ensaio de curta duração

O estudo foi realizado em voluntários saudáveis ($n = 50$) (mulheres), com idades entre 18 e 40 anos e IMC entre 18,5 a 24,9 kg/ m², classificados entre eutróficos de acordo com a World Health Organization (WHO, 1997). Foram excluídos indivíduos com: sobrepeso/obesidade (IMC ≥ 25 kg/ m²) e baixo peso (IMC $\leq 18,6$ kg/ m²); relatos de doença, gravidez, amamentação ou terapia hormonal, tratamento de qualquer espécie; elevada ingestão de fibra alimentar (> 15 g/ dia); e possíveis distúrbios alimentares (avaliado através de questionário sobre comportamento alimentar (STUNKARD; MESSIK, 1985)).

Os voluntários foram orientados a manter uma dieta equilibrada, evitando consumo de álcool nos dias que antecederam a coleta, e chegaram ao laboratório no horário do almoço (após 4 h do jejum). A cada semana os voluntários consumiram uma refeição (400 g) de forma randomizada (RC ou RF) com 250 mL de água em 10 a 15 min. Os voluntários responderam o teste *Visual Analogue Scale* (VAS) (FLINT et al., 2000) e a escala bipolar utilizada por Holt et al. (1995) no tempo zero ($t = 0$) e após o consumo de uma das refeições nos tempos 30, 60, 90, 120 e 180 min, para avaliação de fome/saciedade.

Avaliação de consumo das refeições subsequentes - O nível de saciedade provocado pelas refeições foi avaliado pelo valor energético em refeições posteriores (consumo *ad libitum*) (DE GREEF, 1993; LUDWIG et al., 1999; BALL et al., 2006). Foram oferecidas duas refeições de composição conhecida: um lanche após 180 min (1 fatia de pão de forma sem casca com requeijão - 452 kJ) acompanhado de chá mate pronto (200 mL - 167 kJ); após

15 min, as sobras foram retiradas para quantificação do consumo. Após 360 min do tempo zero foi oferecida a segunda refeição, um jantar de composição conhecida (lasanha congelada com molho de tomate e carne moída - 504 kJ/100 g).

b) Ensaio de média duração

Durante o período de tratamento (14 dias) os voluntários (n = 14) (mulheres), com idade de $29,6 \pm 5,2$ (erro padrão) anos e IMC de $22,8 \pm 1,9$ kg/m², consumiram diariamente 8 g de FBV adicionada em sua dieta habitual. No primeiro e décimo quarto dias de tratamento, os voluntários em jejum (10 - 12 h) receberam a refeição controle, denominada de RC0 (refeição controle no primeiro dia) e RC14 (refeição controle após 14 dias) para avaliação do efeito da ingestão de FBV por 14 dias sobre a fome e a saciedade. Os critérios de inclusão de voluntários foram os mesmos aplicados no ensaio de avaliação de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade (item anterior), pois se tratam dos mesmos voluntários, e demais procedimentos do ensaio de curta duração para fome e saciedade foram repetidos (item anterior). No primeiro dia, os voluntários foram orientados sobre a alimentação que deveriam receber durante o período e como deveriam adicionar a FBV na dieta.

3.4 Análise estatística

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc.Tulsa, OK, E.U.A.).

Os resultados químicos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças foram determinadas pelo teste t de Student. Em algumas análises, também foi utilizada análise de variância ANOVA de medidas repetidas e as diferenças foram determinadas pelo teste *post hoc* Tukey.

Os resultados dos ensaios com ratos foram apresentados como média $\pm$ DP e as diferenças foram determinadas pelo teste t de Student.

Os resultados de índice glicêmico, em humanos, foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP) e as diferenças foram determinadas pelo teste t de Student.

Para os parâmetros com grande variação interpessoal (hormônios gastrintestinais, ensaio de fome/saciedade, consumo alimentar), os resultados foram apresentados como média, mediana, mínimo e máximo, além da variação percentual. Foi utilizada análise de variância ANOVA de medidas repetidas e as diferenças foram determinadas pelo teste *post hoc* Tukey; para consumo alimentar foi utilizado o teste t de Student. Para avaliação de funcionamento intestinal foi utilizada apenas estatística descritiva.

Nível de significância: foram considerados como diferença estatística significativa os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tradicionalmente, os alimentos industrializados têm sido desenvolvidos com o objetivo de atender às exigências dos consumidores, relacionadas ao sabor, aparência, valor de mercado e praticidade de preparo/consumo. O desenvolvimento de produtos para conferir benefícios à saúde é uma tendência relativamente nova e reflete a crescente aceitação do papel da dieta na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (STEPHEN, 1998). Esses produtos são conhecidos como “alimentos funcionais” e têm como principal função auxiliar na redução do risco de DCNT (BEHRENS; ROIG; SILVA, 2001). Segundo a legislação brasileira (ANVISA, 1999), dentre as alegações de propriedade funcional estão aquelas relacionadas a possíveis efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, além de funções nutricionais básicas (quando se tratar de nutriente), devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse das indústrias de alimentos em incorporar ingredientes com propriedades benéficas à saúde. Entre estes, destacam-se os carboidratos não disponíveis como fibra alimentar, amido resistente e frutanos, e mais recentemente os compostos bioativos associados na fração fibra alimentar (GIBSON; ROBERFROID, 1995; LAJOLO et al., 2001; GIBSON et al., 2004; LAJOLO; MENEZES, 2006; SAURA-CALIXTO, 2006). Entretanto, os estudos mostram o potencial funcional destes ingredientes na forma de produto isolado e não incorporado em refeições. Ao mesmo tempo, ensaios clínicos para a avaliação dos efeitos fisiológicos de alguns destes ingredientes são bastante limitados e praticamente inexistem em estudos nacionais. Uma vez que os carboidratos não disponíveis, de elevada fermentabilidade, podem ser utilizados na produção de alimentos funcionais que visem reduzido aumento da resposta glicêmica pós-prandial, assim como promoção da saúde intestinal (SARIS et al., 1998; FOLKS; FULLER; GIBSON, 1999; WHO/FAO, 2003; GOVINDJI, 2006), no presente trabalho foi utilizada a banana no estado verde de maturação, para o desenvolvimento de um ingrediente potencialmente funcional, que foi nomeado farinha de banana verde

(FBV). O potencial funcional deste ingrediente foi testado *in vitro*, em animais e em humanos, através de diversos parâmetros, que serão discutidos a seguir.

4.1 Farinha de banana verde (FBV)

4.1.1 Perfil químico, nutricional, microscópico e microbiológico da farinha de banana verde (FBV)

A farinha de banana verde (FBV) produzida apresentou cor branca e superfície lisa (**Figura 2**). Os resultados químicos da FBV referem-se aos valores médios de 3 diferentes lotes, que foram preparados para os diferentes ensaios clínicos.

Figura 2. Fatias de polpa de banana verde (*Musa acuminata*, subgrupo Cavendish) secas a 55 °C e farinha de banana verde (FBV).

A **Tabela 1** apresenta a composição química e valor energético da FBV, sendo os carboidratos calculados pela soma de amido disponível e açúcares solúveis. A **Tabela 2** contém o perfil de fração não disponível (FND) e valor energético da FBV, sendo que os carboidratos foram calculados por diferença, considerando a FND em vez de FA ($100 - (\text{umidade} + \text{cinza} + \text{lipídio} + \text{proteína} + \text{FND})$).

Farinhas de banana verde, preparadas similarmente por outros grupos, apresentaram a seguinte composição química (b.s.): 0,85 g/ 100 g lipídios; 2,7 g/ 100 g de proteína e 3,12 g/ 100 g de cinzas (preparada em escala laboratorial, *Musa paradisíaca*, secas a 50 °C (DA MOTA et al., 2000)) e 0,34 g/ 100 g de lipídios; 4,78 g/ 100 g de proteína e 2,88 g/ 100 g de cinzas

(preparada em planta piloto) (OVANDO-MARTINEZ et al., 2009). Os dois tipos de farinha e a do presente estudo apresentaram valores semelhantes para estes parâmetros, com pequenas variações que podem ser explicadas por diferente metodologia empregada, grau de maturação e diferentes cultivares.

Tabela 1. Composição química (g/ 100 g amostra base integral e seca) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral e seca) da farinha de banana verde (FBV)

	FBV (base integral)	FBV (base seca)
Umidade	9,62 ± 0,25	-
Proteína	4,68 ± 0,07	5,18 ± 0,08
Cinzas	2,12 ± 0,10	2,34 ± 0,11
Lipídios	0,09 ± 0	0,10 ± 0
Glicose	0,37 ± 0,02	0,41 ± 0,02
Frutose	0,48 ± 0,01	0,53 ± 0,01
Sacarose	0,96 ± 0,08	1,07 ± 0,08
Açúcares solúveis totais	1,81	2,01
Amido total	67,77 ± 0,55	74,98 ± 0,60
Amido disponível	11,92	13,19
Amido resistente (AR)	55,85 ± 1,90	61,80 ± 2,11
Fibra alimentar total (FAT) (sem AR e Fr)	7,75 ± 0,21	8,58 ± 0,23
Frutanos (Fr)	0,05 ± 0	0,05 ± 0
Carboidratos não disponíveis totais (FAT + AR + Fr)	63,65	70,72
Valor energético (kJ/100 g)*	316	351

*Cálculo de energia (fator de Atwater): proteína (g) x 17, lipídios (g) x 37 e carboidratos (soma de amido disponível e açúcares solúveis) x 17. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas de 3 lotes.

A FBV apresenta pequena quantidade de açúcar solúvel (2% b.s.), a qual está de acordo com o grau de maturação da fruta (NASCIMENTO et al., 2006). A quantidade de frutanos também é muito pequena (0,05% b.s.); resultados semelhantes foram observados por Agopian et al. (2008), que detectaram valores muito reduzidos de FOS em diferentes cultivares de banana.

A maior parte do amido total é de AR e somente 13% (b.s.) é amido disponível. Alguns autores sugerem a existência de relação entre tipo/quantidade de amido e quantidade de açúcar solúvel em alimentos com a resposta glicêmica pós-prandial produzida. Os alimentos classificados como produtores de baixo índice glicêmico, geralmente, apresentam baixa concentração de açúcares solúveis e alta concentração de carboidratos não disponíveis (MENEZES; LAJOLO, 2006; MENEZES et al., 2009). Por exemplo, *oat bran*, que contém 1 g/ 100 g de açúcar solúvel e 46 g/ 100 g de amido disponível (base seca), produz índice glicêmico de 28% e carga glicêmica de 1,2, os quais são considerados baixos (USP, 1998). Dessa forma, espera-se que a adição da FBV em alimentos ou preparações não altere de forma significativa a resposta glicêmica após sua ingestão.

A FBV apresentou moderado conteúdo de FAT (sem AR e frutanos) (8,6% b.s.), o qual é superior ao encontrado por Da Mota et al. (2000) para a mesma cultivar (6,53 g/ 100 g base seca).

O processo utilizado para a elaboração da FBV resultou em uma concentrada fonte de AR (62% b.s.), a qual contém principalmente AR2 e pequena quantidade de AR1 (FAISANT et al., 1995). A concentração de AR nesta farinha (base seca) é superior aos resultados obtidos por Ovando-Martinez et al. (2009), com *Musa paradisiaca*, comercializada no México (43%) e inferior com relação ao amido disponível (28%). Estas diferenças podem ser decorrentes do diferente grau de maturação da banana verde.

O AR pode ser utilizado como uma fonte de fibra alimentar uma vez que apresenta efeitos fisiológicos semelhantes aos da FA (GRAY, 2006; BUTTRISS; STOKES, 2008). Além disto, o AR é fermentado pela microbiota intestinal, a qual proporciona inúmeros efeitos benéficos para o organismo (WONG et al., 2006; FÄSSLER et al., 2007).

A FBV representa uma fonte concentrada de carboidratos não disponíveis (71% de FAT, AR e frutanos, b.s.) quando comparada com o *oat bran* (20% de FA e frutanos) (USP, 1998), o qual é considerado rica fonte de FAT. Paralelamente, o valor energético da FBV (351 kJ/ 100 g base seca) é muito baixo se comparado com o *oat bran* (1443 kJ/ 100 g base seca). Dessa forma, o alto conteúdo de carboidratos não disponíveis da FBV, representados pelo AR e FAT, possibilita sua utilização para suprir as recomendações diárias de FAT e ao mesmo tempo sinaliza o potencial deste ingrediente para promover a saúde intestinal.

Tabela 2. Fração não disponível (FND) (g/ 100 g amostra base integral e base seca) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral e base seca) da farinha de banana verde (FBV)

	FBV	
	Base integral	Base seca
Fração não disponível (FND)	69,18 ± 0,36	76,54 ± 0,40
FND Insolúvel	67,51 ± 0,35	74,69 ± 0,38
FND Solúvel	1,67 ± 0,01	1,85 ± 0,01
Valor energético (kJ/ 100 g)*	326	361

*Cálculo de energia: proteína (g) x 17, lipídios (g) x 37 e carboidrato por diferença (100 - (umidade + proteína + lipídios + cinzas + FND) x 17. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas de 3 lotes. Umidade: 10% (FBV).

De acordo com a definição de fração não disponível (FND) (SAURA-CALIXTO, 2006), a FND insolúvel é composta por amido resistente, fibra alimentar insolúvel, proteína resistente, taninos e outros; a FND solúvel é constituída de fibra alimentar solúvel, polissacarídeos solúveis e compostos bioativos associados. Na FBV (base seca), o maior conteúdo de FND (77%) em relação ao conteúdo total de carboidratos não disponíveis (71%) pode ser explicado pela presença de proteína resistente e de compostos bioativos associados à fibra que são quantificados conjuntamente na FND (MENEZES et al., 2004; SAURA-CALIXTO, 2006). O conteúdo de FND na FBV é similar ao

encontrado por Ovando-Martinez et al. (2009), com *Musa paradisiaca*, comercializada no México (77%).

A estrutura e morfologia dos grânulos de amido têm sido estudadas utilizando-se diferentes técnicas de microscopia, entre elas podemos destacar a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, microscopia de varredura confocal a laser, microscopia eletrônica de alta resolução e microscopia de força atômica (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

A microscopia da FBV foi realizada utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura, e está apresentada na **Figura 3 A e B**.

Na **Figura 3 A** é possível evidenciar que a FBV está quase totalmente composta por amido e parede celular. O material que aparece na superfície dos grânulos é constituído por restos de membrana do amiloplasto, que é o responsável por encapsular os grânulos de amido nas células da fruta. Aparentemente, os grânulos de amido estão intactos e sem fraturas, indicando que o processo utilizado na produção da FBV não foi drástico e preservou o elevado conteúdo de AR.

A **Figura 3 B** apresenta um grânulo de amido com aumento de 15.000 vezes. Como pode ser observado, as depressões na superfície do grânulo indicam que, apesar das frutas estarem em estágio de maturação I (verde), a degradação enzimática já havia sido iniciada. Este tipo de degradação parece ser típico de ataque de α -amilase ao grânulo, que é considerada a responsável por iniciar a degradação do grânulo de amido em bananas (PERONI, 2007).

A análise microbiológica da FBV foi realizada na FCF-USP (Laboratório de Microbiologia) e os três lotes analisados apresentaram boa qualidade microbiológica de acordo com ANVISA (2001). Estas análises garantem que a ingestão do produto desses lotes não proporciona dano à saúde desde que as amostras estejam adequadamente estocadas.

A

B

Figura 3. Microscopia eletrônica da farinha da polpa de banana verde (*Musa acuminata*, subgrupo Cavendish) seca a 55 °C.

4.1.2 Fermentação *in vitro* da FBV

Métodos de fermentação *in vitro* têm sido amplamente utilizados para estimar os possíveis efeitos fisiológicos de carboidratos não disponíveis como substrato para fermentação colônica (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

No presente trabalho, a fermentação *in vitro* foi realizada com inóculo de conteúdo cecal de ratos e os substratos utilizados foram sempre as frações não disponíveis (FND) das amostras.

Os parâmetros utilizados para avaliar a fermentação *in vitro* da FBV foram: variação de pH das amostras antes e depois do período de incubação (Δ pH); a pressão interna dos frascos contendo as amostras após incubação; a porcentagem de substrato que não foi fermentado mesmo após 24 h de incubação anaeróbia (RNF: resíduo não fermentado) e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

A pressão final e a variação de pH no início e no fim da fermentação *in vitro* da FBV, pectina e lactulose estão apresentadas na **Tabela 3**. A pectina foi analisada no presente trabalho para efeitos comparativos, uma vez que o amido resistente presente na FBV apresenta efeitos semelhantes aos da fibra alimentar solúvel.

A variação do pH para a lactulose (0,74) foi maior do que para os demais substratos. Este resultado já era esperado, pois a lactulose é quase totalmente fermentada durante o processo de fermentação *in vitro*, sendo utilizada como substrato referência de 100% de fermentabilidade (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). A FBV teve menor variação de pH (0,57) que a lactulose, mas semelhante à da pectina (0,63), que é uma fibra alimentar solúvel e de alta fermentabilidade. Os resultados próximos entre FBV e pectina são pertinentes, pois a FBV é formada por AR e também por FND solúvel (**Tabela 2**), portanto substrato semelhante ao da pectina. A pressão após 24 h de fermentação da FBV e pectina também foram semelhantes, mostrando que para estes dois parâmetros de fermentação, a FBV tem perfil próximo ao da pectina.

Tabela 3. Variação de pH e pressão final resultante da fermentação *in vitro* da fração não disponível da farinha de banana verde (FBV), pectina e lactulose

	pH			Pressão
	0 h	24 h	Δ	(psi)
Lactulose	6,80 $\pm$ 0,02	6,05 $\pm$ 0,06	0,74 ^a	8,50 $\pm$ 0,51 ^a
Pectina	6,77 $\pm$ 0,01	6,14 $\pm$ 0,01	0,63 ^b	7,47 $\pm$ 0,14 ^b
FBV	6,82 $\pm$ 0,01	6,25 $\pm$ 0,02	0,57 ^b	7,03 $\pm$ 0,13 ^b

Resultados expressos como média $\pm$ DP de triplicatas. Médias na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

Fermentabilidade é um termo que expressa a extensão da degradação do substrato por bactérias colônicas, sendo os resultados indexados em relação à lactulose (substrato referência de 100% de fermentabilidade). A fermentabilidade de carboidratos pode variar de 6 - 9% (celulose – fibra alimentar insolúvel) a 97% (pectina – fibra alimentar solúvel). Alta fermentabilidade, geralmente, se refere à grande produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) *in vitro* (TOPPING; CLIFTON, 2001). Outros parâmetros como pH, pressão e resíduo não fermentado, também são considerados indicadores de fermentabilidade, sendo conveniente o uso conjunto desses parâmetros para ampliar a confiabilidade do resultado (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Dessa forma, a fermentabilidade *in vitro* da FBV, expressa por diferentes parâmetros, em porcentagem de fermentabilidade em relação à lactulose, está apresentada na **Tabela 4**.

A FBV apresenta elevada fermentabilidade quando expressa por Δ pH, pressão e total de AGCC. Para estes parâmetros, a FBV teve uma variação na faixa de 77 a 83% e a pectina uma variação de 86 a 94%. Como as diferenças foram significantes, a FBV tem uma fermentabilidade elevada, mas um pouco menor que a da pectina ($p < 0,05$).

Tabela 4. Fermentabilidade *in vitro* da fração não disponível da farinha de banana verde (FBV) e pectina

	Fermentabilidade ^{a,f} (%)		
	Δ pH ^{b,e}	Pressão ^{c,e}	Total AGCC ^{d,e}
Pectina	85,59 $\pm$ 0,78 ^a	87,84 $\pm$ 1,68 ^a	94,16 $\pm$ 3,25 ^a
FBV	77,03 $\pm$ 2,34 ^b	82,75 $\pm$ 1,50 ^b	78,32 $\pm$ 2,34 ^b

^aCalculada tendo os valores da lactulose como referência (100%). ^b(média de pH 24h - média de pH 0h). ^cpressão em 24h. ^dsoma da produção de acetato, propionato e butirato. ^eResultados expressos como média $\pm$ DP de triplicatas. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$). ^fmédia de três fermentações.

A alta fermentabilidade da FBV é decorrente da elevada quantidade de AR (**Tabela 1**). O AR é o principal componente da fração não disponível (FND) que chega ao colón, sendo totalmente fermentado (ASP et al., 1994). A fermentação do AR pela microbiota intestinal proporciona inúmeros efeitos benéficos para o organismo (WONG et al., 2006; FÄSSLER et al., 2007), por exemplo, produtos da fermentação *in vitro* de AR 2 e 3 são capazes de inibir os estágios de iniciação e propagação do câncer de cólon *in vitro* (FÄSSLER et al., 2007; SCHARLAU et al., 2009). Paralelamente, a FBV contém moderada quantidade de fibra alimentar (8,61% b.s.), sendo que sua porção solúvel (cerca de 3%) é altamente fermentada (GRAY, 2006), colaborando para o elevado perfil de fermentabilidade.

Alguns estudos apontam o AR como sendo um dos componentes alimentares mais importantes na promoção da saúde do intestino grosso e, consequentemente, na diminuição do risco de doenças inflamatórias intestinais e câncer colorretal (NUGENT, 2005; SAJILATA et al., 2006) principalmente por ser melhor substrato para produção de butirato do que outras fontes de polissacarídeos não-amido (TOPPING; CLIFTON, 2001; MUIR et al., 2004). Outros trabalhos questionam o efeito butirogênico da fermentação do AR (CUMMINGS et al., 1996; WACKER et al., 2002).

Tabela 5. Proporção molar de AGCC produzidos na fermentação *in vitro* da lactulose e da fração não disponível da farinha de banana verde (FBV)

	Proporção molar ¹			AGCC totais ²
	Acetato	Propionato	Butirato	(mmol/ g substrato)
Lactulose	43,3 ± 6,9 ^a	18,2 ± 2,5 ^a	34,5 ± 5,4 ^a	4,11 ± 0,5 ^a
FBV	54,0 ± 3,2 ^b	27,9 ± 1,6 ^b	18,1 ± 0,6 ^b	3,22 ± 0,2 ^b

¹porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato. ²soma da produção de acetato, propionato e butirato. Resultados expressos como média ± DP. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

A produção total de AGCC em fermentações *in vitro* varia entre 0,4 - 14,2 mmol de AGCC por grama de substrato, dependendo do substrato. A proporção do butirato em relação aos outros dois principais AGCC produzidos na fermentação geralmente é de 12 - 36%, em substratos que consistem basicamente em AR, e 1 - 20%, em substratos contendo essencialmente FAT (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). Como pode ser observado na **Tabela 5**, a FBV apresentou proporção molar de butirato (18%) dentro da faixa citada por Cambrodón e Martin-Carrón (2001).

A maior parte da fração de carboidratos que chega ao cólon (carboidratos não disponíveis) é composta de amido resistente, que é fermentado quase totalmente (ASP et al., 1994; MUIR et al., 1994). A segunda maior fração é constituída de fibra alimentar. As fibras solúveis estão mais sujeitas à fermentação colônica, já as fibras insolúveis são apenas parcialmente fermentadas no intestino grosso e sua atuação é mais restrita ao aspecto físico, acelerando o trânsito intestinal pela absorção de água, aumentando a massa fecal e ligando-se a determinados nutrientes e compostos (PACHECO; SGARBIERI, 2001). De acordo com Ximenes et al. (2007), o propionato inibe a secreção de insulina induzida por glicose em células pancreáticas *in vitro*. Portanto, a elevada proporção molar de propionato produzida na fermentação *in vitro* da FBV é relevante, pois pode inibir a secreção de insulina e, portanto, evitar a sobrecarga das células β , o que poderia tornar a produção de insulina ineficiente e determinar um caso de resistência à insulina ou até mesmo diabetes tipo 2 (PRADHAN, 2007).

