



Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
CAMPUS MARACANÃ

Laís Carmello Grom

**CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO* DO USO DE
PROBIÓTICOS SOB A GLICEMIA PÓS-PRANDIAL EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Rio de Janeiro – RJ

2019

Laís Carmello Grom

**CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO* DO USO DE
PROBIÓTICOS SOB A GLICEMIA PÓS-PRANDIAL EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de
Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientadores: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Prof. Dra. Paula de Miranda Costa Maciel

Banca de Qualificação: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz – IFRJ

Prof. Dr. Erick Almeida Esmerino – UFRRJ

Dr. Jonas de Toledo Guimarães – UFF

Dra. Nathália Miranda Coutinho – UFF

Rio de Janeiro – RJ

2019

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - % inibição da α -glucosidase.....	34
Equação 2 - % inibição da α -amilase.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas comumente utilizadas em probióticos	19
Tabela 2 - Principais produtos comercializados no Brasil contendo culturas probióticas	20
Tabela 3 - Principais cepas utilizadas na fabricação de queijos probióticos	22
Tabela 4 - Composição bruta dos alimentos utilizados	33
Tabela 5 - Porcentagem de inibição in vitro das enzimas α -amilase e α -glucosidase após o consumo de cada matriz probiótica (n=3)	43
Tabela 6 - Análise de variância do efeito do consumo de diferentes matrizes adicionadas do probiótico L. casei sob a glicemia pós-prandial em indivíduos saudáveis (n = 15).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostra de queijo Minas frescal + pão francês	30
Figura 2 - Amostra de queijo prato + pão francês	31
Figura 3 - Amostra de bebida láctea + pão francês	32
Figura 5 - Média dos resultados de medição da glicemia pós-prandial comparando a ingestão do controle e queijo prato probiótico.....	35
Figura 6 - Média dos resultados de medição da glicemia pós-prandial comparando a ingestão do controle e queijo Minas frescal probiótico.....	36
Figura 7 - Média dos resultados de medição da glicemia pós-prandial comparando a ingestão do controle e bebida láctea probiótica	36
Figura 9 - Representação das amostras e atributos nas primeira e segunda dimensões da análise de componentes principais (PCA) na matriz de correlação dos escores médios dos atributos analíticos da análise de redução da glicemia pós-prandial de três matrizes lácteas probióticas e do controle.	38
Figura 10 - EVA utilizada para identificar grau de fome no experimento	39
Figura 11 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do controle (1 pão francês + 1 copo de água). (T0) = antes de comer; (T1) = 15 min comer; (T2) = 1/2 hora após comer; (T3) = 1 hora após comer; (T4) = 1 1/2 hora após comer e (T5) = 2 horas após comer	40
Figura 12 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão da bebida láctea probiótica.	41
Figura 13 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do queijo Minas frescal probiótico.....	41
Figura 14 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do queijo prato probiótico.....	42
Figura 4 - Gráfico da média dos resultados (n = 3) da porcentagem de inibição in vitro das enzimas α -amilase e α -glucosidase após o consumo de cada matriz probiótica.....	43

Figura 8 - Comparação dos resultados alcançados com as três matrizes probióticas nos tempos pré-estabelecidos 44

Figura 15 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do controle e matrizes probióticas. (T0) = antes de comer; (T1) = 15 min comer; (T2) = 1/2 hora após comer; (T3) = 1 hora após comer; (T4) = 1 1/2 hora após comer e (T5) = 2 horas após comer..... 46

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - DISSERTAÇÃO	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 DIABETES E GLICEMIA PÓS-PRANDIAL	15
3.2. ALIMENTOS FUNCIONAIS	17
3.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS	17
3.4. PROBIÓTICOS	18
3.4.1. Probióticos comercializados pela indústria brasileira	20
3.4.2. Queijos probióticos	21
3.5. BENEFÍCIOS DO USO CONTÍNUO DE PROBIÓTICOS	23
3.5.1. Controle do colesterol	23
3.5.2. Relação intestino <i>versus</i> imunidade	23
3.5.3. Câncer do cólon	24
3.5.4. Intolerância à lactose	25
3.5.5. Diabetes	25
3.6. BEBIDAS LÁCTEAS	27
3.7. OUTROS PRODUTOS.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. ELABORAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	29
4.1.1. Preparo do queijo Minas frescal probiótico	29
4.1.2. Preparo do queijo prato probiótico	30

4.1.3. Preparo da bebida láctea probiótica	31
4.2. METODOLOGIA DOS TESTES <i>IN VITRO</i>	33
4.2.1. Composição bruta	33
4.2.2. Medição da atividade anti-hiperglicêmica <i>in vitro</i>	33
4.3. METODOLOGIA DOS TESTES <i>IN VIVO</i>	33
4.3.1. Medição da atividade anti-hiperglicêmica <i>in vivo</i>	33
4.3.2. Análise dos componentes principais	37
4.3.3. Análise de saciedade	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1. TESTES <i>IN VITRO</i>	42
5.2. TESTES <i>IN VIVO</i>	44
6. Conclusão	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 2 – ARTIGO TÉCNICO	55
CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	77
CAPÍTULO 4 – RESUMO SLACA.....	96

CAPÍTULO 1 – DISSERTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012), a prevalência global de diabetes é de aproximadamente 10%, chegando a até 33% da população em algumas regiões. A diabetes é uma condição de origem multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais, e é responsável por 3,5% dos casos de mortalidade devida a doenças crônicas não transmissíveis. Evidências científicas sugerem que o aumento do estresse inflamatório está relacionado a mecanismos moleculares que levam à resistência à insulina e a microbiota intestinal interage com fatores ambientais e fatores genéticos suscetíveis, contribuindo para o desenvolvimento do diabetes (SECONDULFO, 2004). O trato gastrointestinal humano contém em média 10 microrganismos/mL de conteúdo luminal e apresenta mais de 5.000 espécies bacterianas. Tem sido sugerido que a microbiota intestinal alterada conduz ao aumento da permeabilidade intestinal e a resposta imune da mucosa, contribuindo para o desenvolvimento da diabetes. O aumento da permeabilidade intestinal é um resultado da redução da expressão de proteínas de junções apertadas, eventualmente, favorecendo a translocação de lipopolissacarídeos bacterianos, o que pode resultar no aumento da sensibilidade à insulina e redução da resposta autoimune (SECONDULFO, 2004). Sendo assim, a modulação da microbiota intestinal por probióticos pode gerar inúmeros benefícios à saúde. No entanto, mais investigações são necessárias para esclarecer se a administração de probióticos pode ser eficientemente usada para a prevenção e controle do diabetes.

Neste projeto serão descritos os efeitos do uso de probióticos na redução da glicemia pós-prandial, que está diretamente relacionada à prevenção e controle da diabetes. Para isso, serão utilizadas três matrizes lácteas adicionadas de *Lactobacillus casei*. Os indivíduos em estudo irão ingerir essas matrizes logo após o consumo de uma refeição rica em carboidratos e terão a glicemia medida em tempos específicos, com a finalidade de notar se os probióticos são efetivos na redução da glicemia pós-prandial.

Após ter os resultados práticos em mãos, a atividade anti-hiperglicêmica

será quantificada através da medição da inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase (enzimas que metabolizam os carboidratos em glicose no intestino delgado, para posterior absorção pela corrente sanguínea) através de métodos específicos, para gerar mais dados que justifiquem a conclusão do estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito de três matrizes lácteas probióticas (com cepas de *Lactobacillus casei*): bebida láctea (contendo 70% de leite e 30% de soro), queijo prato e queijo Minas frescal sob a glicemia pós-prandial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade do projeto através de estudos sobre a redução da glicemia após o consumo de probióticos;
- Elaborar os alimentos probióticos (bebida láctea e queijos);
- Determinar a composição bruta dos produtos através de análises físico-químicas;
- Realizar os testes *in vitro* – Simulação da atividade anti-hiperglicêmica;
- Realizar os testes *in vivo* no departamento de Farmácia do IFRJ – *campus* Realengo;
- Realizar e avaliar a análise dos componentes principais das três matrizes;
- Descobrir qual das 3 matrizes apresenta melhores resultados de saciedade após a ingestão;
- Comparar os resultados *in vivo* – *in vitro* e apresentar a conclusão.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. DIABETES E GLICEMIA PÓS-PRANDIAL

Diabetes é uma síndrome metabólica de origem múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade de a insulina exercer adequadamente seus efeitos, causando um aumento da glicose no sangue. Esta doença acontece porque o pâncreas não é capaz de produzir o hormônio insulina em quantidade suficiente para suprir as necessidades do organismo, ou porque este hormônio não é capaz de agir de maneira adequada. A insulina promove a redução da glicemia ao permitir que a glicose que está presente no sangue possa penetrar dentro das células, para ser utilizada como fonte de energia. Portanto, se houver falta desse hormônio, ou mesmo se ele não agir corretamente, haverá aumento de glicose no sangue e, conseqüentemente, a diabetes (CORRÊA *et al.*, 2007).

Existem diversos tipos de diabetes: tipo 1 (doença auto-imune, onde o indivíduo nasce com falhas no organismo que desencadeiam a falta da produção de insulina), tipo 2 (desencadeada por tendência genética associada à uma rotina sem hábitos saudáveis), gestacional (ocorre durante a gravidez e é causada pela disfunção na produção e ação da insulina no corpo) e outras mais raras, como as ocasionadas por doenças no pâncreas, uso de medicamentos (como corticoides) ou doenças endocrinológicas, por exemplo (CORRÊA *et al.*, 2007).

Segundo o Sistema de Informações sobre Mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), o Brasil registrou um crescimento de 12% no número de mortes por diabetes entre 2010 e 2016. É um número alarmante, ainda mais pelo fato do seu tipo mais comum ser classificado como uma doença crônica causada por fatores genéticos juntamente com maus hábitos, mas que pode ser evitada; desde o indivíduo tenha uma rotina saudável com uma alimentação adequada e prática de atividades físicas, por exemplo.

Os alimentos energéticos como carboidratos, gorduras e proteínas podem ser oxidados nas células e neste processo uma grande quantidade de energia será liberada. Essa energia derivada da oxidação é usada para converter o

difosfato de adenosina (ADP) em trifosfato de adenosina (ATP), que é largamente utilizada por nosso organismo: no transporte ativo através das membranas biológicas, nas diversas reações de síntese de moléculas essenciais para nosso sistema biológico, na contração muscular, no impulso nervoso e em muitas outras funções primordiais para a manutenção da homeostase (RIBEIRO *et al.*, 2009).

A regulação do metabolismo da glicose (carboidrato) é feita por dois hormônios peptídicos secretados pelo pâncreas, a insulina e o glucagon. As células endócrinas do pâncreas estão em aglomerados, chamados ilhotas de Langerhans. Existem, aproximadamente, um milhão dessas ilhotas neste órgão, cada uma contendo perto de 2.500 células. A insulina, liberada sempre em estado alimentado, é chamada de hormônio hipoglicemiante, pois quando a glicose é absorvida pelo intestino, a insulina garante que esse nutriente seja armazenado como glicogênio no fígado e no músculo esquelético e como lipídio (quando em excesso) no tecido adiposo. Estas formas de armazenamento podem se tornar disponíveis durante os períodos de jejum. A insulina provoca diminuição da concentração sanguínea de glicose, limitando o aumento sanguíneo desta após a ingestão de carboidratos. O resultado da ação hipoglicemiante da insulina são respostas que estimulam a oxidação da glicose e inibem a gliconeogênese. Essas ações são coordenadas e simultâneas. Nelas, a insulina promove a glicogênese a partir da glicose (no fígado e no músculo esquelético) e inibe a glicogenólise, além de inibir a gliconeogênese e também aumentar o transporte de glicose para as células (músculo esquelético e tecido adiposo) com auxílio de transportadores de glicose (GLUT) nas membranas celulares (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Neste contexto encaixa-se a glicemia pós-prandial que, por definição, é a medida da glicose no sangue algum tempo depois do consumo de alimentos contendo carboidratos. As concentrações de glicose começam a subir cerca de 10 minutos após o início de uma refeição. A hiperglicemia pós-prandial é uma das primeiras anormalidades da glicemia associada à diabetes tipo 2 e é marcadamente exagerada em pacientes diabéticos que apresentam hiperglicemia de jejum.

Por esses e outros motivos, cresce a cada dia o número de consumidores preocupados com sua saúde e que buscam os mais diversos alimentos capazes

de manter uma boa saúde e bem-estar (SILVA, 2015). Esta constante procura por uma alimentação equilibrada incentiva pesquisas no mundo inteiro em busca de componentes naturais biologicamente ativos capazes de fornecer esses benefícios tão almejados pelos consumidores (ANVISA, 1999). A grande responsável por todo esse apelo e pelo desenvolvimento e expansão desses alimentos é a indústria alimentícia. A maior conscientização dos consumidores, aliada à preocupação com a incidência de doenças do século XXI (câncer, hipertensão, diabetes, acidente vascular cerebral, aterosclerose) fez com que a indústria voltada para o desenvolvimento de produtos com características funcionais crescesse por todo o mundo.

3.2. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimentos funcionais devem fornecer, além da nutrição básica, a promoção da saúde (mas não a cura de doenças), sendo seguro seu consumo mesmo sem recomendação médica (ANJO, 2004). Seu conceito foi introduzido no Japão na década de 1980 quando o governo passou a procurar por novos alimentos com características excepcionalmente especiais, destinados a atender uma população cuja expectativa de vida aumentava com o passar dos anos (HOLZAPFEL, 2001).

Os alimentos probióticos se enquadram nesta definição e são conhecidos por oferecerem diversos benefícios à saúde de quem os consome regularmente.

Este estudo vai abordar matrizes lácteas através da funcionalidade de seus peptídeos bioativos.

3.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

As proteínas do soro do leite representam apenas cerca de 20% (p/p) de todo o estoque de proteínas do leite, enquanto as caseínas são responsáveis pela maior parte. Estas proteínas possuem importantes propriedades nutricionais e biológicas, particularmente no que diz respeito à promoção da saúde e prevenção de doenças e condições de saúde (Madureira *et al.*, 2007).

Os peptídeos bioativos derivados de leite foram identificados como ingredientes potenciais de alimentos funcionais que promovem a saúde. A

hidrólise controlada das proteínas do soro libera estes peptídeos bioativos, a maioria dos quais ainda não foram caracterizados no mesmo grau dos peptídeos derivados da caseína. No entanto, os peptídeos de soro têm o potencial de desempenhar papéis importantes, atuando como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, antioxidante, hipocolesterolêmico, reguladores da função imune, assim como, fatores de crescimento (ANJO, 2004).

Diferentes estudos demonstraram um profundo potencial inibitório de peptídeos bioativos derivados de alimentos contra as enzimas α -glucosidase e α -amilase, devido à sua especificidade de ação e afinidade com o alvo molecular (Yu et al., 2011). O possível mecanismo de ação pelo qual os peptídeos inibem as enzimas é que eles interagem via ligações hidrofóbicas com o sítio ativo da enzima, entretanto, o mecanismo exato envolvido para sua atividade inibitória ainda é desconhecido (Vilcacundo, Martínez-Villaluenga, & Hernandez-Ledesma, 2017). O potencial inibitório da α -glucosidase e α -amilase dos peptídeos acontece devido aos aminoácidos hidrofóbicos, como confirmado por Ren et al. (2016).

3.4. PROBIÓTICOS

Probióticos são considerados alimentos funcionais, pois, por definição, são microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (PEIXOTO, 1989). Um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago, colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal de origem humana (LEE, 1999).

Diversos autores vêm sugerindo possíveis efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro. Entre esses efeitos benéficos, merecem destaque o controle das infecções intestinais, o estímulo da motilidade intestinal, com conseqüente alívio da constipação intestinal, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a diminuição dos níveis de colesterol, o efeito anticarcinogênico e o estímulo do sistema imunológico, pelo estímulo da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do hospedeiro, além da

exclusão competitiva e da produção de compostos antimicrobianos (OLIVEIRA, 2002).

As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem um número mínimo viável. Muitos estudos consideram uma dose inicial de 10^8 UFC/g para que possam resistir ao trato gastrointestinal, chegando no intestino em quantidade viável. Todavia, a quantidade mínima requerida e o período ideal para a administração dos probióticos para se obter efeitos benéficos para a saúde, não estão claros, já que o número varia de acordo com a espécie de microrganismo e com o tipo de alimento (CICHOSKI *et al.*, 2008). Essas bactérias devem ser mantidas viáveis e em número relativamente constante ao longo do armazenamento do produto. É importante ressaltar a segurança destes produtos, uma vez que, estudos demonstram que o uso de probióticos em pessoas saudáveis não aumenta o risco de doenças bacterianas (SALMINEN, 2004).

As cepas mais comumente utilizadas em probióticos estão citadas na Tabela 1. Eles têm uma influência benéfica sobre a microbiota intestinal humana e incluem fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos. Estes microrganismos apresentam diversas características em comum como, por exemplo, são seguros ou Generally Regarded As Safe (GRAS), apresentam capacidade de adesão à mucosa intestinal e são tolerantes aos ácidos e a bile (DUNNE *et al.*, 2001).

Tabela 1 - Cepas comumente utilizadas em probióticos

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Outras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbreuckii subsp. bulgaricus</i> (LB)	<i>B. adolescentis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranum</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>

Fonte: COLLINS *et al.*, 1998.

Fuller (1989) enumerou três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis mediante produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (OLIVEIRA, 2002).

3.4.1. Probióticos comercializados pela indústria brasileira

O uso de suplementação probiótica na dieta humana contendo diversas combinações de microrganismos funcionais vem sendo comercializados tanto na forma alimentar (leite, leites acidófilos, iogurtes, coalhadas, queijos), como na forma de preparações farmacêuticas em pó ou capsuladas para alguns microrganismos específicos, como é o caso da levedura *Saccharomyces boulardii*, do *Lactobacillus GG* e do *L. Casei Shirota*. A vantagem das cápsulas em relação aos produtos alimentares está na viabilidade mais duradoura quando mantida em temperatura ambiente (BARBOSA *et al.*, 2011).