Os resultados expressos nas **Tabelas 3, 4 e 5** justificam a utilização da FBV em estudos de fermentação e avaliação de seus efeitos fisiológicos, devido à sua alta fermentabilidade. A FND da FBV se mostrou bastante fermentável, de acordo com todos os parâmetros avaliados.

4.2 Ensaio com animais

4.2.1 Perfil químico e nutricional das rações

As rações experimentais foram elaboradas objetivando uma ração controle (R-C), sem adição de AR, e uma ração experimental (R-FBV), contendo 5% de AR, proveniente da farinha de banana verde. A R-C foi elaborada de acordo com as determinações da AIN-93G. A R-FBV foi elaborada com parte dos carboidratos da AIN-93G substituídos por farinha de banana verde, que é um ingrediente com moderado conteúdo de fibra alimentar total (FAT) e elevada concentração de AR (**Tabela 1**). A **Tabela 6** apresenta a composição química das rações controle (R-C) e adicionada de farinha de banana verde (R-FBV).

Tabela 6. Composição química (g/ 100 g) e valor energético da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)

	R-C	R-FBV
Umidade	8,75 ± 0,15 ^a	9,62 ± 0,66 ^a
Cinzas	2,52 ± 0,12 ^a	2,64 ± 0,05 ^a
Lipídios	7,39 ± 0,22 ^a	6,88 ± 0,71 ^a
Proteínas	19,42 ± 1,28 ^a	18,17 ± 0,17 ^a
FAT	5,46 ± 0,15 ^a	5,56 ± 0,29 ^a
Carboidratos totais ¹	61,92	62,69
Valor energético (kJ/100g) ²	1656	1630

Resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP. Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$). FAT = Fibra alimentar total sem amido resistente. ¹Carboidratos totais calculados por diferença (100 - (Umidade + cinzas + lipídeos + proteínas)). ²Cálculo de energia (fator de Atwater): proteína (g) x 17, lipídios (g) x 37 e carboidratos (g) x 17.

De acordo com a **Tabela 6**, pode-se observar que as rações têm quantidades semelhantes de cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos totais. Além disso, fornecem valores energéticos semelhantes.

Como pode ser observado, apesar da FBV apresentar moderado conteúdo de FAT (sem AR) (8,6%, b.s.), a ração adicionada deste ingrediente (R-FBV) apresentou quantidade de fibra alimentar total semelhante à da ração controle (R-C).

As rações foram analisadas segundo o perfil de amido presente (amido total, amido resistente e amido disponível). Embora o conteúdo de carboidratos totais tenha sido semelhante nas duas rações, os tipos de amido são diferentes. Logo, o que difere as rações é a qualidade dos carboidratos, devido à adição de amido resistente proveniente da farinha de banana verde na R-FBV, como pode ser observado na **Tabela 7**.

Tabela 7. Conteúdo de amido resistente (AR), amido total (AT) e amido disponível (AD) da ração controle (R-C) e ração adicionada de FBV (R-FBV) (g/ 100 g)

	R-C	R-FBV
AT	32,16 ± 0,61 ^a	30,43 ± 0,68 ^b
AR	1,30 ± 0,12 ^a	4,63 ± 0,26 ^b
AD	30,86	25,80

Resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP.

Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

Os resultados obtidos comprovam que há maior quantidade de amido resistente na R-FBV em relação à R-C ($p < 0,05$), como esperado, devido à adição de FBV, que apresenta elevada concentração deste componente (aproximadamente 62 g/ 100 g, b.s.).

4.2.2 Fermentação *in vitro* das rações

Assim como foi feito na fermentação *in vitro* da farinha de banana verde (FBV), para caracterizar o perfil da fermentação *in vitro* das rações, sua fração não disponível (FND) foi isolada, fermentada e sua fermentabilidade foi avaliada considerando diferentes parâmetros.

Como pode ser observado na **Tabela 8**, a ração adicionada de FBV (R-FBV) apresentou maior variação de pH (0,44) e maior pressão (5,25) que a ração controle (R-C) (0,12 e 3,30, respectivamente) ($p < 0,05$), resultado o qual sugere maior produção tanto de AGCC como de gases (H_2 , CO_2 e CH_4) em seu processo de fermentação (FERGUSON et al., 2000).

Tabela 8. Variação de pH e pressão final resultante da fermentação *in vitro* da fração não disponível da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)

	pH			Pressão (psi)
	0 h	24 h	Δ	
R-C	6,96 $\pm$ 0,03	6,84 $\pm$ 0,04	0,12 ^a	3,30 $\pm$ 0,28 ^a
R-FBV	6,99 $\pm$ 0,03	6,55 $\pm$ 0,07	0,44 ^b	5,25 $\pm$ 0,35 ^b

Resultados expressos como média $\pm$ DP de triplicatas. Médias na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t Student, $p < 0,05$).

Tabela 9. Fermentabilidade *in vitro* da fração não disponível da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)

Fermentabilidade ^a (%)				
	Δ pH ^{b,f}	Pressão ^{c,f}	RNF ^d	Total AGCC ^{e,f}
R-C	20,22 $\pm$ 2,38 ^a	36,67 $\pm$ 3,14 ^a	19,04 $\pm$ 0,90 ^a	33,09 $\pm$ 2,76 ^a
R-FBV	74,16 $\pm$ 7,15 ^b	58,33 $\pm$ 3,93 ^b	23,42 $\pm$ 0,39 ^b	60,91 $\pm$ 3,26 ^b

^aCalculada tendo os valores da lactulose como referência (100%). ^b(média de pH 24h - média de pH 0h). ^cpressão em 24h. ^dresíduo não fermentado = 100 X (massa seca final de resíduo após a fermentação) / (massa seca inicial de amostra); ^esoma da produção de acetato, propionato e butirato. ^fResultados expressos como média $\pm$ DP de triplicatas. Médias na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

De acordo com as **Tabelas 8 e 9**, pode-se afirmar que as rações são fermentáveis e que os parâmetros de fermentabilidade Δ pH, pressão e RNF, assim como a produção total de AGCC, apontam para uma fermentabilidade crescente entre R-C e R-FBV.

Tabela 10. Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação *in vitro* da fração não disponível da ração controle (R-C) e ração adicionada de farinha de banana verde (R-FBV)

	Proporção Molar ¹			AGCC totais ²
	Acetato	Propionato	Butirato	(mmol/ g substrato)
R-C	57,7 ± 1,3 ^a	30,7 ± 4,8 ^a	11,7 ± 0,1 ^a	1,53 ± 0,29 ^a
R-FBV	56,3 ± 11,9 ^a	28,5 ± 6,2 ^a	15,2 ± 2,2 ^b	2,50 ± 0,13 ^b

¹porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato. ²soma da produção de acetato, propionato e butirato. Resultados expressos como média ± DP. Médias da mesma coluna apresentando diferentes letras apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

A **Tabela 10** apresenta as proporções molares entre acetato, propionato e butirato, e o total de AGCC produzidos (em mmol/ g de substrato fermentado). Pode-se observar que a R-FBV produziu maior proporção molar de butirato que a R-C ($p < 0,05$), podendo-se sugerir que a maior concentração de AR presente na R-FBV (**Tabela 7**) seja a responsável por essa maior produção de butirato.

A fermentação *in vitro* é um método bastante reprodutível, entretanto a falta de padronização dificulta comparações entre trabalhos (CUMMINGS et al., 1994).

Muir et al. (2004), em estudo de fermentação *in vitro* de AR e FAT, relatam que, embora a quantidade total de butirato produzida seja elevada nas fermentações de AR, nem sempre é notada diferença significativa na proporção molar dos AGCC totais produzidos.

Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* apontam o AR como melhor substrato para a produção de butirato do que outras fontes de polissacarídeos não amido (TOPPING; CLIFTON, 2001; NOAKES et al., 1996; MUIR et al., 2004), enquanto outros trabalhos questionam o efeito butirogênico da fermentação do AR (CUMMINGS et al., 1996; WACKER et al., 2002). Segundo Muir et al. (2004), FA e AR, os quais são fermentados no intestino grosso, produzem elevadas concentrações de butirato. Os resultados da fermentação *in vitro* são relevantes para que se faça uma previsão do possível resultado de uma fermentação *in vivo*, uma vez que estudos evidenciam que o butirato possa reduzir o risco de alterações malignas nas células do cólon (FUENTES-

ZARAGOZA et al., 2010; O'KEEFE et al., 2009). Estudos *in vitro* indicam que o butirato promove a proliferação de células normais da cripta, afetando a expressão de diversos genes relacionados ao câncer (JOHNSON, 2009; SCHEPPACH; BARTRAM; RICHTER, 1995), e pode estimular apoptose de células nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer (COMALADA et al., 2006; SERPA et al., 2010), como um mecanismo de prevenção da progressão desta doença.

4.2.3 Ensaio biológico: Parâmetros e efeitos avaliados

Durante todo o experimento, os animais ficaram divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de ração consumida:

- Grupo controle (Grupo C), contendo 24 animais, recebeu a ração controle (AIN-93G) (R-C);
- Grupo FBV (Grupo FBV), contendo 24 animais, recebeu ração controle com substituição do amido de milho por FBV, de forma a conter 5% de AR (R-FBV) (Quadro 1).

Foram avaliados periodicamente o peso corporal dos animais, o consumo de ração, e o peso e a umidade de fezes. Os animais passaram por 1 semana de adaptação às gaiolas metabólicas e à ração (em pó).

Ao término dessa primeira semana, deu-se início ao ensaio, com as rações experimentais, que teve duração de 4 semanas. Na última semana, os animais foram sacrificados para a coleta de material a ser analisado (sangue, conteúdo cecal e/ou tecidos).

4.2.3.1 Crescimento, consumo e peso e umidade das fezes

a) Crescimento

O peso dos animais foi verificado a cada 2 dias e a curva de crescimento durante os 28 dias de experimento pode ser observada no **Gráfico 1**.

Gráfico 1. Curva de crescimento dos animais do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 24 ratos/grupo.

De acordo com o **Gráfico 1**, o peso dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos, desde a primeira semana (semana de adaptação) até a última semana (semana de sacrifício). Portanto, a pequena diferença no valor energético das rações (**Tabela 6**), assim como o maior conteúdo de AR na R-FBV (**Tabela 7**), não interferiu no crescimento dos animais.

b) Consumo de ração

Gráfico 2. Consumo semanal de ração do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 24 ratos/grupo.

O consumo de ração pelos animais foi *ad libitum* e foi calculado diariamente durante os 28 dias de ensaio. O **Gráfico 2** apresenta as médias semanais de consumo de ração pelos animais dos dois diferentes grupos, e pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao consumo de ração. Esses resultados mostram que a introdução da FBV na ração (R-FBV) não afetou sua aceitação.

c) Peso e umidade das fezes

As fezes foram coletadas em *pool*, nos quatro primeiros dias de cada semana, para avaliação da umidade (**Gráfico 3**) e peso seco (**Gráfico 4**) ao longo do experimento.

Gráfico 3. Umidade de *pool* de fezes do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). $n = 24$ ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$).

Gráfico 4. Peso médio semanal de fezes secas (g/100 g de rato) do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). $n = 24$ ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$).

De acordo com o **Gráfico 3**, nota-se que as fezes dos animais do Grupo FBV, alimentados com ração contendo farinha de banana verde, apresentaram teor de umidade superior às do Grupo C ($p < 0,05$), a partir da segunda semana de ensaio. Este resultado é provavelmente devido à capacidade dos carboidratos não disponíveis presentes na ração FBV de proporcionar maior retenção de água no cólon e, consequentemente, aumentar a umidade das fezes, o que pode causar aumento na velocidade do trânsito intestinal. Além disso, o Gráfico 4 apresenta também superior peso seco das fezes do Grupo FBV em relação ao Grupo C, demonstrando possível aumento da massa

bacteriana nas fezes deste grupo, devido à maior fermentação da R-FBV, como foi observado previamente (**Tabelas 9 e 10**).

Resultados semelhantes foram encontrados por Hylla *et al.* (1998), que observaram aumento significativo de 49% no peso úmido e 56% no peso seco das fezes de indivíduos saudáveis que ingeriram dietas com alto teor de AR por quatro semanas. Paralelamente, diversos estudos mostram associação positiva entre aumento dos pesos úmido e seco de fezes e redução do risco de câncer de cólon (FAIVRE; BOUTRON; QUIPOURT, 1993; CASSIDY; BINGHAM; CUMMINGS, 1994).

A **Tabela 11** apresenta um resumo dos resultados observados com relação aos seguintes parâmetros avaliados no ensaio com animais: peso corporal, consumo de ração e peso das fezes.

Tabela 11. Parâmetros nutricionais e peso e umidade das fezes dos animais do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV)

Parâmetros	Grupo C	Grupo FBV
Peso corporal inicial (g)	96,3 ± 11,4 ^a	99,9 ± 12,5 ^a
Peso corporal final (g)	186,9 ± 15,2 ^a	193,9 ± 10,3 ^a
Consumo de ração (g/ dia)	15,7 ± 1,8 ^a	15,8 ± 1,7 ^a
Umidade das fezes (%)		
Inicial*	17,3 ± 3,6 ^a	22,8 ± 6,7 ^a
Final**	19,0 ± 2,4 ^a	27,9 ± 3,7 ^b
Peso seco das fezes (g/ 100g peso corporal)		
Inicial*	1,9 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,6 ^a
Final**	3,7 ± 0,4 ^a	4,9 ± 0,3 ^b

Resultados expressos como média ± DP. *resultados da primeira semana de ensaio.

**resultados da última semana de ensaio. Médias da mesma linha com diferentes letras apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

4.2.3.2 GTT

Com os valores encontrados de glicose e insulina sanguíneas, foram construídas curvas glicêmicas e insulínicas, de 0 a 60 min, como apresentado no **Gráfico 5**.

Gráfico 5. Curvas de concentração de glicose (mmol/ L) (A) e insulina (ng/ mL) (B) do teste de tolerância à glicose (GTT) de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$).

Observando o **Gráfico 5**, verifica-se que houve uma menor liberação de insulina para a manutenção de um mesmo nível de glicose sanguínea no Grupo FBV, em comparação ao Grupo C, nos tempos 15, 20 e 30 min ($p < 0,05$).

Uma vez que o AR passa intacto pelo intestino delgado, sendo fermentado no intestino grosso, seu consumo implica na redução da resposta glicêmica pós-prandial e, conseqüentemente, em uma redução na secreção de insulina (SAJILATA et al., 2006). Evidências epidemiológicas demonstram que o consumo de alimentos com estas características tem grande potencial na diminuição do risco de diabetes tipo 2 (SALMERÓN et al., 1997; ROBERTSON et al., 2002) e na resistência à insulina (McKEOWN et al., 2004).

Dados epidemiológicos da última década demonstram que o risco de câncer de cólon é elevado naqueles indivíduos que apresentam resistência à insulina e diabetes tipo 2 (LARSSON; ORSINI; WOLK, 2005; SEOW et al., 2006; ELWING et al., 2006; AHMED et al., 2006). Levando-se em consideração os resultados de fermentação *in vitro* (**Tabela 9**) do presente trabalho, é importante salientar que, não apenas porque o AR apresenta baixa resposta glicêmica e insulinêmica, mas também porque é altamente fermentável e produz elevadas concentrações de butirato (**Tabela 10**) (considerado principal fonte de energia para os colonócitos), adicioná-lo como ingrediente, em refeições ou preparações, pode ajudar na redução da secreção de insulina (NUGENT, 2005), assim como contribuir para a diminuição do risco de câncer de cólon (GIOVANNUCCI, 2007).

4.2.3.3 Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas

Objetivando avaliar o efeito da FBV, consumida por 28 dias, sobre a secreção de insulina, 5 animais de cada grupo foram sacrificados para o isolamento das ilhotas pancreáticas. Soluções de diferentes concentrações de glicose (5,6 mM e 16,7 mM) foram injetadas no meio contendo as ilhotas, e a produção-resposta de insulina foi quantificada. Os resultados estão apresentados no **Gráfico 6**.

Gráfico 6. Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas (pg/ilhota), incubadas com diferentes concentrações de glicose (5,6 e 16,7 mM), de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). n = 5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$).

Assim como nos resultados discutidos sobre o GTT, pode-se observar no **Gráfico 6** que ocorreu uma menor secreção de insulina no Grupo FBV em comparação ao Grupo C, em resposta a doses crescentes de glicose, mostrando que a ração contendo 5% de AR proveniente da FBV possivelmente interfere na liberação de insulina. Assim, o consumo de AR poderia ser uma alternativa para diminuição do risco de resistência à insulina ou mesmo diabetes tipo 2, uma vez que seu consumo gera menor secreção de insulina.

4.2.3.4 Fermentação *in vivo* e características cecais

Uma vez que o principal local de fermentação em espécies não ruminantes é o ceco (LE BLAY et al., 1999), este compartimento do intestino grosso foi o local escolhido para os estudos de avaliação dos parâmetros fermentativos e histológicos, após o consumo das rações experimentais.

Ao final dos 28 dias de ensaio, o ceco de 5 animais por grupo foi delimitado e removido. Imediatamente, o ceco foi pesado, o pH do conteúdo cecal foi medido, o conteúdo cecal foi removido e congelado (para quantificação de AGCC) e a parede cecal foi pesada, a qual foi tratada para elaboração das lâminas histológicas.

O peso do ceco com conteúdo, o peso da parede cecal e o peso do conteúdo cecal (por diferença) estão apresentados na **Tabela 12**. As características cecais apresentadas nessa tabela e no **Gráfico 7**, a seguir, confirmam a intensidade da fermentação colônica.

Tabela 12. Peso de diferentes partes do ceco de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV)

Parâmetros intestinais (g/100g peso corporal)	Grupo C	Grupo FBV
Ceco completo (parede + conteúdo cecal)	1,70 ± 0,11 ^a	4,6 ± 0,43 ^b
Parede cecal	0,40 ± 0,01 ^a	1,1 ± 0,04 ^b
Conteúdo cecal	1,31 ± 0,10 ^a	3,5 ± 0,40 ^b

Resultados expressos como média ± DP. Médias da mesma linha apresentando letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).
n = 5 ratos/grupo.

Os carboidratos não disponíveis exercem papel importante no desenvolvimento da mucosa do intestino grosso, principalmente devido à produção de AGCC resultante da fermentação colônica (WONG et al., 2006). Estudos mostram que os AGCC em geral, produzidos na fermentação, estimulam o crescimento das células mucosas quando administrados intraperitonealmente ou diretamente no cólon (KRIPKE et al., 1989; LIU; XU, 2008; TOPPING; CLIFTON, 2001), o que pode explicar, no presente trabalho, o maior peso da parede cecal dos animais do Grupo FBV (1,1 g/ 100 g peso corporal), se comparado ao Grupo C (0,40 g/ 100 g peso corporal), cuja ração apresentou maior fermentabilidade *in vitro* (**Tabelas 8 e 9**) e, portanto, maior produção de AGCC (**Tabela 10**). O maior peso do conteúdo cecal dos animais do Grupo FBV corrobora com os resultados referentes à umidade das fezes, a qual foi, em média, maior nos animais do Grupo FBV (26,4%) se comparado ao Grupo C (17,7%) ($p < 0,05$) (**Gráfico 3**).

Lobo et al. (2007) observaram aumento do peso da parede do ceco de ratos, assim como de seu conteúdo, após o consumo por 27 dias de ração contendo carboidratos não disponíveis provenientes de yacón. Dehghan-Kooshkghazi e Mathers (2004) observaram um aumento significativo de quase 5 vezes, em massa, do ceco de animais alimentados por 21 dias com ração contendo acarbose, cuja função é suprimir a digestão de amido no intestino delgado através da inibição da α -glicosidase, fazendo com que este amido chegue intacto ao intestino grosso, onde é fermentado. Os autores sugerem que esse aumento em massa tenha acontecido devido à maior produção de butirato pelas bactérias colônicas, o qual é rapidamente oxidado pelos colonócitos e é considerado sua principal fonte de energia (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; SCHARLAU et al., 2009).

O pH do conteúdo cecal, o qual é considerado um resultado indireto da produção de AGCC, pode ser verificado no **Gráfico 7**.

Gráfico 7. pH do conteúdo cecal de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV). Valores expressos como média $\pm$ DP. $n = 5$ ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos (Test t de Student, $p < 0,05$).

Como apresentado no **Gráfico 7**, o pH cecal diminuiu aproximadamente 1,0 unidade no Grupo FBV se comparado ao Grupo C. O pH cecal de ratos costuma variar de 6,1 a 8,2 de acordo com a dieta administrada, ou seja, ratos alimentados com carboidratos não disponíveis, que são fermentados no intestino grosso, chegam a ter o pH cecal reduzido em até 2 unidades (CHOCT et al., 1998; TOPPING; CLIFTON, 2001).

Em um estudo com ratos alimentados por 4 semanas com preparações contendo AR, pesquisadores observaram que maior produção de AGCC, e consequentemente menor pH cecal, estão associados com diminuição da incidência de câncer de cólon (FERGUSON et al., 2000).

Paralelamente, a diminuição no pH intestinal pode favorecer a eliminação de metabólitos nocivos à saúde intestinal (LUPTON, 2000; WONG et al., 2006), prevenir a colonização por bactérias patogênicas, tais como *Clostridium perfringens* (BOUHNİK et al., 2004), sem afetar o crescimento de bactérias benéficas, como as bifidobactérias (TIMM et al., 2010), além de aumentar a absorção de certos minerais, como cálcio e magnésio (HOLLOWAY et al., 2007).

Tabela 13. Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em relação ao total produzido no ceco de ratos do grupo controle (Grupo C) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV)

	Acetato	Propionato	Butirato	AGCC totais (mmol/ g conteúdo cecal)
Grupo C	69,51 ± 8,26 ^a	22,84 ± 5,37 ^a	7,64 ± 1,26 ^a	102,28 ± 20,24 ^a
Grupo FBV	73,13 ± 12,81 ^a	14,84 ± 3,29 ^a	12,01 ± 2,97 ^b	220,33 ± 31,63 ^b

Resultados expressos como média ± DP. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$). n = 5 ratos/grupo

A **Tabela 13** apresenta as proporções molares de cada AGCC produzido na fermentação *in vivo*, assim como a concentração total dos AGCC (mmol/ g de conteúdo cecal). Observa-se que houve diferença significativa entre os grupos no que se refere à proporção molar apenas de butirato, que foi maior no Grupo FBV ($p < 0,05$). É importante salientar que o butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos (CAMBRODÓN; MARTÍN-CARRÓN, 2001), e diversos estudos associam uma produção elevada deste AGCC à proteção contra câncer de cólon (DRONAMRAJU et al., 2009; JOHNSON 2009; O'KEEFE et al., 2009).

Comparando-se as proporções molares dos AGCC produzidos na fermentação *in vivo* (**Tabela 13**) com a fermentação *in vitro* (**Tabela 10**), observa-se que para os dois modelos utilizados, a proporção molar de acetato foi a predominante, seguida de propionato e, finalmente, de butirato. Além disso, nota-se que em ambos os modelos de fermentação, houve aumento na proporção molar de butirato na ração contendo FBV (R-FBV) e no ceco do Grupo FBV (**Tabelas 10 e 13**, respectivamente), se comparados com a ração controle (R-C) e ao ceco do Grupo C. Esses resultados demonstram que o amido resistente presente na FBV (5% b.s.) (**Tabela 7**) é um substrato fermentável e butirogênico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

O butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos, como foi dito anteriormente, e é importante salientar que o acetato também está envolvido com o crescimento e proliferação de células normais do epitélio colônico, sendo absorvido e transportado ao fígado para utilização periférica

como fonte de energia e com funções estruturais na síntese de AGCC (CAMBRODÓN; MARTÍN-CARRÓN, 2001).

Com relação à produção total de AGCC, o Grupo FBV apresentou maior concentração de AGCC totais do que o Grupo C ($p < 0,05$), confirmando as indicações de maior fermentabilidade *in vitro* observadas na R-FBV (**Tabela 9**).

De acordo com estudos de fermentação *in vivo* (MUIR et al., 2004), a expressão da produção de AGCC em proporção molar é apontada como melhor indicador de mudanças no perfil de fermentação dos que valores brutos de AGCC quantificados, uma vez que mais de 95% dos AGCC produzidos são rapidamente absorvidos pelo cólon (NOAKES et al., 1996).

4.2.3.5 Efeito trófico no ceco

Os carboidratos não disponíveis e fermentáveis aplicam seus efeitos fisiológicos no intestino grosso através de diversos mecanismos, exercendo um papel importante no desenvolvimento da mucosa, característica que tem sido atribuída aos AGCC produzidos a partir da sua fermentação (SCHEPPACH; BARTRAM; RICHTER, 1995). A análise morfométrica do ceco foi realizada através de contagens do número total de células da cripta e de criptas bifurcadas. Além disso, a profundidade das criptas foi medida e os resultados estão apresentados em μm . Para avaliação da proliferação celular, foi calculado o índice metafásico (IM), que consiste na porcentagem de células metafásicas em relação ao total de células contadas, assim como a distribuição das metáfases ao longo da cripta.

Como pode ser observado na **Figura 4**, os resultados de morfometria, assim como os de proliferação celular do tecido do ceco dos animais, apontam para um estímulo trófico provocado pelo consumo da ração com FBV (Grupo FBV).

Figura 4. Imagens de cortes histológicos do ceco de ratos do grupo controle (Grupo C) (1) e grupo farinha de banana verde (Grupo FBV) (2). Coloração H&E. Aumento 40x. Setas indicam células metafásicas. Gráficos: (A) Índice metafásico (%); (B) número de células por cripta; (C) profundidade das criptas (μm). Valores expressos como média ± DP. n = 5 ratos/grupo. *diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) (Teste t de Student).

Os animais do Grupo FBV apresentaram maior índice metafásico ($5,27 \pm 0,36\%$) que os do Grupo C ($4,36 \pm 0,25\%$) ($p < 0,05$), o que indica maior divisão celular no tecido cecal desses animais (**Figura 4 (A)**). Também foi observado que o Grupo FBV teve um aumento ($p < 0,05$) no número de células por cripta, se comparado ao Grupo C ($78 \pm 6,6$ e $60 \pm 2,7$, respectivamente) (**Figura 4 (B)**), resultado que corrobora com o maior IM no grupo que consumiu ração

com FBV. Paralelamente, foi observada maior profundidade ($p < 0,05$) nas criptas do Grupo FBV em relação ao Grupo C ($117,2 \pm 11,8 \mu\text{m}$ e $98,4 \pm 3,5 \mu\text{m}$, respectivamente) (**Figura 4 (C)**).

Esse efeito trófico observado no ceco dos animais alimentados com a ração contendo FBV, com 5% de amido resistente (**Tabela 7**), está de acordo com o aumento, em massa, observado na parede cecal dos animais desse mesmo grupo (**Tabela 12**).

Lobo et al. (2007), em um estudo com ratos alimentados por 27 dias com ração contendo carboidratos não disponíveis, observaram significativo aumento ($p < 0,05$) no número e profundidade das criptas do ceco dos animais. Outros estudos também demonstraram alterações na profundidade das criptas cecais, assim como no número de células da cripta de ratos, após consumo de carboidratos não disponíveis e fermentáveis (RÉMÉSY et al., 1993; HOWARD et al., 1995).

Em estudo com ratos, realizado por Lupton e Kurtz (1993), verificando a relação entre a produção de AGCC, pH e morfometria celular, foi utilizada a pectina como fonte de carboidrato não disponível e fermentável. A dieta suplementada com pectina provocou aumento aproximado de 15% na altura das criptas do ceco, demonstrando a correlação existente entre ácidos graxos de cadeia curta, especificamente o butirato, e a proliferação celular.

Hedemann; Theij e Knudsen (2009) observaram aumento de aproximadamente 60% na espessura da camada mucosa do ceco de animais alimentados com ração contendo AR, em relação àqueles alimentados com ração sem qualquer tipo de fibra alimentar. Segundo Brunsgaard (1998), o aumento na espessura da camada mucosa do ceco ocorre principalmente devido a um aumento na profundidade das criptas, o que é um fator importante para a manutenção da saúde intestinal. Ainda, Hedemann; Theij e Knudsen (2009) observaram correlação positiva entre produção de AGCC e aumento na espessura da camada mucosa, resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho, onde os animais alimentados com ração contendo 5% de AR (Grupo FBV) apresentaram maior produção de AGCC totais em relação ao grupo controle (**Tabela 13**) e também maior profundidade das criptas (**Figura 4 (C)**).

Além da proliferação celular nas criptas, a investigação de sua localização ao longo da cripta é de extrema importância, uma vez que a proliferação de colonócitos considerada normal acontece na região basal da cripta, enquanto a hiperproliferação celular na região apical é considerada um biomarcador de neoplasias (SCHEPPACH; BARTRAM; RICHTER, 1995). Segundo esses mesmos autores, os AGCC produzidos na fermentação colônica estimulam a proliferação celular apenas na região basal da cripta.

No presente trabalho, também foi avaliada a distribuição da proliferação celular ao longo das criptas. Não foi observada diferença significativa entre o Grupo C e o Grupo FBV, porém, em ambos os grupos, mais de 80% da proliferação celular ocorreu na base da cripta (Grupo C = $83,97 \pm 2,86\%$ e Grupo FBV = $88,26 \pm 5,00\%$), o que demonstra que o consumo de ração com FBV não provocou migração da proliferação celular para o compartimento apical da cripta, mantendo a proliferação normal dos colonócitos. Este resultado está de acordo com o resultado encontrado por Perrin et al. (2001), em um estudo com ratos alimentados por 44 dias com rações contendo AR tipo 3. Os autores observaram que o consumo de AR não alterou a região de proliferação celular do ceco dos animais, que se manteve no compartimento basal. Segundo McCullough et al. (1998), a produção de novas criptas através da bifurcação pode ser considerada uma maneira complementar para o controle da massa tecidual no intestino, porém, no presente trabalho, não foi observada diferença significativa na formação de novas criptas. Ambos os Grupos C e FBV apresentaram, em média, 1 cripta bifurcada a cada 2 campos analisados.

Os resultados microscópicos de morfometria e proliferação celular apresentados foram previstos, indiretamente, pelos parâmetros macroscópicos avaliados previamente no ceco dos animais. Como esperado, considerando-se o maior peso da parede do ceco dos animais do Grupo FBV, foi observado, microscopicamente, aumento do número de células e profundidade das criptas dos animais desse mesmo grupo, em comparação aos do Grupo C.

Com as observações realizadas nas análises histológicas, ficou evidente que a ração contendo FBV provocou um efeito trófico no ceco dos animais, o que está de acordo com a maior produção de AGCC por essa ração tanto *in*

vitro (**Tabelas 9 e 10**) como *in vivo* (**Tabela 13**), principalmente de butirato, que é considerado a principal fonte de energia para os colonócitos normais (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRON, 2011).

4.3 Ensaio com humanos

4.3.1 Perfil químico e nutricional das refeições congeladas

As **Tabelas 14 e 15** apresentam os resultados da composição química e dados referentes à fração não disponível (FND) das refeições estudadas (RC e RF). O conteúdo energético das duas refeições foi calculado considerando os valores de carboidratos disponíveis por soma e os valores de carboidratos disponíveis calculados por diferença (utilizando os valores de FND ou de FAT).

Tabela 14. Composição química (g/ 100 g amostra base integral) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral) das refeições controle (RC) e RC adicionada de farinha de banana verde (RF)

	Refeições	
	RC	RF
Umidade	77,13 ± 0,17 ^a	76,25 ± 0,20 ^a
Proteína	5,51 ± 0,50 ^a	5,49 ± 0,50 ^a
Cinzas	1,73 ± 0,04 ^a	1,74 ± 0,04 ^a
Lipídios	2,46 ± 0,14 ^a	2,41 ± 0,13 ^a
Glicose	0,29 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,01 ^a
Frutose	0,36 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,01 ^a
Sacarose	0,21 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^a
Açúcares solúveis totais	0,86	0,87
Amido total	6,12 ± 0,10 ^a	7,33 ± 0,12 ^b
Amido disponível	5,55	5,68
Amido resistente (AR)	0,57 ± 0,03 ^a	1,65 ± 0,09 ^b
Fibra alimentar total (FA) (sem AR e Fr)	1,82 ± 0,03 ^a	1,94 ± 0,02 ^b
Frutanos (Fr)	0,42 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^a
Carboidratos não disponíveis totais (FA, AR, Fr)	2,81	4,01
Valor energético (kJ/ 100 g)*	293	294

*Cálculo de energia (fator de Atwater): proteína (g) x 17, lipídios (g) x 37 e carboidratos (soma de amido disponível e açúcares solúveis) x 17. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas de 3 lotes. Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

A RC (b.i.) é hiperproteica e contém valor energético de 293 kJ/ 100 g; apresenta moderado conteúdo de FA (1,82%), uma vez que esta refeição é constituída de macarrão produzido com farinha de trigo integral, proteína texturizada de soja e vegetais.

Com relação à composição química, a adição da FBV proporcionou diferença significativa entre as refeições (RC e RF) para as concentrações de AR, FA e amido total. A RF passou a ter uma concentração aproximadamente três vezes maior de AR do que a RC, uma vez que a FBV contém elevada

concentração deste componente (56% b.i.). A concentração de FA é maior na RF devido à elevada concentração deste componente na FBV (7,8% b.i.). Assim, o total de carboidratos não disponíveis (FA + AR + frutanos) na RF é 30% maior em relação à RC. O aumento de amido total na RF já era esperado em função do aumento de AR proveniente da FBV.

Na **Tabela 15**, observa-se que a fração não disponível (FND) das refeições é superior ao conteúdo total de carboidratos não disponíveis calculado pela soma de FA, AR e frutanos (**Tabela 14**). Estas diferenças são pertinentes uma vez que a FND é formada por vários componentes, como compostos nitrogenados (proteínas resistentes, ureia, enzimas) e outros (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991; SAURA-CALIXTO, 2006).

Tabela 15. Fração não disponível (FND) (g/ 100 g amostra base integral) e valor energético (kJ/ 100 g amostra base integral) das refeições controle (RC) e RC adicionada de farinha de banana verde (RF)

	Refeições	
	RC	RF
Fração não disponível	5,63 ± 0,20 ^a	6,88 ± 0,30 ^b
FND insolúvel	3,99 ± 0,16 ^a	5,23 ± 0,26 ^b
FND solúvel	1,64 ± 0,06 ^a	1,64 ± 0,05 ^a
Valor energético (kJ/100 g)*	313	305

*Cálculo de energia: proteína (g) x 17, lipídios (g) x 37 e carboidrato por diferença (100 – (umidade + proteína + lipídios + cinzas + FND) x 17. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas de 3 lotes. Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t Student, $p < 0,05$). Umidade: 77% (RC); 76% (RF).

Os valores de energia (base integral) da RC e RF são similares tanto utilizando a estimativa de carboidrato disponível realizada pela soma de amido disponível e de açúcares solúveis (**Tabela 14**) como pelo cálculo de carboidratos disponíveis por diferença, utilizando a fração não disponível (100 - (umidade + proteína + lipídios + cinzas + FND) (**Tabela 15**), resultando em uma refeição com apenas 294 kJ/ 100 g. Entretanto, os valores de energia para as refeições ficam superestimados (RC - 378 kJ, RF - 389 kJ) se a estimativa de

carboidrato disponível for feita por diferença (100 - (umidade + proteína + lipídios + cinzas + FA) conforme indicação para rotulagem de alimentos.

A fração não disponível (SAURA-CALIXTO, 2006) pode ser fermentada pela microbiota intestinal e provocar inúmeros efeitos fisiológicos, tanto locais como sistêmicos (GRAY, 2006; BUTTRISS; STOKES, 2008). No presente estudo, como RF é rica em amido resistente (AR), o qual tem elevada fermentabilidade, evidenciada *in vitro* no presente trabalho, na literatura (HERNOT et al., 2009) e *in vivo* (MENEZES et al., 2010a), espera-se que a adição de FBV em refeição represente um modelo alternativo para estimular a ingestão de FA e AR e consequentemente proporcionar saúde intestinal.

4.3.2 Perfil de fermentação *in vitro* das refeições congeladas

Assim como foi feito na fermentação *in vitro* da FBV e das rações, a fermentação *in vitro* das refeições congeladas foi realizada com inóculo de conteúdo cecal de ratos e os substratos foram as frações não disponíveis (FND) da refeição controle (RC) e RC adicionada de FBV (RF), além da lactulose e da pectina.

Os resultados da variação de pH no início e no final da fermentação da RC, RF, pectina e lactulose estão apresentados na **Tabela 16**.

O pH ao início da fermentação foi praticamente o mesmo entre as amostras e, após 24 horas de fermentação, devido à formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e outros metabólitos, o pH ficou mais baixo do que o inicial. Para lactulose e pectina, a variação do pH foi de 0,74 e 0,63, respectivamente. Para as refeições, a variação foi reduzida à metade (RC de 0,28 e RF de 0,32), indicando menor fermentação, de acordo com este parâmetro.

Tabela 16. Variação de pH e pressão resultantes da fermentação *in vitro* da fração não disponível da refeição controle (RC), refeição adicionada de farinha de banana verde (RF), lactulose e pectina

	pH		Δ pH	Pressão (psi)
	0 h	24 h		
Lactulose	6,80 $\pm$ 0,02	6,05 $\pm$ 0,07	0,74	8,50 $\pm$ 0,51
Pectina	6,77 $\pm$ 0,01	6,14 $\pm$ 0,01	0,63	7,47 $\pm$ 0,14
RC	6,81 $\pm$ 0,01	6,54 $\pm$ 0,01	0,28	5,50 $\pm$ 0,17
RF	6,81 $\pm$ 0,01	6,48 $\pm$ 0,00	0,32	6,17 $\pm$ 0,28

Resultados expressos como média $\pm$ DP de triplicatas.

A pressão final, decorrente da produção de AGCC, é proporcional ao grau de fermentação do substrato. Como pode ser observado na **Tabela 16**, a pressão variou de 5,50 a 8,50, sendo maior a produzida pela lactulose, intermediária para pectina e menor para as refeições.

Para avaliar a fermentabilidade *in vitro* das refeições (RC e RF), os resultados dos parâmetros avaliados na fermentação foram indexados em relação à lactulose (considerada substrato referência de 100% de fermentabilidade) (**Tabela 17**).

Tabela 17. Fermentabilidade *in vitro* da fração não disponível da refeição controle (RC) e refeição adicionada de farinha de banana verde (RF)

Fermentabilidade ^a (%)				
	Δ pH ^{b,f}	Pressão ^{c,f}	RNF ^{d,f}	Total AGCC ^e
RC	37,39 $\pm$ 0,78 ^a	64,71 $\pm$ 2,00 ^a	52,45 $\pm$ 0,91 ^a	40,70 $\pm$ 1,51 ^a
RF	43,92 $\pm$ 0,96 ^b	72,55 $\pm$ 3,40 ^b	56,35 $\pm$ 2,23 ^b	44,90 $\pm$ 1,67 ^b

^aCalculada tendo os valores da lactulose como referência (100%). ^b(média de pH 24h - média de pH 0h). ^cpressão em 24h. ^dporcentagem de resíduo não-fermentado (RNF) = 100 X (massa seca final de resíduo após a fermentação) / (massa seca inicial de amostra).

^esoma da produção de acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato e valerato,

^fResultados expressos como média $\pm$ DP de triplicatas. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

A fermentabilidade das refeições, expressa pelo total de AGCC, variou de 41% a 45%. A RF (adicionada de FBV) teve maior fermentabilidade que a RC ($p < 0,05$), mostrando que a FBV (8 g/ 400 g refeição) alterou o perfil de

fermentação *in vitro*, o que sugere uma possível alteração também na fermentação *in vivo*. Este efeito deve-se ao perfil de carboidratos não disponíveis presente na FBV (**Tabelas 1 e 2**), os quais são de elevada fermentabilidade (**Tabela 4**).

Essa tendência de maior fermentabilidade da RF em relação à RC foi observada também para variação de pH, pressão e RNF ($p < 0,05$). Esses três parâmetros adicionais servem para confirmar a superior fermentabilidade da RF. Apesar da RC já ser constituída de moderado conteúdo de FAT (**Tabela 14**), a FBV, em pequena quantidade em relação ao total da refeição (400 g de refeição adicionada de 8 g de FBV), foi fermentada pela microbiota colônica, proporcionando significativa fermentabilidade.

Dessa forma, a fermentabilidade da RF (refeição adicionada de FBV), expressa pela pressão, Δ pH, RNF e AGCC, é maior que a da refeição RC ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a adição de FBV a outros produtos proporciona aumento significativo na fermentabilidade *in vitro*, sugerindo seu potencial para fermentar *in vivo*.

Tabela 18. Proporção molar de AGCC produzidos na fermentação *in vitro* da fração não disponível da refeição controle (RC) e refeição adicionada de FBV (RF)

	Proporção Molar ¹			AGCC totais ²
	Acetato	Propionato	Butirato	(mmol/ g substrato)
RC	52,6 $\pm$ 4,6 ^a	32,3 $\pm$ 6,1 ^a	15,2 $\pm$ 4,1 ^a	1,67 $\pm$ 0,07 ^a
RF	54,3 $\pm$ 1,2 ^a	29,3 $\pm$ 3,6 ^a	17,6 $\pm$ 6,6 ^b	1,85 $\pm$ 0,08 ^b

¹porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato. ²soma da produção de acetato, propionato e butirato. Resultados expressos como média $\pm$ DP. Médias da mesma coluna apresentando diferentes letras apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

A **Tabela 18** apresenta as proporções molares de cada AGCC produzido na fermentação *in vitro* das refeições, assim como a concentração total dos AGCC (mmol/ g de substrato). Assim como apresentado na **Tabela 17**, observa-se que houve maior produção de AGCC totais na fermentação da RF (1,85 mmol/ g de substrato) se comparado à RC (1,67 mmol/ g de substrato). Além disso, houve diferença significativa entre a RC e a RF quanto à proporção molar de butirato, que foi maior na RF ($p < 0,05$). Esse resultado é semelhante

ao observado na fermentação *in vitro* das rações (**Tabela 10**), onde a R-FBV produziu maior concentração de AGCC totais, assim como maior proporção molar de butirato em relação à R-C. É importante salientar que diversos estudos associam uma produção elevada de AGCC, principalmente butirato, à proteção contra câncer de cólon (DRONAMRAJU et al., 2009; JOHNSON, 2009; O'KEEFE et al., 2009).

4.3.3 Capacidade antioxidante da farinha de banana verde (FBV) e refeições congeladas

Os alimentos, principalmente os de origem vegetal, contêm compostos antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres. Dados experimentais e observacionais sugerem fortemente que o consumo habitual de frutas e vegetais reduz o estresse oxidativo (JOSHIPURA et al., 2001).

Conforme já mencionado, a fração não disponível (FND) (SAURA-CALIXTO, 2006) é composta por amido resistente, fibra alimentar insolúvel, proteína resistente, taninos e outros (FND insolúvel) e por polissacarídeos solúveis e compostos bioativos associados (polifenóis, carotenóides e outros) (FND solúvel). Por exemplo, fibra da pele de manga, de abacaxi, lima e polpa de goiaba apresentam alta capacidade antioxidante (SAURA-CALIXTO; JIMÉNEZ-ESCRIG, 2001; SAURA-CALIXTO, 2006).

Em 2009, Goñi et al. mostrou que quantidade significativa de compostos polifenólicos estão associados à fibra (tanto na FND insolúvel como na FND solúvel), os quais contribuem de forma significativa na capacidade antioxidante das frutas e vegetais, além de serem substratos fermentáveis para a microbiota. Para frutas (base seca), a FND insolúvel (23%) contém 1,56% de compostos fenólicos associados; para os vegetais, a FND insolúvel (34%) contém 0,43% e, para os cereais, 9,5% e 0,24%, respectivamente. Na FND solúvel também há significativa associação de compostos fenólicos, porém em menor proporção.

Avaliando o conteúdo de FND insolúvel (base seca), este é de 75% na FBV, 17% na RC e 22% na RF. O conteúdo de FND insolúvel na FBV é bem superior aos de frutas e vegetais e até do farelo de trigo (42%) e de polpa de maçã (48%) (SAURA-CALIXTO, 2006), pois se trata de um concentrado de banana verde, e a RF apresentou valor próximo ao das frutas como relatado por Goñi et al. (2009). Em função da elevada FND insolúvel e da presença de compostos fenólicos e de atividade antioxidante na FBV, foi decidido avaliar o potencial antioxidante desta farinha e das refeições.

Existe uma ampla variedade de métodos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante de substâncias isoladas ou de um alimento. Todos os ensaios, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, possuem vantagens e desvantagens. É importante considerar que não existe um método universal simples pelo qual a capacidade antioxidante possa ser mensurada de forma precisa (NIKI, 2001). Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com mecanismo de ação diferente (MELO et al., 2006).

Os três métodos (capacidade sequestrante do DPPH, capacidade de absorção do radical oxigênio (*oxygen radical absorbance capacity* - ORAC) e capacidade redutora do Folin-Ciocalteu) utilizados para quantificar a capacidade antioxidante da FBV e das refeições apresentaram elevados coeficiente de correlação de Pearson (Folin-Ciocalteu x DPPH = 0,91; Folin-Ciocalteu x ORAC = 0,79; DPPH x ORAC = 0,82) evidenciando adequação metodológica para as amostras estudadas.

Na **Tabela 19** estão apresentados os resultados de capacidade antioxidante da FBV e das refeições congeladas (RC e RF). A FBV não representa fonte expressiva de compostos com elevada capacidade antioxidante. A RC por conter proteína texturizada de soja, cereal integral e vegetais esta já apresentou elevada capacidade antioxidante. A RF adicionada de FBV apresentou maior capacidade antioxidante que a RC, sendo a diferença evidenciada por dois métodos (ORAC e DPPH) ($p < 0,05$). Dessa forma, a adição de FBV proporcionou aumento da capacidade antioxidante em relação à RC, embora em pequena proporção.