Tabela 2 - Principais produtos comercializados no Brasil contendo culturas probióticas

Grupo	Produto	Produtor	Probióticos
Leite fermentado	Yakult	Yakult	<i>L. casei</i> linhagem Shirota
	Chamyto	Nestlé	<i>L. johnsonii</i>
Leite fermentado	Leite fermentado		<i>L. helveticus</i>
	Parmalat	Parmalat	<i>L. casei</i>
	Vigor Club-Poke-mons	Vigor	<i>B. lactis</i>
Leite fermentado aromatizado	Poke-mons	Batavo	<i>L. acidophilus</i>
	Batavito	Nestlé	<i>L. casei</i>
	LC1 Active (sabor laranja)	Batavo	<i>L. acidophilus</i>
			<i>L. casei</i>
		<i>L. bulgaricus</i>	
		<i>L. acidophilus</i> NCC 208	
		<i>S. thermophilus</i>	
Iogurte	Iogurte Biofibras	Parmalat	<i>B. lactis</i>
			<i>L. acidophilus</i>
	Dietalact		
			<i>B. lactis</i>
			<i>L. acidophilus</i>
	Activia	Danone	<i>DanRegularis® é a Bifidobacterium animalis DN173010</i>

Fonte: STÜRMER *et al.*, 2013.

As principais funções atribuídas a estes produtos são a promessa de

normalização da microbiota intestinal, prevenção da instalação de bactérias nocivas na parede do intestino, estímulo das células do sistema imunológico e aumento de anticorpos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O gênero *Lactobacillus* abriga microrganismos colonizadores que vão desde a boca, trato intestinal e vagina humana até laticínios e produtos vegetais. São bactérias gram positivas que não formam esporos e são estritamente fermentativas e anaeróbias. Dentre os lactobacilos mais utilizados na indústria alimentícia destacam-se os acidófilos *Lactobacillus casei*, *L. bulgarico*, *L. lactis* e *L. plantarum*.

Existem registros de que *Lactobacillus casei* é o tipo bactéria probiótica mais utilizada na produção de leites fermentados e de outros alimentos lácteos, devido ao seu poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal após ingestão garantindo seus efeitos benéficos ao organismo consumidor.

Além das funções probióticas, os *L. casei* têm aplicações industriais, como culturas iniciadoras produtoras de ácido para fermentações lácteas e culturas especiais para a intensificação e aceleração do desenvolvimento do sabor em certas variedades de queijo curado por bactérias. Seja utilizado em aplicações industriais ou probióticas, as tensões ambientais afetarão o estado fisiológico e as propriedades das células, inclusive alterando sua funcionalidade e bioquímica.

Este estudo vai utilizar cepas de *Lactobacillus casei* para descobrir sua funcionalidade quanto à atividade anti-hiperglicêmica no organismo humano.

3.4.2. Queijos probióticos

Os queijos, em geral, apresentam algumas vantagens em relação a outros produtos probióticos. Por serem uma matriz sólida, protegem as bactérias com maior eficiência. A maioria possui pH mais elevado que iogurtes e leites fermentados, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência das culturas probióticas por um período mais longo. Além disso, os queijos, por apresentarem uma quantidade de gordura relativamente alta, oferecem proteção para a bactéria probiótica durante sua passagem pelo trato gastrintestinal (GARDINER *et al.*, 1999).

Tabela 3 - Principais cepas utilizadas na fabricação de queijos probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Others (*)
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplatantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivarius</i>		

Fonte: CASTRO *et al.*, 2014.

A produção de queijos representa uma das mais importantes atividades para os estabelecimentos industriais, pois 34% de todo o leite recebido é direcionado à fabricação de queijos (Estatísticas do leite, 2010). A sobrevivência das bactérias probióticas em queijos frescos é maior quando comparada aos queijos maturados. Essa maior sobrevivência estaria relacionada ao menor tempo de armazenamento dos queijos frescos, ao menor teor de sal e ao maior teor de umidade e atividade de água, que não limitariam a multiplicação do probiótico (BURITI, 2005). Destaca-se o queijo Minas frescal, que apresenta ampla aceitação no mercado, excelente rendimento na fabricação e facilidade de produção. No entanto, devido ao alto teor de umidade, elevado valor de pH e grande manipulação durante a fabricação, é muito suscetível a alterações bioquímicas e microbiológicas que afetam as características de qualidade e durabilidade (FURTADO; LOURENÇO, 1994; PINTO *et al.*, 2004).

No setor láteo, os alimentos funcionais, como os adicionados de microrganismos probióticos, apresentam elevado valor comercial, e muitos estabelecimentos industriais desenvolvem produtos tendo a promoção da saúde como relevante estratégia de propaganda. O *Lactobacillus acidophilus* é considerado um microrganismo probiótico em razão dos benefícios relacionados ao consumo (GARCIA *et al.*, 2006), sendo muito utilizado na indústria de laticínios, na fabricação de diversos produtos. A acidificação de queijos utilizando ácido láctico é descrita como uma forma de melhorar as características de

produção e de preservação, pelo fato de diminuir as alterações qualitativas ao longo do tempo de estocagem (FOX, 2000).

3.5. BENEFÍCIOS DO USO CONTÍNUO DE PROBIÓTICOS

3.5.1. Controle do colesterol

A hipercolesterolemia (elevação patológica das taxas de colesterol no sangue) está diretamente ligada aos problemas de doenças como infarto e aterosclerose (entupimento das artérias, principal causa de infartos e AVCs no mundo). Com a redução dos níveis sanguíneos de colesterol, aumenta-se a qualidade de vida, em razão de que a maioria do colesterol circulante no corpo é sintetizada no próprio organismo a partir de ácidos graxos e apenas cerca de um terço é proveniente da dieta ingerida (OLIVEIRA; ALMEIDA; BOMFIM, 2017). O efeito hipocolesterolêmico dos probióticos está associado à redução de 1% da concentração de colesterol sérico e está vinculado com redução estimada em 2 a 3% do risco de coronariopatias (doenças provocadas por lesões das artérias coronárias, que determinam isquemia do miocárdio). Os mecanismos propostos da atividade hipocolesterolêmica das bactérias lácticas são: a inibição da absorção exógena de colesterol pelo intestino delgado, supostamente pela associação deste composto e dos ácidos biliares à parede celular bacteriana; a separação dos ácidos biliares por ação bacteriana, anulando a reabsorção deste composto; e a reação de desconjugação, a qual libera aminoácidos no meio e ácidos biliares, que reduzem a absorção de colesterol pelo aumento da excreção fecal destes (ANTUNES *et al.*, 2007).

3.5.2. Relação intestino *versus* imunidade

A maioria das bibliografias pesquisadas relatam que os estudos com bactérias ácido lácticas apresentam que os probióticos têm efeito imunestimulante tanto em animais quanto em seres humanos, porém, esses mecanismos ainda não estão elucidados. O efeito pode estar associado à capacidade dos microrganismos probióticos proporcionarem uma atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação

sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (COPPOLA; TURNES, 2004). O intestino é o maior órgão linfóide do corpo humano e é o responsável por 80% da resposta imunológica. Estudos *in vitro* e de modelos animais e humanos indicam que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não específica quanto a específica; algumas linhagens probióticas podem estimular a resposta imunitária inata, reduzindo o curso de doenças infecciosas como gastroenterites em crianças e/ou proporcionar maior eficácia de vacinas; simultaneamente, as mesmas linhagens podem desencadear efeito anti-inflamatório em doenças intestinais, como na colite ulcerativa (ANTUNES *et al.*, 2007). Também obtêm-se resultados satisfatórios com o uso de probióticos na síndrome do intestino curto e diarreia aguda infecciosa, supostamente pela redução da permeabilidade intestinal e pelas suas características anti-inflamatórias (VARALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

O uso de antibióticos de amplo espectro tem consequências maléficas para o balanço da microbiota, especialmente sobre as bactérias benéficas, podendo também levar à diarreia em até 20% dos pacientes. Com o desequilíbrio causado pelo antibiótico, pode ocorrer elevação do número de *Clostridium difficile*, frequentemente presente no cólon, e produção de toxinas que causam a colite. Assim, o probiótico tem participação na recuperação do intestino (ANTUNES *et al.*, 2007). Pesquisadores demonstraram que a bactéria probiótica *Lactobacillus* GG foi eficaz na alteração de efeitos (PIMENTEL, 2011).

3.5.3. Câncer do cólon

Ao modular a microbiota intestinal, é possível reduzir as bactérias associadas à doença colônica, uma vez que vários metabólitos bacterianos são carcinogênicos. Por esse motivo, discute-se sobre em qual etapa da carcinogênese os probióticos podem atuar de frente na complexa microbiota intestinal. As bactérias lactoacidófilas são capazes de beneficiar este quadro, por meio de mecanismos pouco esclarecidos até ao momento, mas que podem incluir alterações metabólicas da microbiota intestinal, alterações químicas e fisiológicas do cólon e relação ou degradação de potenciais carcinogênicos (MATOS, 2010, p. 11). Ainda que o mecanismo pelo qual os probióticos têm ação no câncer do cólon ainda não tenha sido esclarecido, algumas hipóteses seriam:

supressão do carcinógeno procarcinógeno por ligação; diminuição do pH intestinal, variando a atividade da microbiota e a solubilidade da bile; variações do tempo de trânsito intestinal, retirando substâncias mutagênicas mais eficientemente; estimulação do sistema imune; bloqueio ou remoção; supressão de bactérias com atividade enzimática (PIMENTEL, 2011).

3.5.4. Intolerância à lactose

Possivelmente é uma das utilizações mais antigas dos probióticos. Por tempos, constata-se que o iogurte é muito melhor tolerado que o leite pelos indivíduos intolerantes à lactose. Esta tolerância tem sido atribuída à diminuição do conteúdo de lactose no iogurte em razão da fermentação pelas bactérias produtoras de ácido láctico, da atividade da β -galactosidase das próprias bactérias que produzem o iogurte e, também, da baixa velocidade de esvaziamento gástrico deste em relação ao leite. (OLIVEIRA; ALMEIDA; BOMFIM, 2017). A administração de um probiótico como *Sacharomyces boulardii* ajuda a sintomatologia em indivíduos com deficiência em sacarase-isomaltase; espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido constantemente utilizadas na produção de iogurtes e outros produtos do leite fermentado (VARALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008, p. 84). Os mecanismos de ação da intolerância à lactose incluem a redução na concentração de lactose em produtos fermentados, a grande atividade da lactase em preparações bacterianas utilizadas na elaboração dos produtos e a grande atividade da enzima lactase que chega ao intestino delgado junto com o produto fermentado ou entre as bactérias viáveis adequadas para sobreviver à acidez e à bile. A enzima lactase bacteriana, que pode ser detectada no duodeno e no íleo terminal, após o consumo de iogurtes probióticos, é o principal fator de melhoria da digestibilidade, por meio da hidrólise da lactose, principalmente no íleo terminal (PIMENTEL, 2011, p. 103).

3.5.5. Diabetes

Mecanismos moleculares envolvendo os efeitos anti-diabéticos de probióticos ainda não estão completamente elucidados, mas podem ser

relacionados com a redução do stress oxidativo, imunomodulação, inflamação e atenuação na modificação da microbiota intestinal (EJTAHED, *et al.*, 2012), podendo ter grande efetividade no tratamento da diabetes tipo 1 e 2.

Uma das principais características da diabetes tipo 2 é o aumento sistêmico do estresse oxidativo (Rains e Jain, 2011). Uma maneira de contrabalançar o aumento de espécies reativas ao oxigênio e o esgotamento de antioxidantes é complementá-los através da dieta. Além dos polifenóis, bactérias intestinais como as espécies de *Bifidobacterium* e intervenções dietéticas com probióticos contendo certas cepas de *Lactobacillus acidophilus* melhoraram a tolerância à glicose e o status antioxidante total em pacientes com este tipo da doença (Ejtahed *et al.*, 2012).

Portanto, estudos anteriores mostraram que diferentes espécies de bactérias do ácido láctico exibem atividade antioxidante (Uskova e Kravchenko, 2009; Lin e Chang, 2000). As bactérias de ácido láctico mais frequentemente relatadas exibindo atividade antioxidante são *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Saccharomyces boulardi*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus* e *E. faecium SF68*. Apenas o gênero *Lactobacillus* compreende mais de 120 espécies utilizados em ensaios experimentais e clínicos.

Estudos relataram que na diabetes tipo 2, a concentração de *Bifidobacterium spp.* no intestino foi positivamente correlacionada com uma melhor tolerância à glicose e secreção de insulina (NAI *et al.*, 2007). Também demonstraram que as bifidobactérias podem reduzir os níveis de endotoxina e melhorar as barreiras da mucosa intestinal, reduzindo assim, a inflamação sistêmica e subsequentemente a incidência de diabetes.

A suplementação de probióticos também reduz a população de bactérias patogênicas gram-negativas no intestino e modula a resposta imunitária. Vários mecanismos para a inibição de bactérias gram-negativas por probióticos foram postulados, incluindo a competição por nutrientes e locais de adesão, produção de compostos inibidores diretos (tais como bacteriocinas) e abaixamento do pH do cólon pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (TUOHY, 2003).

Segundo Gomes *et al.*, 2014, o consumo de probióticos aumenta o número de bifidobactérias. Consecutivamente, o aumento da expressão de proteínas de adesão reduz a permeabilidade intestinal, prejudicando a ativação do TLR4 (receptores que estão presentes em tecidos direcionados para ações

de insulina) pelos lipopolissacarídeos (principal componente da membrana externa de células gram-negativas e conhecidos como importante ativador de resposta imunológica). Como resultado, os caminhos de ativação do NFκB (complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição) são bloqueados. A indução de células TH17 (que são responsáveis por desencadear processos inflamatórios crônicos) também é inibida, impedindo a infiltração pancreática de células T CD8 + (linfócitos com ação citolítica).

3.6. BEBIDAS LÁCTEAS

O soro de queijo, denominado doce (pH entre 6 e 7), além de ser considerado um produto secundário da indústria queijeira, é resultante do processo de coagulação enzimática do leite (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006). Este produto secundário, além de representar cerca de 85 a 95% do volume inicial de leite empregado na fabricação de um queijo, contém aproximadamente 55% do total de nutrientes do leite (SISO, 1996), sendo desta forma considerado fonte de lactose, cálcio, proteínas e vitaminas hidrossolúveis (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2002). Atualmente, o soro de queijo é reconhecido pelas suas propriedades nutricionais e funcionais, não somente pelo alto valor biológico de suas proteínas, mas também pelo teor de aminoácidos sulfurados presentes nas proteínas do soro (SINHA *et al.*, 2007). A conversão do soro líquido em bebidas lácteas fermentadas ou não, seria uma das mais atrativas opções para as indústrias devido à simplicidade do processo; a possibilidade de uso dos equipamentos já existentes na usina de beneficiamento de leite (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2000); a substituição do uso de soro em pó, reduzindo custos (THAMER; PENNA, 2005); além da redução de problemas relativos ao seu descarte (PINTADO; MACEDO; MALEATA, 2001). Por definição, segundo a Instrução Normativa nº 16 do Ministério da Agricultura e Pecuária:

Entende-se por bebida láctea o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentados ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51%

massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto.
(BRASIL, 2005)

Lerayer *et al.* (2002) definem bebida láctea como um tipo de leite fermentado que vem se destacando como “substituto” do iogurte, podendo ser utilizados leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, incluindo neste caso o soro de queijo, todos reconstituídos ou não. Porém, a proporção leite e soro ainda não é bem definida (PENNA; SIVIERI; OLIVEIRA, 2001).

3.7. OUTROS PRODUTOS

No entanto, não somente laticínios, mas vários outros produtos vêm sendo estudados quanto a sua capacidade de associá-los aos microrganismos probióticos, incluindo sobremesas, maionese, cereais, carnes, alimentos infantis, produtos de confeitaria, patês, extratos de sementes vegetais, levando em consideração a seleção de cepas probióticas apropriadas para cada tipo de produto, com o objetivo de produzir o efeito desejado e manter a viabilidade durante o tempo de armazenamento (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

Um exemplo de sobremesa probiótica é o mousse de chocolate, que além de ter grande aceitação pelo público, é um veículo eficaz para a incorporação de *L. paracasei subsp. paracasei* LBC 82 (Aragon-Alegro *et al.*, 2007). Os valores de pH neutro deste alimento (pH 6,3 – 5,7) representam uma condição apropriada para sobrevivência de *L. paracasei* durante 28 dias de armazenamento a 4° C. A boa estabilidade das contagens viáveis de *L. paracasei* no mousse de chocolate durante todo o período de armazenamento pode ter efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor. Além disso, a adição de ingrediente prebiótico, como a inulina, não afeta a viabilidade de *L. paracasei* durante o armazenamento (Aragon-Alegro *et al.*, 2007). Também existem várias sobremesas veganas probióticas, principalmente utilizando a soja como matriz.

Em relação aos grãos de cereais, estes são fontes ricas de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras (Chavan e Kadam, 1989). Também consiste de carboidratos não digeríveis que têm efeitos fisiológicos benéficos em humanos, como a estimulação do crescimento de Lactobacilos e Bifidobactérias presentes no cólon (Andersson *et al.*, 2001). Muitos estudos demonstraram que

os cereais são bons substratos para o crescimento de bactérias probióticas (Martenson *et al.*, 2002). Mantzouridou *et al.* (2013) concluíram que emulsões de saladas baseadas em diferentes níveis de farinha de aveia (1,0, 3,0 e 5,0 g / 100 g) podem garantir de forma significativa a viabilidade de *L. paracasei subsp. paracasei* DC412 durante 7 semanas de armazenamento a 4° C e manter os valores de pH (3,58 – 3,69) próximos dos recomendados para os produtos comerciais para molhos para salada. Probióticos também estão sendo aplicados com sucesso em outras matrizes farináceas, como por exemplo, farinha de arroz, okara, extrato de malte e cevada.