Tabela 19. Capacidade antioxidante, avaliada por três diferentes métodos, de farinha de banana verde (FBV) e refeições controle (RC) e adicionada de FBV (RF)

	FBV	RC	RF
DPPH* (µmoles Trolox equivalente/ 100 g)	791± 56	45 ± 3 ^a	60 ± 3 ^b
ORAC # (µmoles Trolox equivalente/ 100 g)	236 ± 8	522 ± 8 ^a	541 ± 8 ^b
Folin-Ciocalteu [£] (mg catequina equivalente/ 100 g)	121 ± 2	37 ± 2 ^a	39± 2 ^a

*capacidade sequestrante do DPPH; # capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC);
[£] capacidade redutora do Folin-Ciocalteu. RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas, em base integral. Para as refeições - média na mesma linha com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t Student, $p < 0,05$). Umidade: 77% (RC); 76% (RF).

4.3.4 Ensaio clínico de curta duração

Inúmeros estudos demonstram que há um aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) em países em desenvolvimento. O aumento de consumo de produtos industrializados é apontado como fator associado à etiologia dessas doenças, em função do alto conteúdo de gorduras hidrogenadas e açúcar (BARRETO et al., 2005), no entanto a indústria de alimentos tem colocado no mercado inúmeros produtos prontos, nutricionalmente equilibrados, a fim de atender uma demanda por parte de consumidores que buscam uma alimentação adequada, sem comprometer muito do seu tempo com o preparo das refeições.

Alimentos que contêm carboidratos não disponíveis têm mostrado maior eficácia no controle da saciedade, da resistência à insulina e dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios (WHO/FAO, 2003). Entre esses carboidratos está o amido resistente, que compõe a fibra alimentar (FA), à qual tem se atribuído inúmeros efeitos favoráveis ao metabolismo, como absorção de minerais e alteração de hormônios gastrintestinais relacionados ao controle do consumo alimentar, além da glicemia e insulinemia. A elevada insulina circulante, decorrente da presença da glicose plasmática, produz a sensação de fome e pode aumentar a ingestão energética; dessa forma o consumo de alimentos com reduzida ou moderada resposta glicêmica, como é o caso daqueles com alto conteúdo de AR e FA, pode contribuir para o controle da

glicemia e do consumo alimentar. Certos tipos de FA presentes nos alimentos podem contribuir com a resposta glicêmica e também com a saciedade, em função da sua viscosidade e baixa densidade energética, além de promover saciação pela distensão gástrica (SLAVIN; GREEN, 2007).

O perfil das refeições (RC e RF), observado nos resultados das análises químicas e de fermentação *in vitro*, sinalizou possíveis efeitos fisiológicos, dessa forma foram realizados ensaios clínicos com voluntários saudáveis em relação à resposta glicêmica, liberação de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade, capacidade antioxidante *in vivo*, fome/saciedade e funcionamento intestinal.

4.3.4.1 Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre a resposta glicêmica

Resultados de uma meta-análise com 37 estudos coorte indicam que dietas com baixo índice glicêmico e/ou baixa carga glicêmica estão associadas à redução de risco de desenvolvimento de DCNT como diabetes e doenças cardiovasculares, da mesma forma que grãos integrais e elevada ingestão de FA, em função da redução da glicemia pós-prandial (BARCLAY et al., 2008).

Uma refeição com baixa resposta glicêmica pode controlar a insulinemia e, conseqüentemente a fome. Sendo assim, foram avaliadas as respostas glicêmicas produzidas com a ingestão das refeições congeladas, tendo o pão francês como referência (**Figura 5, Tabelas 20 e 21**).

Figura 5. Resposta glicêmica de voluntários saudáveis (n=15) após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

A comparação das respostas glicêmicas produzidas pelas refeições controle (RC) e adicionada de FBV (RF) mostrou que a adição de FBV não modificou o perfil da curva glicêmica (**Figura 5**), porém houve diferença entre RC e RF com relação à área sob a curva (ASC) (**Tabela 20**).

Tabela 20. Resposta glicêmica (mmol/ L) de voluntários saudáveis (n=15) durante 120 min e ASC, após a ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV)

	Tempo (min)							
	0	15	30	45	60	90	120	ASC*
Pão francês**	4,68	5,01	6,36	6,94	6,22	5,21	4,92	118,44
RC	4,53	4,93	5,73	5,65	5,22	4,91	4,89	53,81 ^a
RF	4,60	4,87	5,68	5,73	5,28	4,74	4,74	45,31 ^b

*ASC - Área sob a curva. ** Alimento referência.

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

O perfil semelhante de cada curva pode ser devido ao fato da refeição controle (RC) conter elevado conteúdo de carboidratos não disponíveis, mesmo sem a adição de FBV, uma vez que é composta por macarrão integral e molho à bolonhesa com proteína texturizada de soja (**Tabelas 14 e 15 e Quadro 2**). Uma vez adicionada a FBV, não houve alteração da resposta glicêmica por conta da já baixa resposta glicêmica produzida pela RC.

Embora as respostas glicêmicas de RC e RF tenham sido semelhantes, a avaliação deste parâmetro foi necessária, para que os resultados dos demais ensaios clínicos não ficassem comprometidos, uma vez que reduzida resposta glicêmica é uma das premissas para uma refeição saudável.

Barclay et al. (2008) confirmaram por meta-análise que a hiperglicemia pós-prandial em pessoas não-diabéticas eleva o risco de DCNT, e apontam vários estudos nesse sentido, com relação a doenças cardiovasculares, câncer de colón e câncer de pâncreas. Alimentos com alto IG mantêm glicemia elevada, o que requer maior concentração de insulina circulante, o que, por sua vez, ocorrendo de forma sistemática, pode provocar falência das células β do pâncreas, com consequente intolerância à glicose ou resistência insulínica.

O índice glicêmico obtido a partir da ingestão da RF foi significativamente diferente daquele obtido pela ingestão da RC (**Tabela 21**), sendo ambas as refeições classificadas como de baixo IG e baixa CG.

Tabela 21. Índice glicêmico (IG) (%) e carga glicêmica (CG) de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=15)

	IG ** Pão=100	IG*** glicose=100	Classifi- cação [#]	Porção	Carb. disponível	CG	Classifi- cação [#]
Pão francês*	100		A	50		14	M
RC	54 ± 10 ^a	38	B	400	25,6	9	B
RF	45 ± 7 ^b	32	B	400	26,2	8	B

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

*Alimento referência. ** Dados apresentados com média ± erro padrão. ***Para obter valores de IG-controle glicose a partir do valor de IG-controle pão, multiplica-se esse valor por 0,7 (BROUNS et al., 2005).

[#]Para classificação do IG e CG foram utilizados valores de referência utilizados pelo SUGIRS (2005).

Valores de referência IG: controle glicose (IG=100): B≤55; 56≤M≤69; A≥70

Valores de referência CG: controle glicose (IG=100): B≤10; 11≤CG≤19; CG≥20

A= alto, M= médio, B= baixo.

Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste t de Student, $p < 0,05$).

O IG de alimentos ricos em amido depende de diversos fatores tais como proporção de amilose/amilopectina, natureza do grão de amido, gelatinização do amido, conteúdo de água e temperatura. Considerando-se glicose como referência, os valores encontrados para IG de diferentes amidos variam entre 10 (para amidos de leguminosas) e 100 (em batatas e arroz ou cereais matinais). Porém, é importante enfatizar que alimentos contendo AR têm sua velocidade de digestão reduzida e, conseqüentemente, produzem menores respostas glicêmicas e insulínicas (SAJILATA et al., 2006).

Em estudo com adolescentes portadores de sobrepeso (n = 16) que investigou se refeições de baixo IG produziram efeitos metabólico e hormonal e saciedade similares com refeições com baixo IG com alimento integral, comparadas com refeição de moderadamente alto IG, Ball et al. (2006) observaram que ambas as refeições com baixo IG produziram áreas sob a curva menores que a produzida pela refeição de alto IG, e prolongaram a saciedade, baseada no tempo em que os voluntários solicitaram a refeição posterior.

Como as refeições controle e adicionada de FBV apresentaram baixo IG e baixa CG, estas são qualificadas como refeições adequadas do ponto de vista de resposta glicêmica.

4.3.4.2 Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade

A saciedade pode ser afetada por inúmeros fatores, principalmente densidade energética, presença de alguns macronutrientes, e fatores ambientais. O presente estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário/USP, em condições ambientais controladas, o que reduz a interferência desses últimos.

As refeições estudadas apresentaram baixo índice glicêmico e carga glicêmica (**Tabela 21**); densidade energética similar (RC = 2,93 kJ/ g e RF = 2,94 kJ/ g) e conteúdo moderado de FA (RC = 1,82 g/ 100 g e RF = 1,94 g/ 100 g). Como a composição química das refeições foi semelhante, as respostas obtidas quanto aos hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade foram decorrentes principalmente da adição de FBV à refeição (RF).

A concentração plasmática de hormônios gastrintestinais apresenta grande variação interpessoal, conforme pode ser observado entre os valores máximo e mínimo (**Tabelas 22, 23 e 24**); dessa forma, as variações ocorridas estão apresentadas em porcentagem em relação ao tempo zero (t 0). As curvas referentes às variações percentuais das concentrações de grelina, insulina e leptina a partir do jejum (t 0) até 180 min após a ingestão das refeições estão apresentadas na **Figura 6 (A), (B) e (C)**, respectivamente.

Figura 6. Variação percentual em relação ao jejum da concentração plasmática de grelina (A), insulina (B) e leptina (C), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) por voluntários saudáveis (n=14). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

As concentrações de grelina e insulina reagem de maneira oposta à ingestão de alimentos. Como pode ser observado na **Figura 6 (A)**, a grelina

estava alta antes da ingestão, caiu imediatamente após, e começou a se elevar novamente a partir dos 30 min, exatamente o contrário da insulina (**Figura 6 (B)**). A alta concentração de grelina é responsável pela sensação de fome durante o jejum e pode se elevar para concentrações acima do jejum algumas horas após a ingestão de uma refeição.

A grelina é um hormônio orexígeno, produzido pelo estômago, afetado pela composição da refeição, sendo que administrações exógenas desse hormônio aumentaram sensivelmente o consumo de alimentos (SHIYA et al., 2002). A grelina está relacionada ao tipo de nutriente ingerido, mas também à distensão gástrica, respondendo a estímulos pré e pós-absortivos (WILLIAMS et al., 2003).

No presente estudo, a FBV provoca distensão gástrica, bem como pode alterar a absorção de nutrientes por conter elevada concentração de AR, componente que possui características de fibra alimentar.

A concentração plasmática de leptina caiu durante os 180 min, sendo que houve diferença significativa entre RC e RF aos 60 e 120 min (**Figura 6 (C)**).

Tabela 22. Concentrações média, mediana, mínima e máxima de grelina plasmática (pg/ mL) e variação percentual em relação ao jejum (t 0), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

	Grelina (pg/mL)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180
RC	Média	184	127	138	214	236
	Mediana	174	113	131	160	218
	Mínimo	80	55	63	79	131
	Máximo	336	244	256	476	464
	Variação %	100^a	73^a	81^a	113^a	131^a
RF	Média	174	123	136	176	202
	Mediana	161	119	139	165	192
	Mínimo	95	59	57	84	97
	Máximo	319	238	238	333	358
	Variação %	100^a	68^a	75^a	97^a	111^b

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Pode-se observar na **Tabela 22** que, considerando as diferenças estatísticas, a RF provocou menor elevação da grelina plasmática ($p < 0,05$) em relação à RC aos 180 min, indicando possivelmente uma maior saciedade e menor necessidade energética na próxima refeição (EL KHOURY et al., 2006).

Em pessoas saudáveis, a grelina encontra-se alta no jejum e reduzida pós-prandialmente (SHIYA et al., 2002), mas em portadores de obesidade, resistência à insulina ou diabetes tipo 2 os níveis são menores no jejum e há uma menor variação pós-prandial em relação a pessoas magras (St. PIERRE et al., 2007). A elevada ingestão de FA foi associada inversamente com a grelina total em um estudo com 35 mulheres menopausadas, com sobrepeso ou obesas; houve associação também com lipídios poliinsaturados, enquanto a área sob a curva (ASC) de grelina pode ser associada à ingestão de FA, total energético, carboidratos e lipídios (St. PIERRE et al., 2009).

Dessa forma, a FA pode ser associada à maior supressão de grelina pós-prandial, independentemente da composição corporal e problemas metabólicos. A adição de FBV proporcionou um perfil da variação plasmática de grelina que sinaliza possível redução da fome em refeição posterior, pois os níveis plasmáticos desse hormônio sofreram menor aumento em relação à RC, após 30 min, o que se manteve até 180 min.

A leptina é um hormônio relacionado à saciedade, sendo tradicionalmente um mediador de longo prazo, assim sua resposta não se daria imediatamente após a refeição como acontece com grelina e insulina. A secreção de leptina segue um ritmo circadiano e com padrão oscilatório; as concentrações geralmente são altas durante o sono, resultado de um possível efeito cumulativo da secreção de insulina que ocorre durante o dia (MEIER; GRESSNER, 2004) e vão decaindo até o meio da manhã, quando começam a se elevar novamente; quanto mais baixa a concentração de leptina, maior o estímulo à ingestão alimentar (CRISPIM et al., 2007). No entanto, estudos vêm apontando uma atuação de curto prazo, pois parte da leptina é produzida no estômago e poderia ser afetada pela ingestão de refeições (FRENCH; CASTIGLIONE, 2002; KLOK; JAKOBSDOTTIR; DRENT, 2007).

Tabela 23. Concentrações média, mediana, mínima e máxima de leptina plasmática (pg/ mL) e variação percentual em relação ao jejum (t 0), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

	Leptina (pg/mL)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180
RC	Média	9976	7866	7825	7057	6583
	Mediana	8061	7174	6402	6041	6012
	Mínimo	3873	2768	3106	3194	3287
	Máximo	26438	16417	15828	13581	14630
	Variação %	100^a	83^a	82^a	77^a	75^a
RF	Média	10038	8976	8920	8568	8242
	Mediana	9020	7831	7870	7589	6967
	Mínimo	4321	3394	3126	2786	2773
	Máximo	18598	14293	15113	14803	15417
	Variação %	100^a	93^a	92^b	87^b	82^a

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Como pode ser observado na **Figura 6 (C)**, a adição de FBV (RF) proporcionou menor redução na leptina plasmática em relação ao controle (RC). Para a refeição RF, a menor redução da leptina plasmática pode estar relacionada à maior saciedade. Isto pode, em parte, ser confirmado pelos resultados do teste de fome e saciedade aplicado (**Figura 8**), onde a FBV adicionada (RF) proporcionou maior saciedade em relação à RC nos tempos 120 e 180 min e na ASC (**Figura 7**).

Diferentemente da FA, a alta ingestão de lipídios e carboidratos pode ser associada com altas concentrações plasmáticas de grelina e reduzidas de leptina, perfil este que pode promover o ganho de peso. Para avaliar essa associação, foi realizado estudo em coorte com a ingestão de macronutrientes em 165 voluntárias sedentárias com sobrepeso e obesidade, observando também a alteração da insulina nessa associação. Observou-se relação inversa entre concentração de leptina e ingestão de carboidratos, mas não entre grelina e outros macronutrientes. Entre as mulheres com concentração insulínica acima da média, foi observada associação entre grelina e lipídios saturados, e entre leptina e macronutrientes, o que pode promover o ganho de peso (KONG et al., 2009). Como as refeições estudadas no presente trabalho não contêm elevada concentração de carboidratos disponíveis, mas moderada

concentração de FA e alta de carboidratos não disponíveis, a concentração plasmática de hormônios decorrente da ingestão delas não deve propiciar ganho de peso.

Foram observadas variações nas concentrações plasmáticas de insulina da RF em relação à RC (**Tabela 24**), sendo menores em todos os tempos, porém com diferença estatística significativa nos tempos 120 e 180 min ($p < 0,05$). Dessa forma, a adição de FBV foi responsável pela menor variação de insulina na RF em relação à RC e proporcionou menor aumento de insulina plasmática (tempos 120 e 180 min).

Tabela 24. Concentrações média, mediana, mínima e máxima de insulina plasmática (pg/ mL) e variação percentual em relação ao jejum (t 0), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

	Insulina (pg/mL)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180
RC	Média	261	1727	863	539	375
	Mediana	252	1816	805	560	403
	Mínimo	145	725	369	205	146
	Máximo	374	2665	1615	1103	489
	Variação %	100^a	645^a	322^a	203^a	159^a
RF	Média	307	1855	907	449	321
	Mediana	277	1484	877	454	303
	Mínimo	139	920	320	229	183
	Máximo	606	3351	1446	754	528
	Variação %	100^a	574^a	270^a	143^b	103^b

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. Médias da mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Dezesseis voluntários, não obesos, consumiram cinco refeições isoenergéticas, compostas de variadas concentrações de fibra alimentar (FA) e proteína em estudo que avaliou as concentrações plasmáticas de insulina, glicose, grelina e outros hormônios por um período de 2 h após o consumo dessas refeições. Assim como as refeições estudadas no presente trabalho, que foram adicionadas de FBV, Karhunen et al. (2010) observaram que aquelas enriquecidas com FA interferiram positivamente nos níveis plasmáticos de glicose, insulina e grelina.

Em outro estudo randomizado, tipo *crossover*, 10 voluntários consumiram, em ocasiões separadas, dietas isoenergéticas com diferentes concentrações de carboidratos, proteínas e lipídios para avaliar a variação pós-

prandial de grelina e insulina em função das diferentes concentrações de macronutrientes. Foi observada uma importante variação entre elas; a dieta com maior concentração de carboidratos induziu a maior diferença em relação à supressão dos níveis de grelina em relação às demais, mas em 180 min a dieta hiperproteica provocou o menor nível do hormônio, inclusive em relação ao jejum. Com relação à insulina, a dieta de carboidratos apresentou níveis maiores até 120 min, mas em 180 min tanto a variação quanto a concentração de insulina da dieta hiperproteica foi significativamente maior. Esses dados evidenciam que os hormônios grelina e insulina estão negativamente associados, e fortalecem a hipótese de que a insulina produzida pelo consumo de uma refeição pode induzir a supressão da grelina (EL KHOURY et al., 2006). A produção da secreção de insulina por refeições ricas em proteína, quando comparada com outras dietas, pode ser explicada pelo aumento de sensibilidade das células pancreáticas à glicose provocada pela proteína, acentuando assim a secreção de insulina (LINN et al., 2000).

Os hormônios estudados apresentaram boa correlação entre si, sendo direta entre leptina e insulina, e inversa entre grelina e leptina e entre grelina e insulina (**Tabela 25**).

Tabela 25. Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina e insulina, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

	Grelina/Leptina	Grelina/Insulina	Leptina/Insulina
RC	-0,9981	-0,8523	0,8535
RF	-0,9917	-0,8746	0,8161

RC - refeição controle. RF - RC adicionada de FBV.

Erdmann et al. (2004) avaliaram a concentração de grelina plasmática em 14 voluntários em função da insulina e glicose plasmática e ao consumo alimentar antes e 300 min após o consumo de 5 tipos de refeição; observaram que a grelina apresentou maior redução com a ingestão de refeição rica em carboidratos (pão) até 240 min, horário em que foram oferecidos sanduíches de composição conhecida. Porém, a grelina se elevou levemente com a ingestão dos outros 4 tipos de refeições, ricas em proteínas, em lipídios, frutas ou vegetais, mas a amplitude da fome e da saciedade em teste de escala visual

não apresentou diferenças significativas. Este estudo confirmou a existência de uma associação negativa ($r = - 0,44$; $p < 0,001$) entre níveis de insulina e grelina, pois encontrou reduzido aumento dos níveis de grelina em função de pequeno ou moderado aumento de insulina; e com importante elevação de insulina e glicose após a ingestão de pão, há forte associação com a supressão de grelina. O consumo de sanduíches *ad libitum* foi mais elevado depois do consumo dos grupos de frutas e de vegetais, onde a grelina estava mais elevada em 240 min. Nesse mesmo grupo também a grelina caiu mais rapidamente entre 240 e 300 min com relação aos outros 3 grupos, possivelmente pelo aumento de insulina ter sido maior e mais rápido.

Na **Tabela 26** estão apresentados os resultados de resposta glicêmica durante 180 min da ingestão das refeições e a **Tabela 27** apresenta as correlações entre os níveis plasmáticos de glicose e de hormônios gastrintestinais. A glicose apresentou boa correlação direta com insulina e com leptina em ambas as refeições. Da mesma maneira, foi evidenciada correlação inversa entre glicose e grelina para as refeições.

Tabela 26. Resposta glicêmica (mmol/ L) durante 180 min e ASC, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

Tempo (min)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180	ASC
RC	4,4	5,9	4,9	4,7	4,4	76,8 ^a
RF	4,5	6,2	4,8	4,4	4,3	68,7 ^a

*ASC - Área sob a curva.

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os resultados de resposta glicêmica e ASC produzidos pela ingestão das refeições com 400 g (**Tabela 26**) apresentaram perfil semelhante aos do ensaio de IG, no qual uma porção de cada refeição contendo 25 g de carboidrato disponível foi ingerida, e confirmam a classificação das duas refeições como de baixo IG e baixa CG (**Tabelas 20 e 21**).

Tabela 27. Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina, insulina e glicose, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

	Grelina/Glicose	Leptina/Glicose	Insulina/Glicose
RC	-0,8458	0,8398	0,9933
RF	-0,8267	0,7615	0,9957

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

Para avaliar o efeito do índice glicêmico sobre a glicemia, insulínemia e leptinemia, 10 voluntários jovens saudáveis consumiram dois tipos de desjejum, em ocasiões diferentes, contendo 50 g de carboidratos disponíveis em flocos de milho (IG = 125%, alto IG) ou cereal matinal com fibra (IG = 49%, baixo IG). A resposta insulínica foi atenuada de forma importante quando foi consumido o desjejum de baixo IG em relação ao de alto IG, e a leptina circulante foi maior; esses achados levaram os pesquisadores a concluir que uma refeição de baixo IG pode ajudar a reduzir o consumo de alimentos, o que seria vantajoso para o controle de peso, além da resistência insulínica e diabetes tipo 2 (BARKOUKIS et al., 2007).

Tendo em vista a possibilidade em reduzir o risco de desenvolvimento de algumas DCNT em função da redução de alguns hormônios circulantes, um estudo foi realizado com 10 voluntárias com sobrepeso, de 11 a 12 anos de idade, que consumiram duas refeições de forma randomizada, em diferentes ocasiões, uma com alto conteúdo de açúcar/baixo conteúdo de FA e outra com baixo conteúdo de açúcar/ alto conteúdo de FA. Foi avaliado o consumo *ad libitum* de *snacks* após 120 min, além das concentrações de hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade. Após a ingestão de refeição com alto conteúdo de açúcar/baixo conteúdo de FA, os níveis de glicose e leptina mantiveram-se altos por mais tempo, sendo que a glicose estava mais elevada em 60 min, e a leptina em 90 min, diferentemente da refeição com baixo conteúdo de açúcar/alto conteúdo de FA, que apresentaram níveis menores nesses mesmos tempos. Os níveis de insulina e o consumo alimentar não apresentaram diferenças (SPRUIJT-METZ et al., 2009).

A adição de FBV na refeição (RF) proporcionou significantes variações pós-prandiais nas concentrações plasmáticas dos hormônios gastrintestinais

em relação à refeição controle (RC). Com a ingestão da RF, ocorreu menor redução de leptina, hormônio responsável pela saciedade.