A aplicação probiótica em produtos cárneos ainda não é muito usual (principalmente no Brasil), porém, vários fatores como alto teor de sal de cura, baixo pH, baixa atividade de água e tratamento térmico podem afetar a atividade dos probióticos em produtos de carne fermentados. No entanto, vários estudos provaram a adequação de bactérias probióticas selecionadas para uso como culturas probióticas em salsichas fermentadas (Arihara, 2006; Ammor e Mayo, 2007; Rebucci *et al.*, 2007). Isto é devido à boa adaptação ao ambiente durante a fermentação da salsicha associada à rápida taxa de crescimento e acidificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ELABORAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

4.1.1. Preparo do queijo minas frescal probiótico

Entende-se por queijo Minas frescal o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (RESOLUÇÃO MERCOSUL/GMC/RES N°145/96).

Para o processamento do queijo Minas frescal probiótico, foram utilizados 5 litros leite cru refrigerado com 3,4% de gordura. Primeiramente o leite foi pasteurizado a 72°C por 15 segundos e em seguida, resfriado até 37°C. Cloreto de cálcio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) foi adicionado em quantidade de 0,2 g/L. Em relação a cultura probiótica, a cepa *Lactobacilos casei* 01 (Chr. Hansen, Valinhos, Brasil) foi adicionada na proporção de 0,1 g/L,

correspondendo a 7-8 log UFC/g. Coalho em pó (Halamix power, Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) também foi adicionado na concentração de 3 g/L e então foi realizada a homegeinização. O leite foi mantido em tanque de camisa dupla por 40 minutos para coagular. Em seguida, a coalhada foi cortada (grão nº 1), teve o soro retirado foi colocada em formas plásticas de 250 g. A salga utilizada foi a seco, onde 0,8 g de NaCl foram adicionados. O produto foi então embalado e armazenado em câmaras frias a 5°C (SPERRY *et al.*, 2018).



Figura 1 - Amostra de queijo Minas frescal + pão francês

4.1.2. Preparo do queijo prato probiótico

Entende-se por queijo prato o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulante apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (PORTARIA N.º 358, DE 04 DE SETEMBRO DE 1997 DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO).

Para a fabricação do queijo prato, 12 litros de leite cru resfriado foram pasteurizados a 72°C por 15 segundos. Após o resfriamento, a cultura láctica probiótica foi adicionada (*Lactobacillus casei* 01, na concentração de 0,1 g/L, correspondendo a 7-8 log UFC/g) e leite foi incubado no próprio tanque de

fabricação por 40 minutos a 45°C. Em seguida, foi adicionado 0,2 g/L de cloreto de cálcio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil), 5 mL de corante de urucum, e 3 g/L de coalho em pó (Halamix power, Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). Após a obtenção da coalhada, foi feito o corte da massa em cubos de 1 cm e posterior mexedura lenta e contínua por 15 minutos. 30% do soro de leite foi retirado do tanque de fabricação, repondo com água quente a 80°C para que a temperatura da massa aumentasse em 1°C a cada 3 minutos. A massa foi mantida por 40 minutos no tanque de fabricação, e então feita a retirada total do soro e adição de NaCl (1%). A coalhada foi colocada em formas plásticas e prensada a 0,1 MPa por 15 min; 0,24 MPa durante 30 min; e 0,31 MPa durante 90 min. Após a prensagem, os queijos foram embalados a vácuo em embalagens plásticas e armazenados a 10°C por 60 dias (SILVA *et al.*, 2018).



Figura 2 - Amostra de queijo prato + pão francês

4.1.3. Preparo da bebida láctea probiótica

Entende-se por bebida láctea o produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou

substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto (Instrução Normativa MAPA nº 16 de 23/08/2005).

Para o processamento da bebida láctea, soro em pó foi reconstituído em água potável, na quantidade de 11%. Em seguida, foi adicionado ao leite integral com 3,5% de gordura, ou seja, 30% de soro de leite e 70% de leite integral. A adição de açúcar (sacarose) ocorreu na quantidade de 5% e essência de baunilha 1%. Esta bebida foi então pasteurizada a 72°C por 15 segundos e então resfriada até atingir temperatura de 45°C, onde foi realizado o inóculo da cepa probiótica *Lactobacillus casei* 01, atendendo a quantidade de 0,1 g/L necessária para se atingir 7-8 log UFC/g (ANJO, 2004). Após esta a adição, a bebida foi envasada em garrafas esterilizadas e então levada para armazenamento a 5°C.



Figura 3 - Amostra de bebida láctea + pão francês

4.2. METODOLOGIA DOS TESTES *IN VITRO*

4.2.1. Composição bruta

Para caracterização das matérias-primas, a composição bruta (umidade, proteína e gordura) dos queijos foi determinada utilizando métodos tradicionais.

A umidade foi determinada secando 5 g de amostra a 100 – 105°C por 24 horas. A quantidade proteica foi determinada em duplicata pelo método de Kjeldahl, multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,38. Já gordura foi quantificada pelo método de Gerber (FELICIO *et al.*, 2016). Os resultados foram expressos como g / 100 g.

Para cada alimento lácteo (queijo Minas frescal, queijo prato e bebida de soro de leite), os extratos solúveis em água (WSE) foram preparados seguido de centrifugação a 10.000 × g por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro de seringa de 0,45 µm (Mixed Cellulose Esters, EMD Millipore Corporation, MA, EUA) e armazenados a -20°C para posterior análise.

Desta forma, os seguintes resultados foram encontrados:

Tabela 4 - Composição bruta dos alimentos utilizados

Matriz	Umidade (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídios (g/100g)
Queijo Minas frescal	66,2	15,8	15,9
	1,21	1,13	0,82
Queijo prato	51,5	26,5	36,9
	0,71	0,68	0,92
Bebida láctea	81,7	2,12	1,4
	0,23	0,43	0,23

Onde: Desvio padrão

4.2.2. Medição da atividade anti-hiperglicêmica *in vitro*

A avaliação da atividade inibidora de α -glucosidase e α -amilase teve como base o método modificado (ADISAKWATTANA *et al.*, 2012; LAVELLI *et al.*, 2016). Sendo a atividade da α -glucosidase determinada

espectrofotometricamente em epperndorf, contendo 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) como substrato, α -glucosidase, amostras e pNPG foram preparados individualmente em tampão fosfato (pH 6,8). 100 μ L de tampão fosfato (pH 6,8), 100 μ L de enzima solução (0,2 unidades/mL) e 150 μ L de cada amostra foram misturados em cada tubo. A mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de substrato (2,5 mmol/L). Após incubação a 37°C por 20 minutos, uma alíquota de 80 μ L de solução de carbonato de sódio (0,2 mol/L) foi adicionada a cada reação para que a mesma fosse cessada. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) foi quantificada usando um leitor de microplacas CMax Plus em 405 nM. Todos os resultados foram realizados em triplicata e expressos como média (n = 3) \pm DP.

A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

Abs = grau de absorbância.

A avaliação da atividade inibitória da α -amilase também foi determinada como descrito anteriormente (ADISAKWATTANA *et al.*, 2012; LAVELLI *et al.*, 2016) com modificações. A α -amilase e o amido foram dissolvidos em tampão fosfato (pH 6,8). As concentrações do extrato (100 μ L) e 1 mg/mL de solução de α -amilase (20 unidades/mL) foram misturadas em um tubo que foi incubado a 37°C durante 20 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 250 μ L de solução de amido (10 g/L). Após a adição de 250 μ L de reagente dinitrosalicílico ao tubo, as misturas foram aquecidas a 100°C durante 10 minutos. Depois de esfriar à temperatura ambiente em um banho de água fria, foram adicionadas 2000 μ L de água destilada à mistura e a absorbância foi lida a 540 nM utilizando um espectrofotômetro.

Todos os resultados foram realizados em triplicata e expressos como média (n = 3) \pm DP. A taxa de inibição foi calculada semelhante à α -glucosidase como descrito anteriormente, enquanto a acarbose foi utilizada como controle positivo.

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs controle}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

Abs = grau de absorbância.

4.3. METODOLOGIA DOS TESTES *IN VIVO*

4.3.1. Medição da atividade anti-hiperglicêmica *in vivo*

O grupo estudado ingeriu 3 refeições-teste após 10 - 12 horas de jejum: 50 g de pão branco + 300 mL de água (controle); 50 g de pão branco com 1 fatia de 40 g de queijo prato probiótico (primeiro teste), 50 g de pão branco + 300 mL de bebida láctea probiótica (segundo teste) e 50 g de pão branco com 1 fatia de 40 g de queijo Minas frescal probiótico (terceiro teste), com 1 semana de intervalo entre os experimentos.

Os níveis de glicose no sangue foram medidos nos seguintes tempos: imediatamente antes, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após, com o aparelho glicosímetro Accu-Chek®.