4.3.4.3 Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre a fome e saciedade

A fome e a saciedade após a ingestão das refeições estudadas foram avaliadas por dois instrumentos. O primeiro foi a escala bipolar de Holt, ancorada por extremos, de extremamente faminto (- 3) até extremamente saciado (+ 3), e foi calculada a área sob a curva (ASC) para 180 min (**Figura 7**). A ASC da refeição adicionada de FBV (RF) foi superior à área da refeição controle ($p < 0,05$), demonstrando que a RF provocou maior saciedade. Nos tempos avaliados, a refeição RF só produziu maior saciedade que a RC a partir de 120 min (t_{120} , $p = 0,0152$; t_{180} min, $p = 0,0074$).

Figura 7. Área sob a curva (ASC) para escala bipolar de Holt, para avaliação de fome/saciedade (fome extrema=0) em voluntários saudáveis ($n=50$), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

O outro instrumento utilizado foi o teste de escala visual (VAS – *Visual Analogue Scale*), ancorados entre nenhuma (0 mm) e extremamente (100 mm), para medir parâmetros relacionados à fome e saciedade (**Figura 8**). Observa-se que a sensação de fome (A) (Você está com fome agora?) foi reduzida pela adição de FBV (RF) nos tempos 120 e 180 min. Esses resultados são compatíveis com os resultados de grelina e insulina relacionados à fome

apenas nesses tempos (**Figura 6 (A) e (B)**). Como pode ser observado na **Figura 8**, diferenças nesses mesmos tempos (120 e 180 min) foram encontradas nos parâmetros que refletem perspectiva de consumo (B) (Você poderia comer agora?), saciedade (C) (Você está saciado agora?) e desejo de comer (D) (Você gostaria de comer agora?). O parâmetro saciedade (C) apresentou diferença significativa nos tempos 120 e 180 min, enquanto os resultados de leptina, hormônio relacionado à saciedade, apresentaram diferença significativa nos tempos 60 e 120 min, e embora sem diferença estatística, também no tempo 180 min, o que demonstra a relação da leptina com este parâmetro. Não foram encontradas diferenças no parâmetro sede (dados não apresentados).

Figura 8. Variação da (A) fome, (B) perspectiva de consumo, (C) saciedade e (D) desejo de comer em voluntários saudáveis (n=50), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Alimentos com baixo IG são apontados como alimentos com maior poder de saciedade em função da menor resposta insulínica produzida, fato que foi comprovado por Ball et al. (2006), que avaliaram a saciedade e a resposta

metabólica e hormonal por 4 h em adolescentes com sobrepeso (n = 16) de ambos os gêneros. A glicemia produzida pela refeição com baixo IG (bebida com leite integral e barra de cereais) e baixo IG com alimentos convencionais (ovos mexidos, presunto, maçã, queijo e leite desnatado) foram similares, mas bem menor que a da refeição com alto IG (bebida com leite integral e maltodextrina e doce), já a insulina produzida foi maior com a refeição de alto IG se comparada às de baixo IG e o tempo para solicitar a refeição seguinte foi menor. Assim, alimentos com baixo IG, como as refeições do presente estudo, apresentam perfil para produzir reduzida glicemia e insulinemia, o que não aumenta a sensação de fome.

Alimentos hiperproteicos têm maior poder de saciedade e termogênese, assim vários parâmetros relacionados à saciedade foram estudados por Smeets et al. (2008) com 36 voluntários, eutróficos, de ambos os gêneros, em relação a duas dietas, uma com concentração de proteína em 10% do valor energético e 60% de carboidratos e outra hiperproteica com 25%, e concentração de carboidratos em 40%. No teste de escala visual (VAS) a dieta hiperproteica apresentou maior saciedade em 30 e 120 min, e na área sob curva; mas o mesmo não foi observado nos hormônios estudados, entre eles a grelina, evidenciando que o fator hormonal não foi alterado pela maior ingestão de proteína.

Apesar da concentração protéica das refeições (25%), foram obtidas respostas hormonais diferentes entre RC e a RF. Da mesma forma, a adição de FBV foi responsável pelas diferenças encontradas entre RC e RF para os parâmetros de fome/saciedade avaliados pelo VAS em 120 e 180 min. Os parâmetros fome e saciedade avaliados no presente estudo apresentaram boa correlação com grelina e insulina (**Tabela 28**).

Tabela 28. Correlação entre parâmetros de fome e saciedade e hormônios gastrintestinais no plasma de voluntárias saudáveis (n=14), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV)

	Fome/ Grelina	Saciedade/ Grelina	Fome/ Insulina	Saciedade/ Insulina	Fome/ Leptina	Saciedade/ Leptina
RC	0,9993	-0,9967	-0,8705	0,8884	-0,9993	0,9972
RF	0,9971	-0,9964	-0,8904	0,8970	-0,9971	0,9874

RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV.

Isaksson et al. (2009) avaliaram o apetite durante 8 h após o consumo de pães isoenergéticos com variados teores ou tipos de fibra de centeio em estudo randomizado com 16 voluntários, e verificaram que os pães com cevada reduziram o apetite antes do almoço com relação ao consumo de pão branco (controle), assim como o produzido com farelo induziu o maior efeito. Após o almoço, os três pães produzidos com cevada reduziram a fome e o desejo de comer comparado ao pão de trigo. Diferentes dose-resposta (5 e 8 g de FA, de farelo ou fração intermediária de cevada) também elevaram a saciedade em relação ao controle antes do almoço, mas não alteraram a fome ou a vontade de comer.

Willis et al. (2009) testaram a hipótese que alguns tipos de FA podem ter maior poder de saciedade que outros, assim avaliaram a ingestão de quatro tipos de FA (farelo de milho, β glicana de cevada com fibra de aveia, amido resistente e polidextrose) adicionados a um controle (bolinho tipo *muffin*, com baixo teor de FA), em estudo crossover, duplo-cego, randomizado, com 20 voluntários saudáveis, de ambos os gêneros. A saciedade foi maior após a ingestão de amido resistente e farelo de milho enquanto a polidextrose teve o menor efeito, similar ao controle. Essas observações indicam que o tipo de FA pode afetar o poder de saciedade.

Para avaliação da ingestão energética de refeições subsequentes à ingestão da RC e EF, durante o almoço, foram fornecidos um lanche, após 180 min, e um jantar, após 360 min.

O consumo de alimentos *ad libitum* apresenta grande variação interpessoal, conforme pode ser observado entre os valores máximo e mínimo (**Tabela 29**), assim, as variações ocorridas entre as refeições estão apresentadas em porcentagem em relação ao controle.

Tabela 29. Ingestão energética (média, mediana, mínima e máxima (kJ)) e variação percentual (%) em duas refeições subseqüentes (lanche e jantar), após ingestão de RC e RF em voluntários saudáveis (n=50)

		Lanche (kJ) (após 180 min)	Jantar (kJ) (após 360 min)	Energia total (kJ) (após 360 min)
RC	Média	1929	1936	3865
	Mediana	1923	1885	3697
	Mínimo	641	867	1649
	Máximo	5128	3069	7648
	Variação %	100^a	100^a	100^a
RF	Média	1603	1677	3279
	Mediana	1923	1583	3183
	Mínimo	0	605	605
	Máximo	3205	2732	5937
	variação %	83^b	86^b	85^b

RC - refeição controle. RF - RC adicionada de farinha de banana verde.

Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste t de Student, $p < 0,05$).

Como pode ser observado na **Tabela 29**, houve redução da ingestão energética após a ingestão da RF em relação à RC. Para a RF, a redução foi de 17% no lanche e 14% no jantar. Essa diferença percentual observada representou uma redução média de 586 kJ (140 kcal) ou 15% do total energético ingerido após a ingestão de refeição adicionada de FBV (**Figura 9**). Essa redução energética confirma a relação com a menor concentração plasmática de grelina (180 min) e insulina (120 e 180 min) e menor redução (120 min) observados no estudo de liberação de hormônios gastrintestinais (**Figura 6**).

Figura 9. Ingestão energética posterior (lanche - 180 min e jantar - 360 min) à ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=50). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. Total = lanche + jantar. *diferença significativa entre RC e RF (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Bodinhm; Frost e Robertson (2008), em um estudo tipo *crossover*, investigaram os efeitos (em 24 h) da suplementação com AR tipo 2, comparado com placebo (amido disponível), em adultos saudáveis, que consumiram 48 g de AR ou placebo, divididos entre o café da manhã e o almoço. Durante 7 h, foram avaliados o apetite (através de teste VAS) e hormônios gastrintestinais no plasma. Os autores observaram que a ingestão de AR provocou uma diminuição na ingestão energética nas refeições posteriores se comparada à ingestão de placebo. Além disso, foi observada menor concentração de insulina plasmática no grupo que consumiu AR, apesar dos níveis de glicose plasmática não serem significativamente diferentes entre os grupos. Os autores sugerem um potencial efeito benéfico do AR no que se refere ao controle de peso, uma vez que houve maior saciedade e diminuição da ingestão energética nas 24 h subseqüentes ao consumo e, além disso, sugerem benefícios com relação ao aumento da sensibilidade à insulina, uma vez que, após a ingestão de AR, os indivíduos apresentaram menor secreção de insulina em comparação ao grupo que recebeu placebo.

A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) durante a fermentação colônica de FA reduz a circulação de ácidos graxos livres e de hormônios gastrintestinais, que comprometem o controle de peso corporal e a tolerância à glicose (DELZENNE et al., 2003).

Os resultados de fermentação *in vitro* das FND da refeição adicionada de FBV (RF), indicaram alta fermentabilidade (**Tabelas 16, 17 e 18**). A fermentabilidade da RF em relação à lactulose para produção de AGCC foi de 45%, para a pressão foi de 72% e para pH foi de 44%. Dessa forma, os resultados de significativa fermentabilidade *in vitro*, decorrente da adição de FBV na refeição, sugerem a possível participação AGCC na variação plasmática da grelina e insulina, e consequente aumento da saciedade.

A relação da FA com a saciedade e redução de ingestão energética vem sendo apresentada em muitos estudos. Freeland; Anderson e Wolever, em 2009, estudaram o efeito de FA insolúvel sobre o apetite em homens, com IMC entre 20 a 27 kg/ m², bem como a ingestão energética em dois tempos, 60 min (n = 17) e 120 min (n = 16), após o consumo de quatro refeições com cereal

matinal. As refeições tinham mesmo peso, volume e composição de macronutrientes, mas diferença nas concentrações de FA e glicose. As quatro refeições não apresentaram diferenças com relação à fome e saciedade. Quando o experimento ocorreu até 60 min, a ingestão energética total (soma do desjejum com refeição *ad libitum*) foi menor após o consumo de cereal rico em FA (41 g), em relação ao de baixa FA (1 g), baixa FA (1 g) + glicose (41 g) e rica em FA (41 g) + glicose (41 g). Considerando apenas o consumo *ad libitum*, o desjejum com cereal pobre em FA foi maior, em energia, em relação aos outros 3, já no consumo *ad libitum* em 120 min esse desjejum reduziu o consumo, o que indica que a porção de 41 g de FA insolúvel pode reduzir o consumo alimentar no curto prazo, mas isso não se mantém por período maior. Isso deve ter ocorrido, possivelmente, em função do grande volume das refeições; a FA aumenta a retenção de água, o que pode ter ocorrido quando foi ingerido 41 g de FA, que causa distensão gástrica, o que é mais efetivo após a refeição.

Wong et al. (2009) testaram a hipótese de que feijão branco, enlatado ou em preparo caseiro, consumidos em diferentes receitas, e outros tipos de grãos (grão-de-bico, feijão branco, ervilha amarela, lentilha cozidos com porções de 300 kcal) proporcionam saciação e saciedade e consequentemente menor ingestão energética em 14 ou 15 homens jovens eutróficos, em três experimentos. Os autores observaram que a sensação de apetite, o consumo alimentar depois de 120 min e o consumo cumulativo (experimento + refeição posterior) foi determinado pela concentração energética oferecida e sofreu pouca influência da composição, tratamento, receita ou variedade; dessa forma, os autores consideram que a associação entre consumo de grãos com menor risco de obesidade ou sobrepeso não pode ser explicado pelos efeitos de curto prazo sobre a saciedade ou consumo alimentar.

Estudos agudos muitas vezes não permitem associações, pois alguns efeitos não são decorrentes da presença de alguns nutrientes no sistema digestório e não ocorrem logo após o consumo. Porém, a fermentação e a consequente produção de AGCC podem contribuir com efeitos de longo prazo, como menor ingestão de alimentos em refeições posteriores decorrentes de controle hormonal.

O efeito do consumo de grãos integrais (cevada, trigo) e arroz refinado sobre a saciedade e ingestão energética foi observado em desenho de *crossover*, com 15 voluntários, que consumiram cereais no desjejum, seguido por almoço *ad libitum*. Houve redução da fome antes do almoço somente para cevada, e a sensação de satisfação ou plenitude desse cereal foi maior se comparado ao trigo. Não houve diferença em relação à ingestão energética (SCHROEDER et al., 2008).

Para confirmar se alimentos ricos em FA, com menor densidade energética, têm maior poder de saciedade em relação a outros com maior densidade, Isaksson et al. (2008) avaliaram o apetite e ingestão energética após o consumo de mingau de centeio no desjejum e almoço com massa, ambos de grãos integral, em refeições isoenergéticas comparadas com pão branco e macarrão comum, em 22 voluntários de ambos os gêneros, com idade entre 21 e 34 anos, com IMC de 18,7 a 27,5 kg/ m², em estudo randomizado tipo *crossover*. O mingau integral prolongou a saciedade, reduziu a fome e o desejo de comer até 8 h após o consumo, já os dois tipos de massa não apresentaram diferença, assim como a ingestão energética no jantar *ad libitum*.

A menor ingestão energética nas refeições posteriores, proporcionada pela adição de FBV, pode ser explicada pela alteração plasmática dos hormônios gastrintestinais (grelina, insulina e leptina). Portanto, foi possível evidenciar que os hormônios gastrintestinais participam do mecanismo indutor da saciedade, necessitando elucidar o grau de participação dos AGCC nesse contexto.

De maneira geral, os resultados do presente ensaio indicam que a adição de FBV à refeição alterou os parâmetros de fome/saciedade, principalmente em 120 e 180 min, bem como reduziu a ingestão energética nas duas refeições posteriores, em 180 e 360 min, comprovando o efeito do AR e da FA adicionados em forma de FBV.

4.3.4.4 Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre o *status* antioxidante

O estresse oxidativo é um importante fator no desenvolvimento de processos patológicos, tais como a aterosclerose, câncer e processos degenerativos associados à idade. De maneira simplificada, o estresse oxidativo pode ser definido como uma ruptura de sinalização e do controle redox celular, que leva a um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes endógenas do organismo e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JONES, 2002). Assim, a ingestão de antioxidantes provenientes da dieta, tais como vitaminas e compostos fenólicos, pode contribuir para a proteção do organismo reduzindo o potencial estresse gerado pelas EROs através de vários mecanismos, incluindo a proteção contra a oxidação das moléculas alvo (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) e a redução da resposta inflamatória (FERNANDEZ-PANCHÓN et al., 2008).

Estudos clínicos demonstraram claramente que o *status* antioxidante *in vivo* pode ser alterado pela dieta, mas a resposta depende de fatores como a capacidade antioxidante dos alimentos, a quantidade consumida, o tipo de fitoquímicos e o seu conteúdo na matriz alimentar, a absorção e o metabolismo dos compostos antioxidantes no organismo (PRIOR et al., 2007).

Para avaliar o efeito da ingestão da refeição, adicionada de FBV e com potencial antioxidante *in vitro*, sobre o *status* antioxidante em voluntários, a capacidade antioxidante no plasma foi determinada por dois métodos: capacidade de absorção do radical oxigênio (*oxygen radical absorbance capacity* – ORAC) e capacidade sequestrante do DPPH.

Os resultados de capacidade antioxidante no plasma dos voluntários, antes da ingestão (t 0), tiveram grande variação, apresentando valores entre 0,83 a 1,94 μ moles Trolox equivalente/ mL plasma e 0,07 a 0,23 μ moles Trolox equivalente/ mL plasma quando avaliados pelos métodos de ORAC e DPPH, respectivamente. Assim, os dados foram normalizados para facilitar a análise. Para as duas refeições, independentemente da adição de FBV, observou-se um aumento na capacidade antioxidante entre 5 - 20% após 30 min da ingestão da refeição, e que se manteve após 3 h. Não se observou diferença

na capacidade antioxidante entre a RC e RF (**Tabela 30**), indicando que os antioxidantes presentes na FND da FBV não contribuem para o aumento da capacidade antioxidante plasmática, além daquela já inerente à própria refeição.

Estes dados estão de acordo com estudos de ingestão de alimentos com elevada capacidade antioxidante, em ensaio agudo, que mostraram uma elevação na capacidade antioxidante no plasma entre 3 - 30%, dependendo da fonte alimentar do antioxidante ou do método de análise utilizado (FERNANDEZ-PANCHÓN et al., 2008).

Tabela 30. Capacidade antioxidante no plasma (% dados normalizados), analisada pelos métodos capacidade sequestrante do DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14)

Tempos (h)	ORAC		DPPH	
	RC	RF	RC	RF
0	100	100	100	100
0,5	104 ± 10 ^a	107 ± 16 ^a	117 ± 8 ^a	107 ± 1 ^a
1	110 ± 14 ^a	111 ± 15 ^a	114 ± 1 ^a	112 ± 8 ^a
2	110 ± 13 ^a	104 ± 12 ^a	113 ± 12 ^a	108 ± 10 ^a
3	110 ± 17 ^a	97 ± 10 ^a	110 ± 14 ^a	105 ± 11 ^a

RC - refeição controle. RF - RC adicionada de FBV. Resultados expressos como média ± EP. Média da mesma linha com letras diferentes apresentam diferenças significantes (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

No presente estudo, resultados semelhantes aos no plasma foram observados para a capacidade antioxidante na urina, esta quantificada pelo método de DPPH (**Figura 10**). Para as duas refeições (RC e RF) foi observada elevação da capacidade antioxidante, com pico em 4 - 5 h e com elevação da ordem de 2 a 3 vezes quando comparada aos valores antes da ingestão, entretanto não foi observada qualquer diferença comparando os resultados da RC e RF. Assim, a adição deste ingrediente funcional também não foi capaz de alterar os valores de capacidade antioxidante na urina.

Figura 10. Atividade antioxidante da urina, após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em voluntários saudáveis (n=14). RC – refeição controle. RF – RC adicionada de FBV. Dados normalizados (%).

Apesar da diferença significativa encontrada na capacidade antioxidante das refeições (RC e RF), a ingestão destas não proporcionou qualquer diferença na capacidade antioxidante *in vivo* (plasma e urina).

4.3.4.5 Efeito da adição de farinha de banana verde (FBV) em refeições congeladas sobre o funcionamento intestinal

Uma das propriedades da fibra alimentar (FA), assim como do amido resistente (AR), é sua associação com a saúde intestinal em função da regularização do funcionamento, que engloba frequência de evacuações, consistência das fezes e presença de desconfortos (flatulência, cólicas, distensão). O efeito sobre o volume fecal está associado à retenção de água, em fibras não fermentáveis, ou ao aumento da massa bacteriana do cólon, em fibras fermentáveis, o que, portanto, depende do tipo de FA ingerida. O AR é amplamente fermentado pela microbiota intestinal e os produtos da fermentação estimulam de forma seletiva a atividade e o crescimento de bactérias benéficas, como bifidobactérias e lactobacilos.

A refeição controle (RC) foi elaborada para conter moderado conteúdo de fibra alimentar (**Tabela 14**) e é constituída de macarrão fusilli integral, molho à bolonhesa com proteína texturizada de soja e vegetais, fornecendo 1176 kJ; 7,28 g de FA e 11,24 g de carboidratos não disponíveis. Por seu moderado

conteúdo de FA, a RC fornece 45% (mulheres) e 30% (homens) da recomendação diária de FA (AI – *adequate intake* - IOM, 2005). A adição de FBV na RC (RF) aumentou o conteúdo total de carboidratos não disponíveis sem modificar o perfil de energia da refeição, sendo que a porção de 400 g contém 1176 kJ. O conteúdo total de carboidratos não disponíveis na RF passou para 16,04 g, suprimindo ainda mais a recomendação ingestão diária de FA, (64% - mulheres e 42% - homens). Desta forma, a adição de FBV (8 g em 400 g de refeição) supre a AI diária de FA em 19% (mulheres) e 12% (homens).

A refeição controle melhorou o funcionamento intestinal em relação ao relatado antes de sua ingestão (**Figura 11**) e, provavelmente, este feito é decorrente do significativo conteúdo de FA nas refeições, o que está de acordo com os resultados da meta-análise elaborada por Elia e Cummings (2007), que ressalta a importância de FA proveniente de vegetais para garantir efeito positivo no funcionamento intestinal. Para o parâmetro frequência das evacuações, 57% de todos os voluntários (n = 50) reportaram ter hábito intestinal diário (ao menos 1 vez por dia) antes da ingestão; a mesma informação foi dada por 71% dos voluntários 24 h após a ingestão de RC. Com a ingestão da refeição adicionada de FBV (RF), o relato de hábito diário aumentou ainda mais e somente 4% dos voluntários não reportaram funcionamento intestinal nas 24 h posteriores à ingestão da refeição. Dessa forma, para voluntários saudáveis, uma única ingestão das refeições com FBV foi suficiente para aumentar a frequência das evacuações.

Figura 11. Efeito da ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) sobre o funcionamento intestinal. Resultados expressos em porcentagem de voluntários saudáveis (n= 50) antes e após 24 h da ingestão das diferentes refeições (RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV).
*Flatulência, dor e distensão abdominal.

Para verificar o efeito prebiótico de bebidas de frutas e vegetais com adição de 5 g de inulina da alcachofra de Jerusalém (também conhecida como tupinambo ou girassol batateiro), tubérculo rico nesse tipo de carboidrato não disponível, foi conduzido um estudo duplo cego, controlado com placebo com 66 voluntários, de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 50 anos, divididos em 3 grupos. Houve um aumento importante de bifidobactérias e um pequeno, mas significativo, aumento de *Lactobacillus/Enterococcus* spp.; os voluntários não reportaram importantes efeitos adversos ou de frequência de evacuações (ou movimentos intestinais), mas houve leve aumento de flatulência, sendo esta de média intensidade (RAMNANI et al., 2010).

Ripoll et al. (2009) estudaram o desconforto intestinal como efeito de duas doses de extrato de chicória rico em inulina (contendo 5 g e 7,8 g de inulina), em ensaio de curta duração (n = 18), e observaram um reduzido mas significativo aumento de desconforto com a dose maior. Também estudaram o efeito da ingestão de 8,1 g extrato de chicória (5 g de inulina) por 4 semanas em estudo duplo cego com placebo (n = 35), e não observaram diferença para relatos de flatulência, distensão abdominal, dor abdominal e consistência das fezes entre os grupos inulina e placebo.

A ingestão de uma única refeição, com moderado conteúdo de FA adicionada de FBV (RF), ampliou o número de indivíduos com frequência diária de evacuação, reduziu o número de indivíduos com fezes de consistência dura, sem ocasionar diarreia, e não ampliou relatos de desconforto, além dos mencionados anteriormente.