Desta forma, foi possível obter os seguintes resultados:

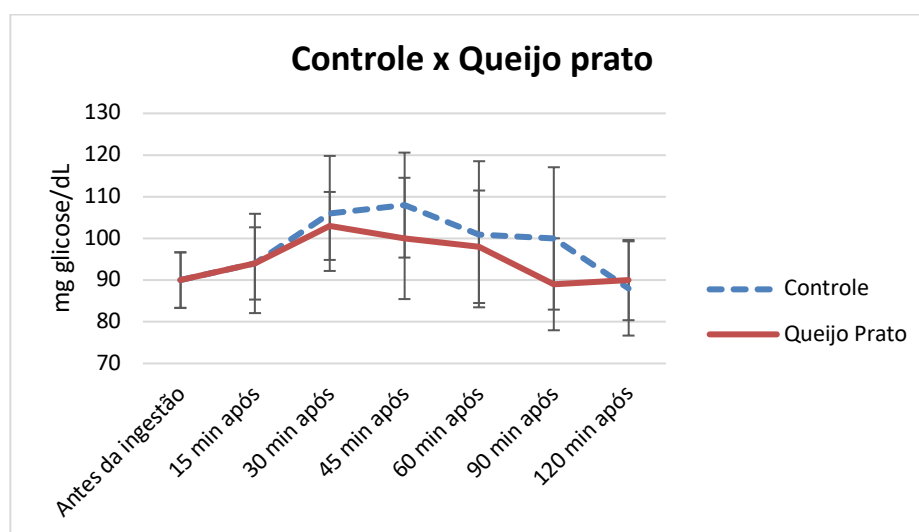


Figura 4 - Média dos resultados de medição da glicemia pós-prandial comparando a ingestão do controle e queijo prato probiótico

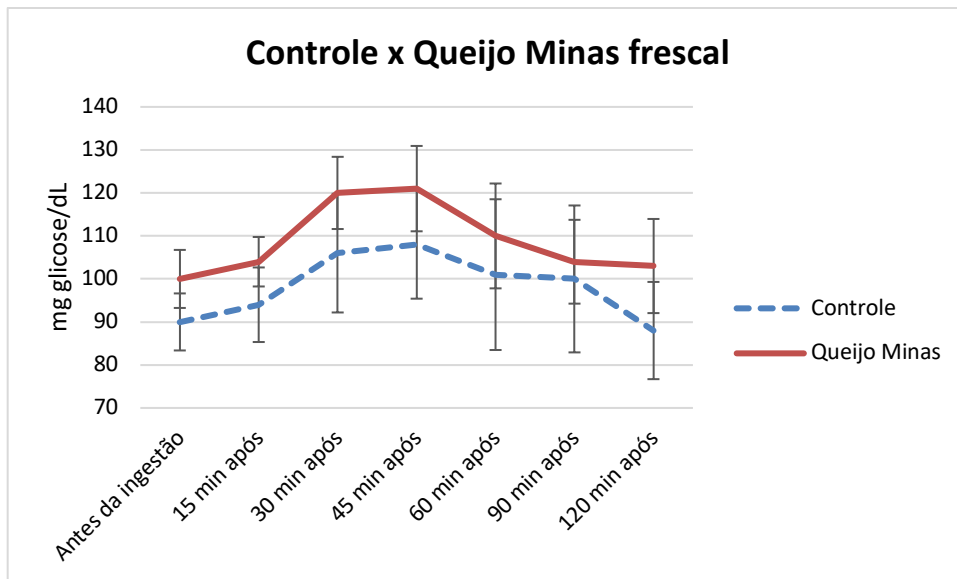


Figura 5 - Média dos resultados de medição da glicemia pós-prandial comparando a ingestão do controle e queijo Minas frescal probiótico

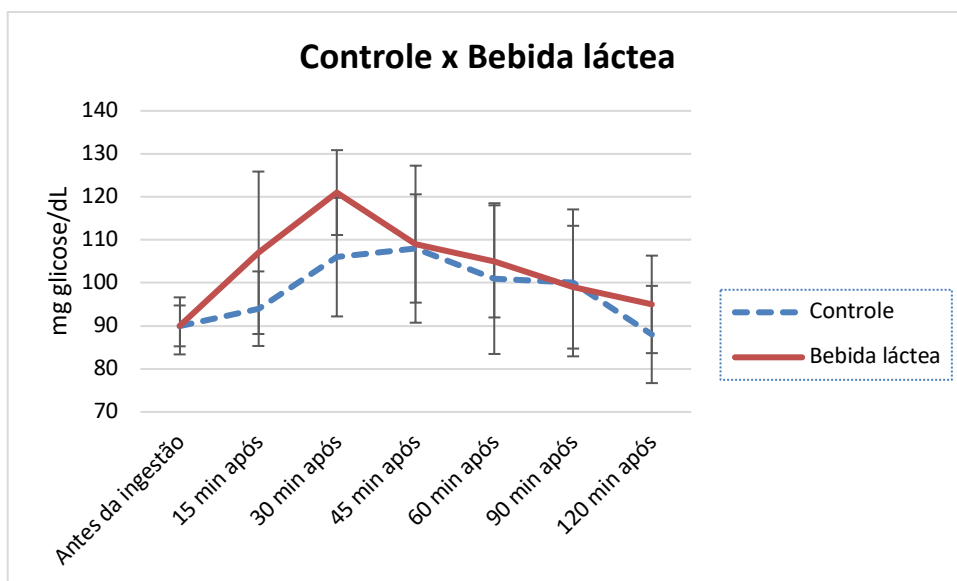


Figura 6 - Média dos resultados de medição da glicemia pós-prandial comparando a ingestão do controle e bebida láctea probiótica

Como não foi possível selecionar um grupo altamente homogêneo no experimento (idades de 22 a 46 anos entre homens e mulheres, com uma média de IMC normal, na faixa de 18-24 kg/m²), houve um desvio padrão considerável nos resultados. Mas ainda assim, foi possível notar uma maior redução da taxa glicêmica de uma das matrizes quando comparada ao controle.

4.3.2. Análise dos componentes principais

A Análise de Componentes Principais é um procedimento matemático que utiliza uma transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente não correlacionadas, chamadas de componentes principais. O número de componentes principais é menor ou igual ao número de variáveis originais. Esta transformação é definida de forma que o primeiro componente principal tem a maior variância possível (ou seja, é responsável pelo máximo de variabilidade nos dados) e cada componente seguinte, por sua vez, tem a máxima variância sob a restrição de ser ortogonal aos componentes anteriores. Os componentes principais são comprovadamente independentes apenas se os dados forem normalmente distribuídos.

O mapa bidimensional da PCA (Principal Component Analysis) explicou 89,42% da variabilidade das amostras usando duas dimensões (F1 = 59,57% e F2 = 29,85%, respectivamente, figura 6). Na primeira dimensão, a amostra de queijo Minas frescal foi fortemente associada a altos valores de glicose no tempo zero, área abaixo da curva e valor máximo de glicose. O controle e a amostra de queijo prato foram caracterizadas pelo horário de pico de glicose semelhantes. A bebida láctea apresentou maiores resultados nos aspectos: aumento máximo de glicose, velocidade incremental de glicose e porcentagem incremental de glicose. Nenhum dos aspectos foi atribuído à segunda dimensão.