4.4 Ensaio clínico de média duração

4.4.1 Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre hormônios gastrintestinais relacionados à saciedade

A concentração plasmática de hormônios gastrintestinais apresenta grande variação interpessoal, conforme pode ser observado entre os valores máximo e mínimo (**Tabelas 31, 32 e 33**); dessa forma, assim como foi feito no

ensaio de curta duração, as variações ocorridas estão apresentadas em porcentagem em relação ao tempo zero (t 0). A **Figura 12** apresenta as curvas referentes às variações percentuais das concentrações de grelina (A), insulina (B) e leptina (C) a partir do jejum (t 0) até 180 min após a ingestão das refeições.

As concentrações de grelina e insulina reagem à ingestão de alimentos de maneira oposta. Antes da ingestão, a concentração de grelina estava alta; após a ingestão, sua concentração caiu imediatamente e voltou a aumentar a partir dos 30 min (**Figura 12 (A)**), exatamente o oposto do que ocorreu com a concentração de insulina (**Figura 12 (B)**). A alta concentração de grelina antes da ingestão é responsável pela sensação de fome durante o jejum e pode se elevar para concentrações acima do jejum algumas horas após a ingestão de uma refeição.

A grelina é um hormônio orexígeno, produzido pelo estômago, afetado pela composição da refeição, sendo que administrações exógenas desse hormônio aumentaram sensivelmente o apetite e o consumo de alimentos em ratos (TSCHOP; SMILEY; HEIMAN, 2000; WREN et al., 2001a) e em humanos (NAKAZATO et al., 2001; WREN et al., 2001b; SHIYA et al., 2002). Esta propriedade é exclusiva da grelina e não há comprovações de que outros neuropeptídeos ou hormônios circulantes apresentem esta mesma propriedade (WREN; BLOOM, 2007). A grelina está relacionada ao tipo de nutriente ingerido, mas também à distensão gástrica, respondendo a estímulos pré e pós-absortivos (WILLIAMS et al., 2003). Em humanos, as concentrações de grelina são inversamente correlacionadas com adiposidade, sendo baixas em indivíduos obesos e altas em eutróficos (WREN; BLOOM, 2007). Além disso, em portadores de obesidade, resistência à insulina ou diabetes tipo 2, os níveis são menores no jejum e há uma menor variação pós-prandial em relação a pessoas magras (St. PIERRE et al., 2007).

Figura 12. Variação percentual em relação ao jejum da concentração plasmática de grelina (A), insulina (B) e leptina (C), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=15). RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento.

Tschop et al. (2000), em experimento com ratos, administraram, através de injeção subcutânea, doses diárias de grelina, uma vez ao dia, por duas semanas (2,4 $\mu\text{mol/ kg}$ de peso corporal/ dia). Ao final do experimento, os pesquisadores observaram hiperfagia prolongada e ganho de peso. O ganho de peso observado foi maior do que o esperado para o grau de hiperfagia, e pode refletir as diversas ações da grelina, como adipogênese, inibição de apoptose, inibição da atividade do sistema nervoso simpático, entre outras.

Tabela 31. Concentrações média, mediana, mínima e máxima de grelina plasmática (pg/ mL), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

	Grelina (pg/mL)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180
RC0	Média	184	127	138	214	236
	Mediana	174	113	131	160	218
	Mínimo	80	55	63	79	131
	Máximo	336	244	256	476	464
	Variação %	100^a	73^a	81^a	113^a	131^a
RC14	Média	219	148	151	211	265
	Mediana	172	122	123	149	203
	Mínimo	96	68	54	97	110
	Máximo	470	292	269	491	532
	Variação %	100^a	67^a	72^a	93^b	114^b

RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento.

Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Pode-se observar na **Tabela 31** que a refeição RC14 provocou menor elevação da grelina plasmática ($p < 0,05$) em relação à RC0 aos 120 e 180 min, indicando possivelmente uma maior saciedade e menor necessidade energética na próxima refeição (EL KHOURY et al., 2006). Estes resultados podem ser confirmados pelos resultados obtidos com os testes de fome e saciedade, como mostra a **Figura 16**. A ingestão diária de FBV por 14 dias proporcionou maior saciedade e menor sensação de fome no tempo 180 min, se comparados os consumos das refeições RC0 (antes do tratamento) e RC14 (após o tratamento).

A elevada ingestão de FA foi associada inversamente com a grelina total em um estudo com 35 mulheres menopausadas, com sobrepeso ou obesas;

houve associação também com lipídios poliinsaturados, enquanto que a ASC de grelina pode ser associada à ingestão de FA, total energético, carboidratos e lipídios (St. PIERRE et al., 2009). Dessa forma, a FA pode ser associada à maior supressão de grelina pós-prandial, independentemente da composição corporal e problemas metabólicos.

A ingestão diária de FBV proporcionou um perfil da variação plasmática de grelina que sinaliza possível redução da fome em refeição posterior, pois os níveis plasmáticos desse hormônio sofreram menor aumento a partir de 120 min, após o tratamento com FBV por 14 dias.

A leptina é um hormônio relacionado à saciedade, sendo tradicionalmente um mediador de longo prazo, assim sua resposta não se daria imediatamente após a refeição, como acontece com a grelina e a insulina. A secreção de leptina segue um ritmo circadiano e com padrão oscilatório; as concentrações geralmente são altas durante o sono, resultado de um possível efeito cumulativo da secreção de insulina que ocorre durante o dia (MEIER; GRESSNER, 2004) e vão decaindo até o meio da manhã, quando começam a se elevar novamente; quanto mais baixa a concentração de leptina, maior o estímulo à ingestão alimentar (CRISPIM et al., 2007).

Tabela 32. Concentrações média, mediana, mínima e máxima de leptina plasmática (pg/ mL), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

	Leptina (pg/mL)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180
RC0	Média	9976	7866	7825	7057	6583
	Mediana	8061	7174	6402	6041	6012
	Mínimo	3873	2768	3106	3194	3287
	Máximo	26438	16417	15828	13581	14630
	Variação %	100^a	83^a	82^a	77^a	75^a
RC14	Média	9773	8614	8325	7659	7833
	Mediana	9068	8432	7812	7300	7255
	Mínimo	3118	2585	2937	2563	2453
	Máximo	21338	17738	18473	17113	16660
	Variação %	100^a	92^a	87^a	79^a	82^a

RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Como pode ser observado na **Figura 12 (C)** e na **Tabela 32**, para a refeição RC14, embora sem significância estatística, houve uma menor redução da leptina plasmática em comparação à RC0, em todos os tempos, o que pode estar relacionado com maior saciedade. Esta tendência de maior saciedade pode, em parte, ser confirmada pelos resultados do teste de fome e saciedade aplicado (**Figuras 16 e 17**), onde a ingestão diária de FBV proporcionou maior saciedade após a ingestão da RC14 nos tempos 120 e 180 min e na ASC se comparados a RC0. Desta forma, a ingestão diária de FBV por 14 dias proporcionou uma tendência a menor redução na leptina plasmática após o tratamento, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Diferentemente da FA, a alta ingestão de lipídios e carboidratos pode ser associada com altas concentrações plasmáticas de grelina e reduzidas de leptina, perfil este que pode promover o ganho de peso (WREN; BLOOM, 2007).

Foram observadas variações nas concentrações plasmáticas de insulina da RC0 em relação a RC14 (**Tabela 33**), sendo menor no tempo 180 min (porém sem diferença estatística significativa).

Tabela 33. Concentrações média, mediana, mínima e máxima de insulina plasmática (pg/ mL), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

	Insulina (pg/mL)	t 0	t 30	t 60	t 120	t 180
RC0	Média	261	1727	863	539	375
	Mediana	252	1816	805	560	403
	Mínimo	145	725	369	205	146
	Máximo	374	2665	1615	1103	489
	Variação %	100^a	645^a	322^a	203^a	159^a
RC14	Média	268	1832	930	566	377
	Mediana	245	1915	792	530	369
	Mínimo	160	963	421	276	197
	Máximo	449	3100	1947	1151	622
	Variação %	100^a	659^a	323^a	204^a	125^a

RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Estudos evidenciam que os hormônios grelina e insulina estão negativamente associados, e fortalecem a hipótese de que a insulina produzida

pelo consumo de uma refeição pode induzir a supressão da grelina (EL KHOURY et al., 2006). A produção da secreção de insulina por refeições ricas em proteína, quando comparada com outras dietas, pode ser explicada pelo aumento de sensibilidade das células pancreáticas à glicose provocada pela proteína, acentuando assim a secreção de insulina (LINN et al., 2000).

Os hormônios estudados apresentaram boa correlação entre si, sendo direta entre leptina e insulina, e inversa entre grelina e leptina, e grelina e insulina (**Tabela 34**).

Tabela 34. Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina e insulina, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

	Grelina/Leptina	Grelina/Insulina	Leptina/Insulina
RC0	-0,9981	-0,8523	0,8535
RC14	-0,8378	-0,8405	0,9541

RC0 - refeição controle antes do tratamento.

RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento.

A correlação inversa observada entre grelina e leptina está de acordo com estudo realizado por Zhao et al. (2008), que demonstraram que a leptina inibe a expressão de grelina *in vitro* e com Wang et al. (1996), que demonstraram essa mesma inibição em ratos, utilizando técnicas de biologia molecular.

Figura 13. Área sob a curva (ASC) de glicose em voluntários saudáveis (n=14), após ingestão de refeição adicionada de farinha de banana verde (FBV) em ensaio de curta duração (A) e após ingestão diária de FBV por 14 dias (B). RC - refeição controle; RF - RC adicionada de FBV. RC0 - refeição controle antes do tratamento. RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Ao analisar a ASC de glicose no ensaio de curta duração (**Figura 13 (A)**), observou-se diferença significativa quando comparadas as refeições controle (RC) e adicionada de FBV (RF), demonstrando que a adição de 8 g de FBV foi suficiente para diminuir a resposta glicêmica àquela refeição. Porém, a ingestão diária de FBV proporcionou ainda menor resposta glicêmica à refeição após o tratamento (RC14), o que consequentemente estimula menor liberação de insulina, uma das premissas na diminuição do risco e manutenção do tratamento de diabetes.

A **Tabela 35** apresenta a correlação entre os níveis plasmáticos de glicose e de hormônios gastrintestinais. A glicose apresentou boa correlação direta com a insulina e com a leptina tanto antes (RC0) como depois (RC14) do tratamento com FBV. Além disso, foi evidenciada correlação inversa entre grelina e glicose.

Tabela 35. Correlação entre os níveis plasmáticos de grelina, leptina, insulina e glicose, após ingestão de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

	Grelina/Glicose	Leptina/Glicose	Insulina/Glicose
RC0	-0,8458	0,8398	0,9933
RC14	-0,7746	0,9468	0,9935

RC0 - refeição controle antes do tratamento.

RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento.

O aproveitamento do AR no organismo ocorre de 5 a 7 h após sua ingestão, diferentemente do amido disponível, que é digerido quase imediatamente e metabolizado. A ocorrência de digestão após um período de 5 a 7 horas reduz a glicemia pós-prandial e consequentemente a insulinemia, além de potencialmente aumentar o período de saciedade (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010).

Em um estudo com pessoas portadoras de diabetes tipo 2, Reader et al. (1997) observaram que a ingestão de AR tipo 3 por um período de 2 semanas resultou em diminuição dos níveis plasmáticos de glicose e insulina com relação à ingestão de carboidratos disponíveis pelo mesmo período. O estudo também demonstrou que alimentos contendo AR diminuíram os níveis plasmáticos de glicose pós-prandial e podem ter um papel importante na manutenção do metabolismo do diabetes tipo 2.

Segundo Brown; Storlien e Brown (2003) e Higgins (2004), o AR deve contribuir com, no mínimo, 14% do total da ingestão de amido para conferir benefícios às respostas glicêmica e insulinêmica.

Mais recentemente, um estudo demonstrou que AR reduz os níveis do m-RNA do hormônio polipeptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) no jejuno e íleo tanto em ratos saudáveis como em ratos portadores de diabetes tipo 2 (SHIMADA; MOCHIZUKI; GODA, 2008). Uma vez que os níveis de GIP são aumentados pela ingestão de carboidratos disponíveis e lipídios, e a principal ação do GIP é a de aumentar a secreção de insulina, através do estímulo às ilhotas pancreáticas, é de grande relevância que haja supressão do GIP pela ingestão de AR, poupando assim as ilhotas pancreáticas e consequentemente diminuindo o risco de diabetes tipo 2 (YIP; WOLFE, 2000).

So et al. (2007) avaliaram o impacto do AR sobre o padrão de gordura corporal e sobre a regulação do apetite em ratos, alimentados por 8 semanas com dietas ricas em amido resistente (AR) ou amido rapidamente digerível (AD). Os autores observaram que, apesar do ganho de peso ter sido semelhante entre os dois grupos, o grupo com dieta rica em AR teve maior ganho de massa magra, enquanto o grupo com dieta rica em AD teve maior ganho de peso devido ao depósito de gordura corpórea ($p < 0,05$). Além disso, os níveis de leptina plasmática encontrados no grupo com dieta contendo AD eram maiores se comparados àqueles com dieta rica em AR, o que sugere maior saciedade. Este resultado corrobora a observação de que os níveis de leptina sejam controlados pelo conteúdo de células adiposas e não pelo peso corporal em si, o que explicaria a maior concentração deste hormônio encontrada no grupo com maior número de adipócitos (grupo com dieta rica em AD).

A ingestão regular de refeições que produzem reduzida resposta glicêmica, como as estudadas no presente trabalho, pode proporcionar inúmeros benefícios relativos à redução de risco de desenvolvimento de algumas DCNT em função da redução de alguns hormônios circulantes. A adição de AR a uma refeição pode colaborar para a redução dos níveis de glicose e insulina ao longo do tempo, fatores estes de grande relevância para algumas DCNT, como o diabetes.

O AR tem potencial para se tornar um ingrediente altamente atrativo para as indústrias alimentícias, principalmente em produtos os quais tradicionalmente produzem altas respostas glicêmicas (NUGENT, 2005).

4.4.2 Teste de tolerância à glicose (GTT) antes e após a ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias

O presente ensaio avaliou o efeito da ingestão diária de FBV por 14 dias em voluntários saudáveis sobre a tolerância à glicose através do Teste de Tolerância à Glicose (GTT), realizado antes e após o tratamento com FBV.

Como pode ser observado na **Figura 14**, as curvas glicêmicas em resposta à glicose oral possuem o mesmo perfil antes (GTT 1) e após (GTT 2) os 14 dias de ingestão diária de FBV, porém a curva do GTT 2 teve uma diminuição no pico (30 min) e ao longo dos tempos 60, 90 e 120 min, apesar de não significativa.

Figura 14. Teste de tolerância à glicose (GTT) de voluntários saudáveis (n=14), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 12 dias. GTT1 - teste antes do tratamento; GTT 2 - teste após 12 dias de tratamento.

As áreas sob as curvas de glicose e insulina foram calculadas e os resultados estão apresentados na **Figura 15**. Diferentemente das curvas glicêmicas (**Figura 14**), as ASC tanto de glicose (**Figura 15 (A)**) como de insulina (**Figura 15 (B)**) apresentaram diferenças significantes quando comparadas antes (GTT 1) e após (GTT 2) o tratamento com FBV por 12 dias, sugerindo que houve menor secreção de insulina para uma mesma quantidade

de glicose ingerida, após o tratamento com FBV, o que implica em maior sensibilidade à insulina.

Figura 15. Área sob a curva (ASC) de glicose (A) e insulina (B) de voluntários saudáveis (n=14), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 12 dias. GTT 1 - teste antes do tratamento; GTT 2 - teste após 12 dias de tratamento.

Scribner et al. (2008) avaliaram o efeito a longo prazo do índice glicêmico da dieta sobre a adiposidade corporal e a tolerância à glicose em ratos alimentados por 38 semanas com dois tipos de ração: uma com baixo IG e outra com alto IG (rica em AR). Ao final do ensaio, os pesquisadores observaram através da aplicação do teste de tolerância à glicose (GTT) que os animais alimentados com dieta de baixo IG apresentaram menor resposta insulínica que os do grupo alto IG. Além disso, os animais alimentados com dieta de alto IG apresentaram 40% mais gordura corporal que o grupo com dieta de baixo IG. Com esses resultados, os autores concluíram que a velocidade de digestão influencia a composição corporal e a sensibilidade à insulina e que, consequentemente, o consumo de alimentos com alto IG pode, ao longo do tempo, promover resistência à insulina e ganho de peso.

Ventura et al. (2009), em estudo com adolescentes com sobrepeso (n = 49), avaliou o efeito do aumento na ingestão de fibra alimentar (FA) sobre fatores relacionados ao risco de diabetes tipo 2. Os adolescentes que consumiram maior quantidade de FA que o habitual (ou seja, no mínimo 1 xícara de chá a mais de feijão por dia), durante o período de 16 semanas, apresentaram significativa melhora em fatores de risco para diabetes tipo 2, especialmente no que se refere à resposta insulínica no teste de tolerância à glicose. A diminuição na resposta insulínica à glicose oral indica uma redução

na secreção de insulina em resposta a um aumento na sensibilidade à insulina. Se há aumento na sensibilidade à insulina, menos insulina é necessária para uma mesma quantidade de glicose plasmática, fazendo, portanto, com que haja menor secreção de insulina.

Assim como sugerem Ventura et al. (2009), a promoção do consumo de alimentos ricos em FA pode significar uma eficiente estratégia de saúde pública para a diminuição do risco de diabetes tipo 2.

4.4.3 Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre fome e saciedade

A fome e a saciedade após a ingestão diária de FBV, por 14 dias, foram avaliadas por dois instrumentos. Assim como no ensaio de curta duração, primeiramente foi utilizada a escala bipolar de Holt.

A **Figura 16** apresenta as ASC obtidas através deste instrumento.

Figura 16. Área sob a curva (ASC) para escala bipolar de Holt, para avaliação de fome/saciedade (fome extrema=0) em voluntários saudáveis (n=14), durante 180 min, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias. RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Outro instrumento utilizado foi o teste de escala visual (VAS – *Visual Analogue Scale*), ancorados entre nenhuma fome (0 mm) e extremamente faminto (100 mm), para medir parâmetros relacionados à fome e saciedade (**Figura 17**). Como pode ser observado na **Figura 17**, a sensação de fome (A) (Você está com fome agora?) foi reduzida pela adição de FBV (RF) apenas no tempo 180 min. Diferenças nesse mesmo tempo (180 min) foram encontradas

nos parâmetros que refletem a perspectiva de consumo (B) (Você poderia comer agora?) e saciedade (C) (Você está saciado agora?). Estes resultados estão de acordo com a concentração plasmática de grelina após o tratamento com FBV (RC14), que foi significativamente menor ($p < 0,05$) no tempo 180 min, quando comparada à RC0 (Tabela 31). Com relação ao parâmetro desejo de comer (D) (Você poderia comer agora?), foi observada diferença apenas no tempo 120 min. Não foram encontradas diferenças no parâmetro sede (dados não apresentados).

Figura 17. Variação da (A) fome, (B) perspectiva de consumo, (C) saciedade e (D) desejo de comer em voluntários saudáveis (n=14) durante 180 min, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias. RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC após 14 dias de tratamento. *diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

A Tabela 36, a seguir, apresenta a correlação entre fome e saciedade e os níveis plasmáticos de hormônios gastrintestinais. A grelina apresentou boa correlação direta com a fome e, como esperado, indireta com a saciedade. Por sua vez, tanto a insulina como a leptina apresentaram correlação direta com a saciedade e indireta com a fome.

Tabela 36. Correlação entre parâmetros de fome e saciedade e hormônios gastrintestinais plasmáticos, após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

	Fome/ Grelina	Saciedade/ Grelina	Fome/ Insulina	Saciedade/ Insulina	Fome/ Leptina	Saciedade/ Leptina
RC0	0,9898	-0,9945	-0,7835	0,8860	-0,9898	0,9884
RC14	0,9882	-0,9765	-0,9014	0,8874	-0,9882	0,9266

RC0 - refeição controle antes do tratamento

RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento.

Cani et al. (2006) estudaram a ingestão de oligofrutose por duas semanas em estudo *crossover* randomizado, com *wash-out*, em 10 voluntários, de ambos os gêneros, e observaram os voluntários em três refeições (desjejum, almoço e jantar) antes e após o tratamento. Os autores observaram que a ingestão desse frutano elevou a saciedade no desjejum e no jantar, e reduziu a fome e a perspectiva de consumo no jantar; a ingestão energética foi menor no desjejum e almoço e também no total diário. Esses achados levaram os autores a sugerir que a oligofrutose (que, assim como o AR, resiste à digestão no intestino delgado e sofre fermentação pela microbiota colônica) pode auxiliar no controle do consumo alimentar para pessoas com sobrepeso e portadores de obesidade.

Tabela 37. Ingestão energética (média, mediana, mínima e máxima (kJ)) e variação percentual (%) em duas refeições subsequentes (lanche e almoço), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

		Lanche (kJ) (após 180 min)	Almoço (kJ) (após 360 min)	Energia total (kJ) (após 360 min)
RC0	Média	1972	1832	4062
	Mediana	1923	1936	3832
	Mínimo	1282	1263	2654
	Máximo	3205	2673	7233
	Variação %	100^a	100^a	100^a
RC14	Média	1709	1597	3421
	Mediana	1923	1658	3649
	Mínimo	641	884	1883
	Máximo	2564	2256	5225
	variação %	87^a	87^b	84^b

RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento.

Médias da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste t de Student, $p < 0,05$).

Como pode ser observado na **Tabela 37**, houve redução de ingestão energética após a ingestão diária de FBV por 14 dias (RC14) em relação ao consumo antes do tratamento (RC0). Para a refeição RC14, a redução foi de 13% no lanche e 13% no almoço ($p < 0,05$). Essa diferença percentual observada representou uma redução média de 16% do total energético ingerido após o tratamento ($p < 0,05$) (**Figura 18**).

Figura 18. Ingestão energética posterior (lanche - 180 min e almoço - 360 min) à ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis ($n=14$). RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento. Total = lanche + almoço. *diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Essa redução energética confirma a relação com a menor concentração plasmática de grelina aos 180 min, observado no estudo de liberação de hormônios gastrintestinais (**Figura 12**).

4.4.4. Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre o *status* antioxidante

No presente ensaio foi avaliado o efeito da ingestão diária de FBV, por 14 dias em voluntários saudáveis, sobre a capacidade antioxidante no plasma e urina, esta foi quantificada antes e após o tratamento com FBV.

A atividade antioxidante do plasma é um biomarcador inespecífico utilizado para avaliar o *status* antioxidante, refletindo a situação global e considerando os antioxidantes endógenos e exógenos do plasma. Como no ensaio de curta duração, atividade antioxidante no plasma foi quantificada pelos métodos: capacidade de absorção do radical oxigênio (*oxygen radical absorbance capacity* – ORAC) e capacidade sequestrante do DPPH.

Pode ser observado nos resultados normalizados (**Tabela 38**), que as respostas de capacidade antioxidante no plasma apresentaram o mesmo perfil antes (RC0) e após (RC14) os 14 dias de ingestão diária de FBV, para os dois métodos empregados. Estudos de longa duração mostraram que a ingestão diária de alimentos ricos em compostos fenólicos ou outros antioxidantes geralmente não altera a capacidade antioxidante no plasma após o período de ingestão (FERNANDEZ-PANCHÓN et al., 2008).