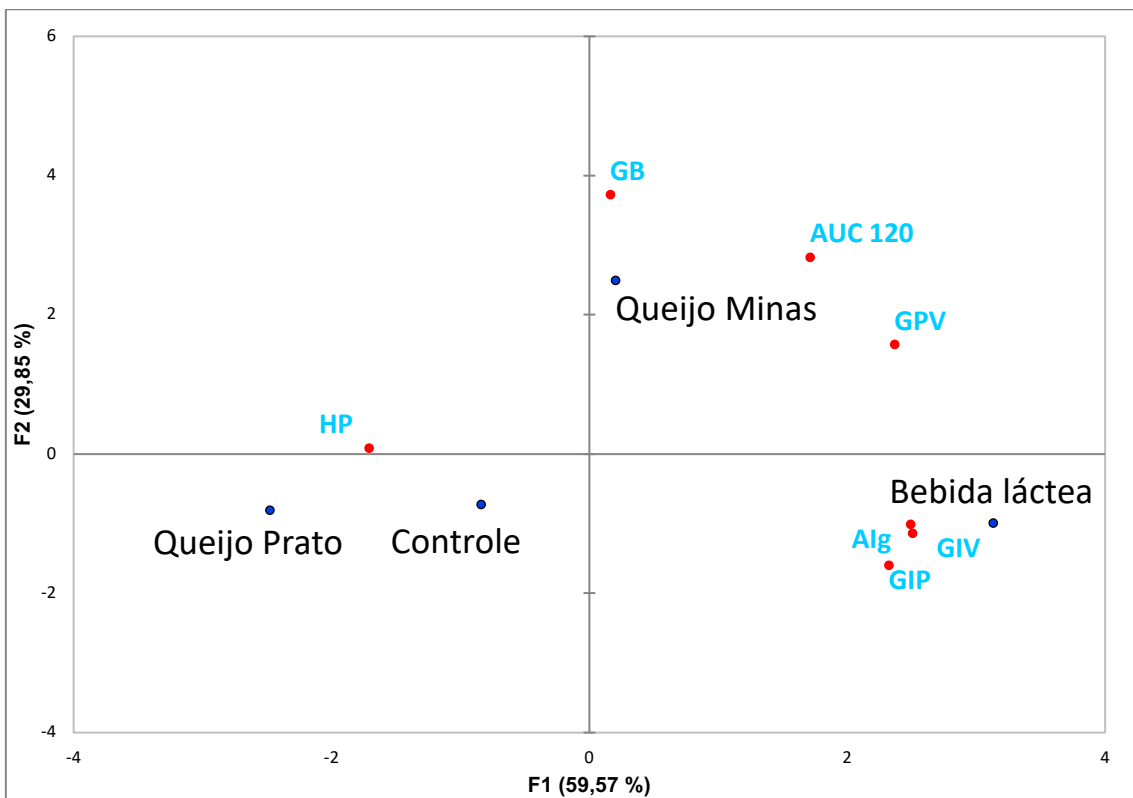
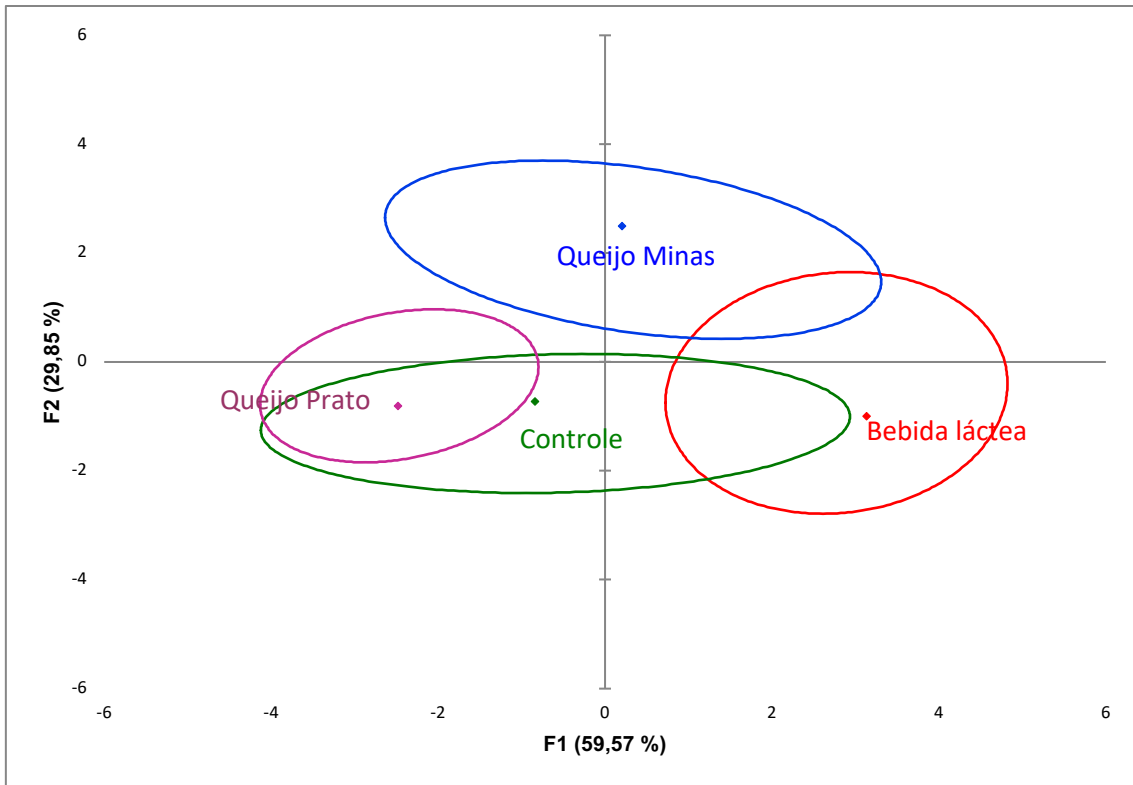


Figura 7 - Representação das amostras e atributos nas primeira e segunda dimensões da análise de componentes principais (PCA) na matriz de correlação dos escores médios dos atributos analíticos da análise de redução da glicemia pós-prandial de três matrizes lácteas probióticas e do controle.

Onde: GB = Glicose no tempo zero, HP = horário do pico de glicose no sangue, GPV = valor máximo de glicose, Alg = aumento máximo de glicose, GIP = porcentagem incremental de glicose, GIV = velocidade incremental de glicose e AUC 120 = área abaixo da curva.

4.3.3. Análise de saciedade

Sensações subjetivas de fome podem ser influenciadas por diversos fatores internos, incluindo variáveis fisiológicas e psicológicas. Além disso, fatores externos como refeições anteriores, atividade, temperatura do ambiente e clima podem influenciar as sensações subjetivas no dia do teste (FLINT *et al*, 2000).

A fim de avaliar as sensações subjetivas do apetite, as escalas analógicas visuais são amplamente utilizadas. As escalas de acuidade visuais (EVAs) são, na maioria das vezes, compostos de linhas (de comprimento variável) com palavras ancoradas em cada extremidade, descrevendo os extremos. Durante este experimento, foi utilizada a seguinte escala de 10 cm:

Qual seu nível de fome neste momento?

Não estou com a menor fome

Nunca estive tão faminto(a)

0 _____ 10

Figura 8 - EVA utilizada para identificar grau de fome no experimento

Os voluntários são instruídos a fazer uma marca através da linha correspondente ao seu grau de fome no momento. A medição da medição é feita medindo a distância da extremidade esquerda da linha até a marca feita pelo voluntário em questão.

A reprodutibilidade e a validade de estudos EVA têm sido bastante estudadas e vem avaliadas em diversas áreas de pesquisa, especialmente no quesito dor, onde este tipo de análise é definido como “padrão-ouro” (FLINT *et al*, 2000).

Por se tratar de uma análise extremamente subjetiva, a reprodutibilidade e a validade dos resultados dos testes EVA de apetite em estudos que envolvem refeições-teste não foram esclarecidas. Além disso, nenhum estudo investigou o efeito da padronização da dieta dos sujeitos antes dos dias de teste (exigiu-se apenas 12 horas de jejum).

No presente estudo, os mesmos voluntários que tiveram a glicemia medida após o consumo dos probióticos nas 3 diferentes matrizes (queijo prato, queijo Minas frescal e bebida láctea) e no controle (apenas pão francês + 1 copo de água), responderam qual era o nível de fome nos tempos a seguir:

- Imediatamente antes do consumo;
- 15 min após o consumo;
- 30 min após o consumo;
- 60 min após o consumo;
- 90 min após o consumo;
- 120 min após o consumo.

Foram obtidos os seguintes resultados:

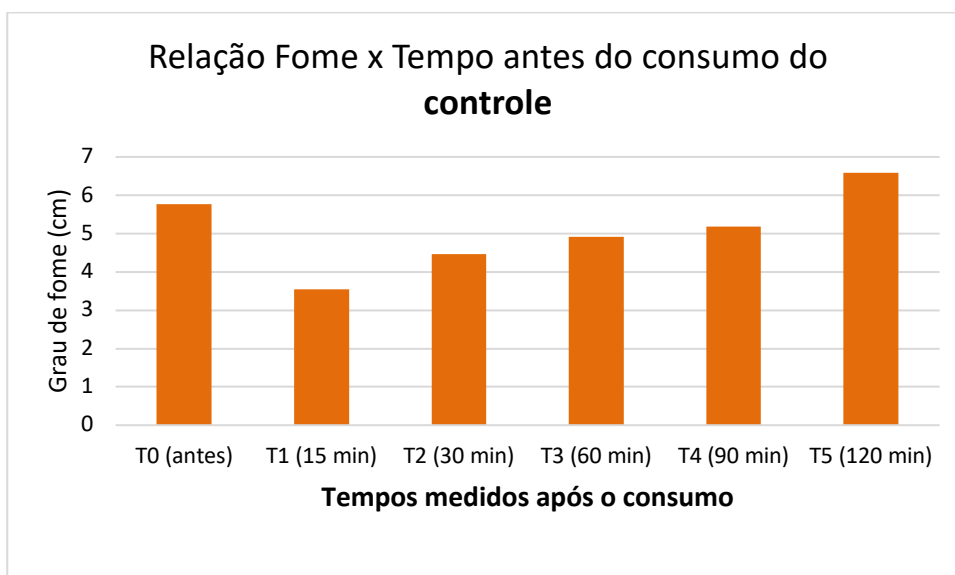


Figura 9 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do controle (1 pão francês + 1 copo de água). (T0) = antes de comer; (T1) = 15 min comer; (T2) = 1/2 hora após comer; (T3) = 1 hora após comer; (T4) = 1 1/2 hora após comer e (T5) = 2 horas após comer