Tabela 38. Capacidade antioxidante no plasma (% dados normalizados), analisada pelos métodos capacidade sequestrante do DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14)

Tempos (h)	ORAC		DPPH	
	RC0	RC14	RC0	RC14
0	100	100	100	100
0,5	104 ± 10 ^a	106 ± 9 ^a	117 ± 8 ^a	102 ± 9 ^a
1	110 ± 14 ^a	112 ± 10 ^a	114 ± 1 ^a	99 ± 12 ^a
2	110 ± 13 ^a	110 ± 7 ^a	113 ± 12 ^a	98 ± 12 ^a
3	110 ± 17 ^a	111 ± 8 ^a	110 ± 14 ^a	96 ± 6 ^a

RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC após 14 dias de tratamento. Resultados expressos como média ± EP. Média da mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

Semelhantes resultados aos do plasma foram observados na urina, quantificada pelo método de DPPH, após 14 dias de ingestão da FBV (**Figura 19**).

Figura 19. Atividade antioxidante da urina após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias em voluntários saudáveis (n=14). RC0 - refeição controle antes do tratamento. RC14 – RC0 após 14 dias de tratamento. Dados normalizados (%).

Dessa forma, apesar da FBV apresentar capacidade antioxidante *in vitro* e elevada fermentabilidade, sua ingestão diária em quantidade que altera diversos parâmetros fisiológicos (como saciedade, funcionamento intestinal, liberação de hormônios gastrintestinais e GTT) não proporciona qualquer alteração no *status* antioxidante no organismo, além do aumento pós-prandial inerente à própria refeição. Pode-se concluir que com as técnicas disponíveis até o momento, para avaliar o *status* antioxidante, nem sempre a capacidade antioxidante de alimentos observada *in vitro* reflete o perfil antioxidante pós-prandial.

4.4.5. Efeito da ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias sobre o funcionamento intestinal

A refeição controle (RC), no ensaio de curta duração, melhorou o funcionamento intestinal em relação ao relatado antes de sua ingestão. Provavelmente este feito é decorrente do significativo conteúdo de FA nas refeições e está de acordo com os resultados da meta-análise elaborada por Elia e Cummings (2007), que ressalta a importância de FA proveniente de vegetais para garantir efeito positivo no funcionamento intestinal.

No ensaio de média duração, os voluntários consumiram refeição controle antes (RC0) e após (RC14) 14 dias de ingestão diária de FBV. Antes do tratamento, 50% dos voluntários (n = 14) reportaram ter hábito intestinal diário (ao menos 1 vez por dia); a mesma informação foi dada por 79% dos voluntários 24 h após a ingestão de RC0 e este número aumentou para 93% após a ingestão de RC14, conforme mostra a **Figura 20**. Portanto, para voluntários saudáveis, a ingestão diária de FBV por 14 dias provocou aumento na frequência das evacuações.

Resultados semelhantes de frequência de funcionamento intestinal foram observados por Klessen et al. (1997), em idosos constipados com ingestão diária de inulina 20 g e 40 g, do 1º ao 9º e do 10º ao 19º dia, respectivamente. Em relação à consistência das fezes, antes da ingestão, esta que era dura em 11% e normal em 89% dos voluntários, (RC14) 3%, normal em 72%, pastosa em 22% e aquosa em 0%. Estes resultados mostram que a

adição de inulina proporcionou melhoria na consistência das fezes, com relato de fezes pastosas e sem ocorrência de diarreia.

Figura 20. Funcionamento intestinal em voluntários saudáveis (n=14), após ingestão diária de farinha de banana verde (FBV) por 14 dias. Resultados expressos em porcentagem de voluntários antes e após 24 h da ingestão das refeições (RC0 - refeição controle antes do tratamento; RC14 - RC0 após 14 dias de tratamento). *Flatulência, dor e distensão abdominal.

Heijnen et al. (1998), em um estudo crossover duplo-cego randomizado, avaliaram os efeitos de uma suplementação diária de AR, por um período de 4 semanas, sobre parâmetros relacionados ao funcionamento intestinal e fermentação colônica em homens saudáveis (n = 24). Por 4 semanas, os voluntários consumiram placebo (glicose) ou AR tipo 2 (32 g por dia). Os autores observaram aumento significativo no volume fecal no grupo que consumiu AR, além de aumento no número de evacuações diárias ($p < 0,05$), porém houve também aumento nos relatos de desconforto, principalmente flatulência. Com relação aos parâmetros de fermentação colônica, Heijnen et al. (1998) não observaram diferenças significantes no pH fecal e na concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes entre os grupos.

A ingestão diária de FBV por 14 dias ampliou o número de indivíduos com frequência diária de evacuação, reduziu o número de indivíduos com fezes de consistência dura, sem ocasionar diarreia, e não ampliou relatos de desconforto, além dos mencionados antes do tratamento.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A FBV (base integral) é uma fonte concentrada de carboidratos não disponíveis (64%), com 56% de AR e 8% de FA, apresenta baixo conteúdo de açúcares solúveis e amido disponível, proporcionando reduzido valor energético (316 kJ/ 100 g). A FBV apresenta grânulos de amido sem ruptura, boa qualidade microbiológica, e sua FND é de elevada fermentabilidade *in vitro*.
- Em ensaio com animais, a adição de FBV na ração proporcionou um produto com 5% de AR e elevada fermentabilidade *in vitro*, resultando em expressiva produção de AGCC totais, principalmente butirato.
- Após consumo das rações R-C (controle) e R-F (com FBV), por 28 dias, os animais apresentaram aumento na umidade e peso seco das fezes, assim como elevada produção de AGCC, principalmente butirato, na fermentação *in vivo*. Também foi observado maior peso da parede do ceco e menor pH do conteúdo cecal dos animais do Grupo FBV.
- Nas análises histológicas realizadas nos tecidos do ceco, os animais do Grupo FBV apresentaram maior índice metafásico (5,27%) que os do Grupo C (4,36%), o que indica maior divisão celular no tecido cecal desses animais. Também foi observado que o Grupo FBV teve um aumento no número de células por cripta, se comparado ao Grupo C (78 e 60, respectivamente), o qual ocorreu na região basal da cripta para ambos os grupos. Paralelamente, foi observada maior profundidade nas criptas do Grupo FBV em relação ao Grupo C (117,2 μm e 98,4 μm , respectivamente).
- Através do teste de tolerância à glicose (GTT), observou-se que houve menor liberação de insulina para a manutenção de um mesmo nível de glicose sanguínea no Grupo FBV, em comparação ao Grupo C, nos tempos 15, 20 e 30 min. Além disso, também ocorreu menor secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas isoladas do Grupo FBV em comparação ao Grupo C, em resposta a doses crescentes de glicose. Esses resultados demonstram que a ração contendo 5% de AR, proveniente da FBV, possivelmente interfere na liberação de insulina, em médio prazo.
- Em ensaio com humanos saudáveis, a ingestão de uma única refeição adicionada de FBV proporcionou significativa saciedade, resultando em uma

redução média de 586 kJ (140 kcal) ou 15% do total energético ingerido nas refeições subsequentes (lanche, após 180 min e jantar após, 360 min) e boa correlação entre os parâmetros fome/ saciedade e níveis plasmáticos de grelina e insulina.

- A adição de FBV na refeição resultou em positiva variação pós-prandial nas concentrações plasmáticas de hormônios gastrintestinais em relação à refeição controle, proporcionando menor aumento de grelina (180 min) e insulina (30 min) (hormônios relacionados à fome em alta concentração) e menor redução de leptina (hormônio responsável pela saciedade).

- As duas refeições (RC - controle e RF - RC adicionada de FBV) apresentaram baixo IG e baixa CG (n = 15).

- A adição de FBV na refeição resultou em alta fermentabilidade *in vitro* em relação à lactulose, sugerindo a possível participação dos AGCC na variação plasmática de grelina, insulina e leptina, e consequentemente no aumento da saciedade.

- A adição de FBV, em refeição com moderado conteúdo de FA, melhorou o funcionamento intestinal em relação à frequência de evacuações e consistência das fezes, sem aumentar o desconforto intestinal anteriormente reportado.

- Após ingestão diária da FBV por 14 dias, os resultados da ingestão de RC0 (refeição controle antes do tratamento) e de RC14 (RC0 após 14 dias de tratamento), evidenciaram efeito positivo sobre a saciedade, com redução média de 641 kJ (154 kcal) ou de 16% do total energético ingerido nas refeições subsequentes (lanche, após 180 min e jantar após, 360 min) e menor aumento de grelina plasmática (120 e 180 min).

- Através do teste de tolerância à glicose (GTT), foi possível observar que a ingestão diária de FBV diminuiu a ASC de insulina e de glicose, estimulando menor liberação de insulina.

- O efeito positivo sobre o funcionamento intestinal permaneceu após ingestão prolongada da FBV.

- A adição de FBV (com elevado conteúdo de carboidratos não disponíveis, possivelmente contendo fibra antioxidante) na refeição, proporcionou significativo aumento da capacidade antioxidante *in vitro* em relação ao controle, porém a ingestão dessa refeição não alterou a capacidade

antioxidante no plasma e urina. De acordo com as técnicas disponíveis até o momento para avaliação do *status* antioxidante *in vivo*, nem sempre a capacidade antioxidante observada *in vitro* reflete o perfil antioxidante pós-prandial.

6. CONCLUSÃO

A FBV é uma fonte concentrada de carboidratos não disponíveis, com 56% de AR e 8 % de FAT (base integral), de baixo valor energético, e de elevada fermentabilidade *in vitro*. Sua adição na ração de animais ou em refeição resultou em produtos com alto conteúdo de AR, de alta fermentabilidade *in vitro* e com significativa produção de butirato.

O consumo de ração com FBV por 28 dias proporcionou efeito trófico no ceco dos ratos e estimulou uma reduzida liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas para manutenção de um mesmo nível de glicose sanguínea.

O consumo de uma única refeição com FBV por voluntários saudáveis proporcionou melhora no funcionamento intestinal e aumento na saciedade, com redução média de 15% do total energético ingerido nas refeições subsequentes. O aumento plasmático de leptina e diminuição da insulina e grelina corroboram com o efeito sobre a saciedade.

O consumo diário por 14 dias de FBV proporcionou redução na liberação de insulina plasmática, evidenciada no GTT, além de continuar a gerar efeito positivo sobre saciedade e funcionamento intestinal.

A FBV apresenta características positivas para ser utilizada como ingrediente funcional, sendo evidenciado em voluntários saudáveis e/ ou ratos uma série de efeitos positivos, como aumento da saciedade, melhora do funcionamento intestinal e aumento da tolerância à glicose. Esses efeitos podem ser parcialmente explicados por produtos gerados na fermentação colônica da FBV, principalmente butirato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Legislação de Boas Práticas de Fabricação. **Ministério da Saúde (Br)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/bpf.htm>> Acesso em: 31 março 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n.º 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Ministério da Saúde (Br)**, Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm> Acesso em: 31 março 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução - RDC nº 12 de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **ANVISA**, jan. 2001.
- AGOPIAN, R. G. D et al. Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 3305-10, 2008.
- AHMED, R. L et al. The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. **Cancer**, v. 107, p. 28-36, 2006.
- ARA, I et al. Serum free testosterone, leptin and soluble leptin receptor changes in a 6-week strength-training programme. **Brit J Nutr**, v. 96, p. 1053-9, 2006.
- ARAI, S et al. A mainstay of functional food science in Japan - history, present status and future outlook. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2001.
- ARCHER, B. J et al. Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. **Brit J Nutr**, v. 91, n. 4, p. 591-9, 2004.
- ASP, N. G.; VAN AMELSVOORT, J. M. M; HAUTUAST, J. G. A. EURESTA physiological implication of consumption of resistant starch in man. (European FLAIR - concerted action n.11 - COST 911). Flair [Proceedings of the concluding, plenary meeting of EURESTA];1994. 204 p.
- AUORE, G.; PARFAI, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 78-91, 2009.
- BALL, S. D et al. Prolongation of satiety after low versus moderately high glycemic index meals in obese adolescents. **Pediatrics**, v. 111, p. 488-94, 2006.
- BARCLAY, A. W et al. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk - a meta-analysis of observational studies. **Am J Clin Nutr**, v. 87, p. 627-37, 2008.
- BARKOUKIS, H et al. High glycemic meal suppresses the postprandial leptin response in normal healthy adults. **Ann Nutr Metab**, v. 51, n. 6, p. 512-8, 2007.
- BARRETO, S. M et al. Análise da estratégia global para alimentação, atividade física e saúde, da Organização Mundial da Saúde. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 14, n. 1, p. 41-68, 2005.
- BARRY, J. L et al. Estimation of the fermentability of dietary fiber *in vitro*: a European interlaboratory study. **Br J Nutr**, v. 74, n. 3, p. 303-22, 1995.
- BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; DA SILVA, M. A. A. P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Bol SBCTA**, v. 34, n. 2, p. 99-106, 2001.
- BENINI, L et al. Gastric emptying of a solid meal is accelerated by the removal of dietary fibre naturally present in food. **Gut**, v. 36, p. 825-30, 2005.
- BERGMEYER, H. U.; BERNET, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods Enzymatic Analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1974. p. 205-15.
- BJÖRCK, I. Starch: nutritional aspects. In: ELIASSON, A. C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 505-53.
- BODINHAM, C. L.; FROST, G. S.; ROBERTSON, M. D. The acute effects of resistant starch on appetite and satiety. **Proc Nutr Soc**, v. 67, p. 67-157, 2008.

- BORNET, F. R. J et al. Glycaemic response to foods: Impact on satiety and long-term weight regulation. **Appetite**, v. 49, p. 535-53, 2007.
- BOUHNİK, Y et al. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1658-64, 2004.
- BRAND-MILLER, J. C. Glycemic load and chronic disease. **Nutr Rev**, v. 61, n. 5, p. 49-55, 2003.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.-The quantitative analysis of phenolic constituents. **Lebensm Wiss Technolog**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BROUNS, F et al.. Glycaemic index methodology. **Nutr Res Rev**, v. 18, p. 145-71, 2005.
- BROWN, M. A.; STORLIEN, L. H.; BROWN, I. L. Cooking attenuates the ability of high amylase meals to reduce plasma insulin concentrations in rats. **Br J Nutr**, v. 90, p. 823-827. 2003.
- BRUNSGAARD, G. Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. **J Anim Sci**, v. 76(11), p. 2787-98, 1998.
- BURLEY, V. J.; LEEDS, A. R.; BLUNDELL, J. E. The effect of high and low fibre breakfast in hunger, satiety and food intake in a subsequent meal. **Int J Obes**, v.11, p. 87-93, 1987.
- BURLEY, V. J.; PAUL, A. W.; BLUNDELL, J.E.. Influence of a high-fibre food (myco-protein) on appetite: effects on satiation (within meals) and satiety (following meals). **Eur J Clin Nutr**, v. 47, p. 409-18, 1993a.
- BURLEY, V. J.; PAUL, A. W.; BLUNDELL, J. E. Sustained post-ingestive action of dietary fibre; effects of a sugar-beet-fibre-supplemented breakfast on satiety. **J Hum Nutr Diet**, v. 6, p. 253-60, 1993b.
- BURTON-FREEMAN, B. Dietary fiber and energy regulation. **J Nutr**, v. 130(suppl), p. s272-5, 2000.
- BUTTRISS, J. L.; STOKES, C. S. Dietary fibre and health: an overview. **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, p.186-200, 2008.
- BRUNSGAARD, G. Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. **J Anim Sci**, v. 76, p. 2787-98, 1998.
- CAMBRODÓN, I. G.; MARTIN-CARRÓN, N. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. In: LAJOLO, F.M et AL (Ed.). **Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Sao Paulo: Livraria Varela. 2001. p. 311-17.
- CANI, P. D et al. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. **Eur J Clin Nutr**, v. 60, p. 567-72, 2006.
- CARDENETTE, G. H. L. **Produtos derivados de banana verde (*Musa spp.*) e sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica**. 2006. Tese. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- CARVALHO, M. H. C. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Card**, v.8(Suppl. I), p. 1-27, 2008.
- CASSIDY, A.; BINGHAM, S. A.; CUMMINGS, J. H. Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. **Br J Cancer**, v. 69, p. 937-42, 1994.
- CHACRA, A. R.; DIB, S. A. Diabetes Melito. In: PRADO, F. C.; RAMOS, J. A.; Do VALLE, J. R. (eds). **Atualização Terapêutica – Manual prático de diagnóstico e tratamento**. 21.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2003, seção 5, p. 391-404.
- CHAMP, M et al. Advances in dietary fibre characterization: consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labeling. **Nutr Research Rev**, v. 16, p. 143-61, 2003.

- CHOCT, M.; ILLMAN, R. J.; BIEBRICK, D. A.; TOPPING, D. L. White and wholemeal flours from wheats of low and higher apparent metabolisable energy differ in their nutritional effects in rats. **J Nutr**, v.128, p. 234-8, 1998.
- COMALADA, M et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 132, p. 487-97, 2006.
- CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate syntase. **J Agric Food Chem**, v. 43, n. 2, p. 347-51, 1995.
- CORDENUNSI, B. R.; MENEZES, E. W.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M. Composição em carboidratos em banana verde e madura de diferentes cultivares. **Seminário del Proyecto de Investigación Precompetitiva CYTED XI.8**. Quito, 2000. p. 15-22. [Anais da Conferência realizada em Baños, Ecuador. September 2-4, 1998].
- CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 26-31, 2008.
- CRISPIM, C. A et al. The influence of sleep and sleep loss upon food intake and metabolism. **Nut Res Rev**, v. 20, n. 2, p. 195-212, 2007.
- CUMMINGS, J. H et al. Digestion and physical properties of resistant starch in the human large bowel. **Br J Nutr**, v. 75, p. 733-47, 1996.
- CUMMINGS, J. H et al. Physiological effect of resistant starch in the large bowel. [**Proceedings of the Concluding Plenary Meeting of EURESTA**, ed. ASP, N.G.; van Amelsvoort, J.M.M & HAUTVAST, J.G.A.J.]. Wageningen, p. 38-55, 1994.
- CUMMINGS, J. H.; ENGLYST, H. N. Gastrointestinal effects of food carbohydrates. **Am J Clin Nutr**, v. 61(Suppl), p. 938S-45S, 1995.
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutrition**, v. 13, n. 5, p. 476-8, 1997.
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control of bacterial fermentation in the human colon. **J Appl Bacteriol**, v. 70, p. 443-59, 1991.
- CUMMINS, A. G.; JONES, B. J.; THOMPSON, F. M. Postnatal epithelial growth of the small intestine in the rat occurs by both crypt fission and crypt hyperplasia. **Dig Dis Sci**, v. 51, n. 4, p. 718-23, 2006.
- DA MOTA, R. V et al. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. **Starch/ Stärke**, v. 2, p. 63-8, 2000.
- DAN, M. C. T. **Efeito trófico dos carboidratos não disponíveis de banana/plátano verde sobre o intestino grosso de ratos adultos**. 2007. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DANONE VITAPOLE/ FAO. *Glycemic index and health: the quality of the evidence*. John Libbey Eurotext. Nutrition and Health Collection, France, 48p, 2001.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance (ORAC) assay. **J Agric Food Chem**, v. 52, p. 48-54, 2004.
- DE GREEF, C. The validity of appetite ratings. **Appetite**, v. 21, p. 156-60, 1993.
- DEHGHAN-KOOSHKHAZI, M.; MATHERS, J. C. Starch digestion, large-bowel fermentation and intestinal mucosal cell proliferation in rats treated with the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. **Br J Nutr**, v. 91, n. 3, p. 357-65, 2004.
- DELZENNE, N. M et al. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. **Brit J Nutr**, v. 93(Suppl1), p. 157-61, 2003.
- DIPLOCK, A. T et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **Br J Nutr**, v. 81(suppl.1), p. 5S-27S, 1999.
- DITCHFIELD, C. **Estudo do Processamento contínuo do purê de banana (*Musa cavendishii* Lamb.)**. 2004. Tese. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- DRONAMRAJU, S. S.; COXHEAD, J. M.; KELLY, S. B.; BURN, J.; MATHERS, J. C. cell kinetics and gene expression changes in colorectal cancer patients given resistant starch: a randomized controlled trial. **Gut**, v. 58, p. 413-20, 2009.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO E MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, p. 446-52, 2006.
- EL KHOURY, D. T et al. Variations in postprandial ghrelin status following ingestion of high-carbohydrate, high-fat and high-protein meals in males. **Ann Nutr Metab**, v. 50, p. 260-9, 2006.
- ELIA, M.; Cummings, J. H. Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. **Eur J Clin Nutr**, v. 61(Suppl 1), p. S40-74, 2007.
- ELWIG, J. E.; GAO, F.; DAVIDSON, N. O.; EARLY, D. S. Type 2 diabetes mellitus: the impact on colorectal adenoma risk in women. **Am J Gastroenterol**, v. 101, p. 1866-71, 2006.
- EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargenda Online - Ano I nº 31 - Semana de 8 a 14 de agosto de 2005.
- ENGLYST, H. N et al. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. **Brit J Nutr**, v. 75, p. 749-55, 1996.
- ENGLYST, H. N.; MACFARLANE, G. T. Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria. **J Sci Food Agric**, v. 37, p. 699-706, 1986.
- ERDMANN, J et al. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 3048-54, 2004.
- FAISANT, N et al. Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. **Brit J Nutr**, v.73, p. 111-23, 1995.
- FAIVRE, J.; BOUTRON, M. C.; QUIPOURT, V. Diet and large bowel cancer. In: ZAPPIA V. **Adv Nutr Cancer**. New York: Plenum Press; p. 107-18, 1993.
- FÄSSLER, C et al. Fermentation of resistant starches: influence of *in vitro* models on colon carcinogenesis. **Nutr Cancer**, v. 58, n. 1, p. 85-92, 2007.
- FERNANDEZ-PANCHÓN, M. S et al. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. **Crit Rev Food Sci**, v. 48, p. 649-71, 2008.
- FERGUSON, L. R.; TASMAN-JONES, C.; ENGLYST, H.; HARRIS, P. J. Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. **Nutrition & Cancer**, V. 36, P. 230-7, 2000.
- FLINT, A et al. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. **Int J Obes**, v. 24, n. 1, p. 38-48, 2000.
- FOLKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **Int Dairy J**, v. 9, p. 53-61, 1999.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO) (1998). Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation. Food and Nutrition Paper, v. 66, 140p., Roma. **FAO/WHO**, Abril 1997.
- FORD, H.; FROST, G. Session 3 (Joint with the British Dietetic Association): Management of obesity. Glycaemic index, appetite and body weight. **Proc Nutr Soc**, v. 69, p. 199-203, 2010.
- FREELAND, K. R.; ANDERSON, G. H.; WOLEVER, T. M. S. Acute effects of dietary fibre and glycaemic carbohydrate on appetite and food intake in healthy males. **Appetite**, v. 52, p. 58-64, 2009.
- FRENCH, S.; CASTIGLIONE, K. Recent advances in the physiology of eating. **Proc Nutr Soc**, v. 61, p. 489-96, 2002.
- FUENTES-ZARAGOZA, E et al. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Res Int**, v. 43, p. 931-42, 2010.

- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 177-91, 1997.
- GIBSON, G. R et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr Res Rev**, v. 17, p. 259-75, 2004.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v. 125, p. 1401-12, 1995.
- GIBSON, P. R et al. Colonic epithelial cell activation and the paradoxal effects of butyrate. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 4, p. 539-44, 1999.
- GIL-CAMPOS, M et al. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. **Br J Nutr**, v. 96, p. 201-26, 2006.
- GIOVANNUCCI, E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. **Am J Clin Nutr**, v. 86 (suppl), p. 836S-42S, 2007.
- GOÑI, I et al. Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 840-6, 2009.
- GOVINDJI, A. The role of carbohydrates in a healthy diet. **Nurs Stand**, v. 21, n. 3, p. 56-64, 2006.
- GRAY, J. Dietary fibre - Definition, analysis, physiology and health. **ILSI Europe Consise Monograph Series**. Bélgica: ILSI Europe, 2006.
- GRUNDY, S. M. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. **Nat Rev Drug Disc**, v. 5, p. 295-309, 2006.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 639p.
- HARALAMPU, S. G. Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 285-92, 2000.
- HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH. **The nutrition source carbohydrates and the glycemic load**. Disponível em: <<http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-should-you-eat/carbohydrates-and-the-glycemic-load/>> Acesso em: 30 maio 2010.
- HEDEMANN, M. S.; THEIJ, P. K.; KNUDSEN, K. E. B. The thickness of the intestinal mucous layer in the colon of rats fed various sources of non-digestible carbohydrates is positively correlated with the pool of SCFA but negatively correlated with the proportion of butyric acid in digesta. **Br J Nutr**, v. 102, p. 117-25, 2009.
- HEIJNEN, M. L et al. Limited effect of consumption of uncooked (RS2) or retrograded (RS3) resistant starch on putative risk factors for colon cancer in healthy men. **Am J Clin Nutr**, v. 67, p. 322-31, 1998.
- HERNOT, D. C et al. *In vitro* fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 1354-61, 2009.
- HIGGINS, J. A. Resistant starch: Metabolic effects and potential health benefits. **J AOAC Int**, v. 887, n. 3, p. 761-8, 2004.
- HOLLOWAY, L et al. Effects of oligofructose-enriched inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium and bone turnover markers in postmenopausal women. **Br J Nutr**, v. 97, p. 365-72, 2007.
- HOLT, S. H. A et al. A satiety index of common foods. **Eur J Clin Nutr**, v. 49, p. 675-90, 1995.
- HORWITZ, W.; LATIMER JR, G. W. (Ed). **Official methods of analysis of AOAC International**. Ed. 18. Maryland: AOAC International, 2006.
- HOUMARD, J. A et al. Effect of short-term exercise training on leptin and insulin action. **Metabolism**, v. 49, p. 858-61, 2000.
- HOWARD, M. D et al. Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. **J Nutr**, v. 125, p. 2604-9, 1995.

- HOWARTH, N. C.; SALTZMAN, E.; ROBERTS, S. B. Dietary fibre and weight regulation. **Nutr Rev**, v. 59, p. 129-39, 2001.
- HOWLETT, J.; ASHWELL, M. Glycemic response and health: summary of a workshop. **Am J Clin Nutr**, v. 87(Suppl), p. s212-216, 2008.
- HYLLA, S et al. Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. **Am J Clin Nutr**, v. 67, p. 136-42, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/default.shtm>> Acesso em: janeiro de 2008.
- ISAKSSON, H et al. Effect of rye bread breakfasts on subjective hunger and satiety: a randomized controlled trial. **Nutr J**, v.8, p. 39, 2009.
- ISAKSSON, H et al. Whole grain rye porridge breakfast improves satiety compared to refined wheat bread breakfast. **Food Nutr Res**, v. 52, p. 1-7, 2008.
- JENKINS, D. J. A et al. Too much sugar, too much carbohydrate, or just too much? **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 711-2, 2004.
- JENKINS, D. J. A et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrates exchange. **Am J Clin Nutr**, v. 34, p. 362-6, 1981.
- JOHNSON, I. T. Impact of resistant starch on colonic crypt cytokinetics and cell cycle regulatory genes. **Gut**, v. 58, p. 327-8, 2009.
- JONES, P. J. Clinical nutrition: Functional foods more than just nutrition. **Can Med Assoc J**, v. 166, n. 12, p. 1555-63, 2002.
- JOSHUPURA, K. J et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. **Ann Intern Med**, v. 134, n. 12, p. 1106-14, 2001.
- KARHUNEN, L. J et al. A psyllium fiber-enriched meal strongly attenuates postprandial gastrointestinal peptide release in healthy young adults. **J Nutr**, v. 140, n. 4, p. 737-44, 2010.
- KLESSSEN, B.; STOOFF, G.; PROLL, J.; SCHMIEDL, D.; NOACK, J.; BLAUT, M. Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. **J Anim Sci**, v. 75, p. 2453-62, 1997.
- KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. **Obes rev**, v. 8, p. 21-34, 2007.
- KONG, A et al. Higher habitual intake of dietary fat and carbohydrates are associated with lower leptin and higher ghrelin concentrations in overweight and obese postmenopausal women with elevated insulin levels. **Nutr Res**, v. 29, n. 11, p. 768-76, 2009.
- KRIPKE, S. A.; FOX, A. D.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. **J Parenter Enteral Nutr**, v.13, n. 2, p.109-16, 1989.
- LAJOLO, F. M. Functional foods: Latin American perspectives. **Br J Nutr**, v. 88(suppl.2), p. S145-S150, 2002.
- LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. (Ed.). **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: EDUSP, 2006. 646p.
- LAJOLO, F. M et al. **Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.
- LARSSON, S. C. ; ORSINI, N. ; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer : a meta-analysis. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, p. 1679-87, 2005.
- LE BLAY, G et al. Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. **Br J Nutr**, v. 82, p. 419-26, 1999.

- LE ROUX, C. W et al. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 2, p. 1068-71, 2005.
- LEE, S. C.; PROSKY, L.; VRIES, J. W. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **J AOAC Int**, v. 75, n. 3, p. 395-416, 1992.
- LINN, T et al. Effect of longterm dietary protein intake on glucose metabolism in humans. **Diabetologia**, v. 43, p. 1257-65, 2000.
- LIU, R.; XU, G. Effects of resistant starch on colonic preneoplastic aberrant crypt foci in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 2672-9, 2008.
- LOBO, A. R et al. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **Br J Nutr**, v. 97, p. 776-85, 2007.
- LUDWIG, D. S et al. High glycemic index foods, overeating, and obesity. **Pediatrics**, v. 103, n. 3, p. 26-31, 1999.
- LUPTON J, R. Is fiber protective against colon cancer? Where the research is leading us. **Nutrition**, v. 16, p. 7-8, 2000.
- LUPTON, J. R.; KURTZ, P. P. Relationship of colonic luminal short chain fatty acids and pH to in vivo cell proliferation in rats. **J Nutr**, v. 123, p. 1522-30, 1993.
- MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Starch utilization by human large intestinal flora. **J Appl Bacteriol**, v. 60, p. 195-201, 1986.
- MACFARLANE, S.; MACFARLANE, T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc**, v. 62, p. 67-72, 2003.
- MACHADO, U. F.; NOGUEIRA C. R.; CARPINELLI, A. R. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. **Physiol Behav**, v. 52, n. 4, p. 717-21, 1992.
- MARCHESINI, G et al. Plasma ghrelin concentrations, food intake and anorexia in liver failure. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 5, p. 2136-41, 2004.
- MARTIN, L. J. M.; DUMON, H. J. W.; CHAMP, M. M. J. Production of short-chain fatty acids from resistant starch in a pig model. **J Sci Food Agric**, v. 77, p. 71-80, 1998.
- MATTES, R. D et al. Appetite: measurement and manipulation misgivings. **J Am Diet Assoc**, v. 105(Suppl.1), p. 87-97, 2005.
- McCLEARY, B. V.; MONAGHAN, D. A. Measurement of resistant starch. **J AOAC Int**, v. 85, n. 3, p. 665-752, 2002.
- McCLEARY, B. V.; MURPHY, A.; MUGFORD, D. C. Measurement of total fructans in food by enzymic/ spectrophotometric method: collaborative study. **J AOAC Int**, v. 83, n. 2, p. 356-64, 2002.
- McCLEARY, B. V.; ROSSITER, P. Measurement of novel dietary fibres. **J AOAC Int**, v. 87, p. 707-11, 2004.
- McCULLOUGH, J. S et al. Dietary fiber and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut*, v. 42, p. 799-806, 1998.
- McKEOWN, N. M et al. Carbohydrate nutrition, insulin resistance and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. **Diabetes Care**, v. 27, p. 538-46, 2004.
- MEIER, U.; GRESSNER, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. **Clin Chem**, v. 50, p. 1511-25, 2004.
- MELO, E. A et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 26, n. 3, p. 639-44, 2006.
- MENEZES, E. W et al. *In vitro* colonic fermentation and glycemic response of different kinds of unripe banana flour. **Plant Food Hum Nutr**, v. 65, p. 379-85, 2010a.

- MENEZES, E. W et al. New information on carbohydrates in the Brazilian Food Composition Database. **J Food Comp Anal**, v. 22, n. 5, p. 446-542, 2009.
- MENEZES, E. W.; GIUNTINI, E. B.; LAJOLO, F. M. Perfil de ingestão de fibra alimentar e amido resistente pela população brasileira nas últimas três décadas. In: Lajolo, F et al. **Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud**. São Paulo: Varela, 2001. p. 433-44.
- MENEZES, E. W.; LAJOLO, F. M. **Contenido en fibra dietética y almidón resistente en alimentos y productos iberoamericanos**. Proyecto CYTED XI.6 "Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales". CYTED/CNPq. São Paulo: Docuprint; 2000.
- MENEZES, E. W.; LAJOLO, F. M. Marcadores in vivo e in vitro de carboidratos. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W (Ed). **Carboidratos en Alimentos Regionales Ibero-Americanos**. 1ed. São Paulo: EDUSP, 2006. p. 309-34.
- MENEZES, E. W.; LAJOLO, F. M.; TADINI, C.; TRIBESS, T. Processo de produção de farinha proveniente da banana verde, Instituto Nacional de Propriedade - I.N.P.I./SP, Brasil. Patente (RPI - 1941). 2008
- MENEZES, E. W.; MELO, A. T.; LIMA, G. H.; LAJOLO, F. M. Measurement of carbohydrate components and their impact on energy value of foods. **J Food Comp Anal**, v. 17, p. 331-8, 2004.
- MENEZES, E. W et al. Chemical composition and functional properties of unripe banana pulp flour (*Musa acuminata*, var. Nanicão). **Plant Food Hum Nutr** (Aceito para publicação), 2010b.
- MILNER, J. A. Functional foods: the US perspective. **Am J Clin Nutr**, v. 71(suppl.1), p. 1654S-1659S, 2000.
- MOORHEAD, S. A et al. The effects of the fibre content and physical structure of carrots on satiety and subsequent intakes when eaten as part of a mixed meal. **Br J Nutr**, v. 96, p. 587-95, 2006.
- MUIR, J. G et al. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 6, p.1020-8, 2004.
- NAKAZATO, M et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, p. 194-8, 2001.
- NASCIMENTO, J. R. O et al. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biol Tec**, v. 40, n. 1, p. 41-7, 2006.
- NEDVIDKOVA, J et al. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, p. 1678-82, 2003.
- NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 524-525, 2001.
- NOAKES, M et al. Effect of high amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. **Am J Clin Nutr**, v. 64, p. 944-51, 1996.
- NUGENT, A. P. Health properties of resistant starch. **British Nutrition Foundation, Nutr Bull**, v. 30, p. 27-54, 2005.
- OHAMA, H.; IKEDA, H.; MORIYAMA, H. Health foods and foods with health claims in Japan. **Toxicology**, v. 221, p. 95-111, 2006.
- O'KEEFE, S. J. D et al. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. **J Nutr**, v. 139, p. 2044-8, 2009.
- OVANDO-MARTINEZ, M et al. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. **Food Chemistry**, v. 113, p. 121-6, 2009.
- PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Fibra e doenças gastrointestinais. In: LAJOLO, F. M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.; MENEZES, E. W. (eds). **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Proyecto CYTED XI.6 "Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales"/ CNPq. São Paulo: Editora Varela, 2001, p.433-44.

- PERONI, F. H. G. **Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose**. 2007. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo.
- PERRIN, P et al. Only fibers promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. **Gut**, v. 48, p. 53-61, 2001.
- PRADHAN, A. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. **Nutr Rev**, v. 65, n. 12, p. S152-S6, 2007.
- PRIOR, R. L et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 3273-9, 2003.
- PRIOR, R. L et al. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter *in vivo* antioxidant status. **J Am Coll Nutr**, v. 26, n. 2, p. 170-81, 2007.
- RAMNANI, P.; GAUDIER, E.; BINGHAM, M.; Van BRUGGEN, P.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R. Prebiotic effect of fruit and vegetable shots containing Jerusalem artichoke inulin: a human intervention study. **Brit J Nutr**, v. 1, p. 1-8, 2010.
- READER, D et al. Response of resistant starch in a food bar vs. two commercially available bars in persons with type II diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 46, n. 1, p. 254, 1997.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition** (Committee Report), p.1939-51. 1993.
- RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M. A.; GAMET, L.; DEMIGNE, C. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. **Am J Physiol**, v. 264, p. 855-62, 1993.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, C. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci**, v.2, n. 4, p. 152-9, 1997.
- RIPOLL, C et al. Gastrointestinal tolerance to an inulin-rich soluble roasted chicory extract after consumption in healthy subjects. **Nutrition**, v. 26, n. 7, p. 799-803, 2009.
- ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **Br J Nutr**, v. 93, suppl.1, p. 13S-25S, 2005.
- ROBERTSON, M. D et al. Extended effect of evening meal carbohydrate/fat ratio on fasting and postprandial substrate metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 75, p. 505-10, 2002.
- ROSIN, P. M.; LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Measurement and characterization of dietary starches. **J Food Compos Anal**, v. 15, p. 367-77, 2002.
- SAJILATA, M. G et al. Resistant starch - a review. **Compr Rev Food Sci**, v.5, p. 1-7, 2006.
- SALMERON, J et al. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. **JAMA**, v. 277, p. 472-7, 1997.
- SARIS, W. H. M et al. Functional food science and substrate metabolism. **Br J Nutr**, v. 80(S1), p. 47-75, 1998.
- SAURA-CALIXTO, F et al. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 8, p. 3342-7, 2000.
- SAURA-CALIXTO, F.; JIMENEZ-ESCRIG, A. Compuestos bioactivos asociados a la fibra dietética. In: LAJOLO, F. M et al (Ed.) . **Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). Sao Paulo: Livraria Varela. 2001. p.103-26.
- SAURA-CALIXTO, F. Evolución del concepto de fibra. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W (Ed.). **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Proyecto CYTED/CNPq XI.18 "Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos". São Paulo: EDUSP. 2006. p. 235-53.

- SCHARLAU, D et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fiber. **Mutation Res**, v. 682, p. 39-53, 2009.
- SCHEPPACH, W.; BARTRAM, H. P.; RICHTER, F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. **Eur J Cancer**, v. 31A, n. 7/8, p. 1077-80, 1995.
- SCHROEDER, N et al. Comparison of energy intake and satiety for whole grain barley, wheat and refined rice. **The FASEB Journal**, v.22, p. 459-66, 2008.
- SCHWARTZ, M. V. Staying slim with insulin in mind. **Science**, v. 289, p. 2066-7, 2000.
- SCRIBNER, K. B et al. Long-term effects of dietary glycemic index on adiposity, energy metabolism, and physical activity in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. 1126-31, 2008.
- SEIFRIED, H. E et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **J Nutr Biochem**, v. 18, p. 567-79, 2007.
- SERPA, J et al. Butyrate-rich colonic microenvironment is a relevant selection factor for metabolically adapted tumor cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 50, p. 39211-23, 2010.
- SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Determination of B-carotene and lutein available from green leafy vegetables by an *in vitro* digestion and colonic fermentation method. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 8, p. 2936-40, 2005.
- SEOW, A et al. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer in the Singapore Chinese Health Study. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, p. 135-8, 2006.
- SHIMADA, M.; MOCHIZUKI, K.; GODA, T. Dietary resistant starch reduces Dietary resistant starch reduces levels of glucose-dependent insulinotropic polypeptide mRNA along the jejunum-ileum in both normal and type 2 diabetic rats. **Biosc Biotechnol Biochem**, v. 72, n. 8, p. 2206-9, 2008.
- SHIYA, T et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 240-4, 2002.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of follin-ciocalteau reagent. **Method Enzimol**, v. 299 (A), p. 152-77, 1999.
- SLAVIN, J.; GREEN, H. Dietary fibre and satiety. **Nutr Bull**, v. 32, n. 1, p. 32-42, 2007.
- SMEETS, A. J et al. Energy expenditure, satiety, and plasma ghrelin, glucagon-like peptide 1, and peptide tyrosine-tyrosine concentrations following a single high-protein lunch. **J Nutr**, v. 138, p. 698-702, 2008.
- SO, P-W et al. Impact of resistant starch on body fat patterning and central appetite regulation. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. 1309-17, 2007.
- SPRUIJT-METZ, D et al. A high-sugar/low-fiber meal compared with a low-sugar/high-fiber meal leads to higher leptin and physical activity levels in overweight latin females. **J Am Diet Assoc**, v. 109, n. 6, p. 1058-63, 2009.
- ST-PIERRE, D. H et al. Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 92, p. 264-9, 2007.
- ST-PIERRE, D. H et al. Fiber intake predicts ghrelin levels in overweight and obese postmenopausal women. **J Clin Endocrinol**, v. 161, p. 65-72, 2009.
- STEPHEN, A. M. Regulatory aspects of functional products. In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical & processing aspects**. Lancaster: Technomic. 1998, p. 403-37.
- STUNKARD, A. J.; MESSIK, S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. **J Psychosom Res**, v. 29, n. 1, p. 71-83, 1985.
- THONG, F. S et al. Plasma leptin in moderately obese men: independent effects of weight loss and aerobic exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, p. E307-13, 2000.
- THORBURN, A.; MUIR, J.; PROIETTO, J. Carbohydrate fermentation decreases hepatic glucose output in healthy subjects. **Metabolism**, v. 42, n. 6, p. 780-5, 1993.

- TIMM, D. A et al. Wheat dextrin, psyllium, and inulin produce distinct fermentation patterns, gas volumes, and short-chain fatty acid profiles in vitro. **J Med Food**, v. 13, n. 4, p. 961-6, 2010.
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short chain fatty acids and human colonic functions: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol Rev**, v. 81, p. 1031-64, 2001.
- TOPPING, D. L et al. A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. **J Nutr**, v.127, p. 615-22, 1997.
- TOPPING, D. L.; ILLMAN, R. J.; TAYLOR, M. N. Effects of wheat bran and porridge oats on hepatic portal venous volatile fatty acids in pig. **Ann Nutr Metab**, v. 29, n. 6, p. 325-31, 1985.
- TRIBESS, T. B et al. Thermal properties and resistant starch content of unripe banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1022-5, 2009.
- TSCHOP, M.; SMILEY, D.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, p. 908-13, 2000.
- TSCHOP, M et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **J Endocrinol Invest**, v. 24, p. 19-21, 2001.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP. Version 4.1. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP**, São Paulo, 2008. Disponível em : <<http://www.fcf.usp.br/tabela>> Acesso em: 16 maio 2010.
- VAN MUNSTER, I. P.; NAGENGAST, F. M. The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. **Scand J Gastroenterol**, v.200(Suppl.), p. 80-6, 1993.
- VAREL, V. H. Activity of fiber-degrading microorganisms in the pig large intestine. **J Anim Sci**, v. 65, n. 2, p. 488-96, 1987.
- VELAZQUEZ, O. C.; LEDERER, H. M.; ROMBEAU, J. L. Butyrate and the colonocyte, implications for neoplasia. **Dig Dis Sci**, v. 41, p. 727-39, 1996.
- VENTURA, E et al. Reduction in risk factors for type 2 diabetes mellitus in response to a low-sugar, high-fiber dietary intervention in overweight Latino adolescents. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 163, n. 4, p. 320-7, 2009.
- WACKER, M.; WANEK, P.; EDER, E.; HYLLA, S.; GOSTNER, A.; SCHEPPACH, W. Effect of enzyme-resistant starch on formation of 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal and cell proliferation in the colonic mucosa of healthy volunteers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 9, p. 915-20, 2002.
- WANG, M. Y et al. A novel leptin receptor isoform in rat. **FEBS Lett**, v. 392, p. 87-90, 1996.
- WEAVER, G. A et al. Cornstarch fermentation by the colonic microbial community yields more butyrate than does cabbage fiber fermentation: cornstach fermentation rates correlate negatively with methanogenesis. **Am J Clin Nutr**, v. 67, p. 136-42, 1992.
- WHIGHT, N. A.; APPLETON, D. R. The metaphase arrest technique. *Cell Tissue Kinet*, v. 13, p. 643-63, 1980.
- WILLIAMS, D. L et al. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. **Endocrinology**, v. 147, p. 2765-7, 2003.
- WILLIAMS, J.; MOBARHAN, S. A critical interaction: leptin and ghrelin. **Nutr Rev**, v. 61, p. 391-3, 2003.
- WILLIS, H. J.; ELDRIDGE, A. L.; BEISEIGEL, J.; THOMAS, W.; SLAVIN, J. L. Greater satiety response with resistant starch and corn bran in human subjects. **Nutr Res**, v. 29, p. 100-5, 2009.
- WOLEVER, T. M. S et al. Day-to-day variation in glycemic response elicited by white bread is not related to variation in satiety in humans. **Appetite**, 2009. Disponível em: <[doi:10.1016/j.appet.2009.03.001](https://doi.org/10.1016/j.appet.2009.03.001)> Acesso em: 15 abr 2010.
- WONG, J. M. W et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, p. 235-43, 2006.
- WONG, J. M. W et al. Food intake and satiety following a serving of pulses in young men: effect of processing, recipe, and pulse variety. **J Amer Coll Nutr**, v. 25, n. 5, p. 543-52, 2009.

- WOODS, S. C et al. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v. 280, p. 1378-83, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **L'epidemie d'obesite expose des millions de personnes a d'autres maladies**. Communiqué OMS, n. 46, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (WHO/FAO). Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. **WHO Technical report series**, 916. Geneva, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/hpr/NPH/docs/who_fao_expert_report.pdf> Acesso em: dez 2008.
- WREN, A. M.; BLOOM, S. R. Gut hormones and appetite control. *Gastroenterol*, v. 132, p. 2116-30, 2007.
- WREN, A. M et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. **Diabetes**, v. 50, p. 2540-2547, 2001a.
- WREN, A. M et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 5992-5, 2001b.
- WYATT, G. M.; HORN, N. Fermentation of resistant food starches by human and rat intestinal bacteria. **J Sci Food Agric**, v.44, p. 281-8, 1988.
- XIMENES, H. M. A.; HIRATA, A. E.; ROCHA, S. M.; CURY, R.; CARPINELLI, A. R. Propionate inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. **Cell Biochem Funct**, v. 25(2), p. 173-8, 2007.
- YIP, R. G.; WOLFE, M. M. GIP biology and fat metabolism. **Life Sci**, v. 66, p. 91-103, 2000.
- ZHANG, P.; WHISTLER, R.; BEMILLER, J.; HAMAKER, B. Banana starch: production physicochemical properties and digestibility – a review. **Carbohydr Polym**, v. 59, p. 443-58, 2005.
- ZHAO, Z et al. Gastric leptin, but not estrogen and somatostatin, contributes to the elevation of ghrelin mRNA expression level in fasted rats. **J Endocrinol**, v. 196, p. 529-38, 2008.

ANEXOS