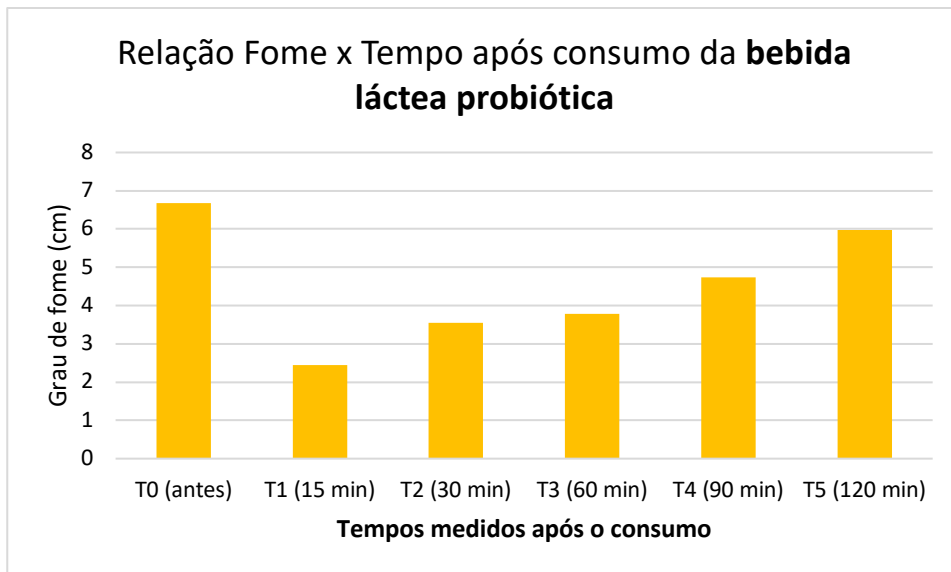


Figura 10 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão da bebida láctea probiótica.

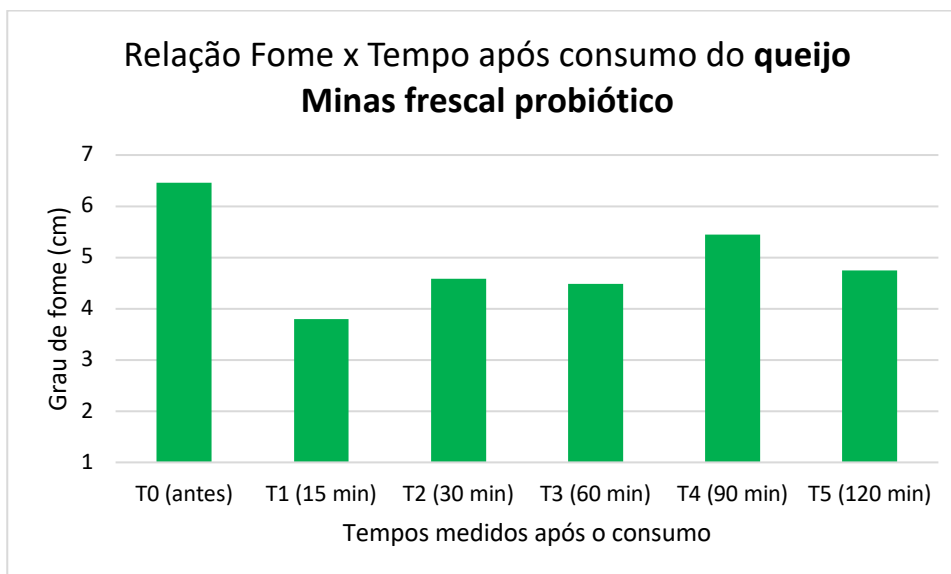


Figura 11 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do queijo Minas frescal probiótico.

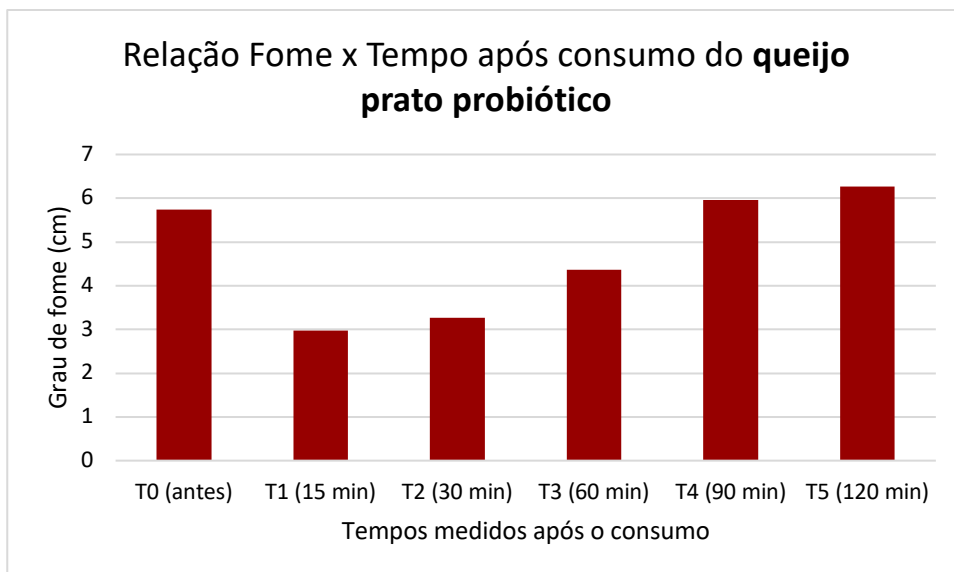


Figura 12 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do queijo prato probiótico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. TESTES *IN VITRO*

Os resultados das análises de composição bruta comprovaram que as matérias-primas utilizadas encaixavam-se dentro da Legislação Brasileira e ajudarão no entendimento de algumas análises posteriores.

A análise anti-hiperglicêmica *in vitro* trouxe os seguintes resultados:

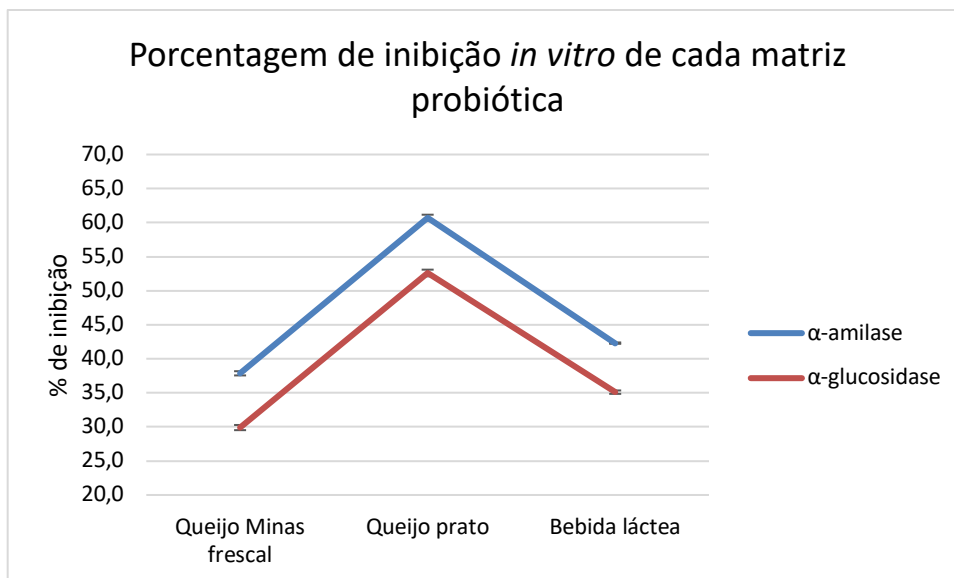


Figura 13 - Gráfico da média dos resultados ($n = 3$) da porcentagem de inibição *in vitro* das enzimas α -amilase e α -glucosidase após o consumo de cada matriz probiótica

O gráfico apresenta uma boa visualização de que o queijo prato apresentou uma inibição bem mais significativa do que as demais matrizes, seguido da bebida láctea e do queijo Minas frescal. Os dados apresentaram um baixíssimo desvio padrão, o que dá uma confiabilidade ainda maior aos resultados.

Testes de variância ANOVA & Friedman foram usados para confirmar a significância dos dados, apresentados a seguir.

Tabela 5 - Porcentagem de inibição *in vitro* das enzimas α -amilase e α -glucosidase após o consumo de cada matriz probiótica ($n=3$)

Matriz	Inibição	
	α -amilase	α -glucosidase
Queijo prato	60,700 a	52,633 a
Bebida láctea	42,300 b	35,067 b
Queijo Minas frescal	37,867 c	29,933 c
Pr > F(Modelo)	< 0,0001	< 0,0001
Significância	Sim	Sim

Os resultados foram expressos como desvio padrão médio ($n = 3$). Resultados na mesma linha com diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,0001$).

Como esperado, o teste de variância confirmou a significância dos dados.

5.2. TESTES *IN VIVO*

Comparativamente, foi possível obter o gráfico abaixo, para melhor visualização dos resultados da análise anti-hiperglicêmica *in vivo*:

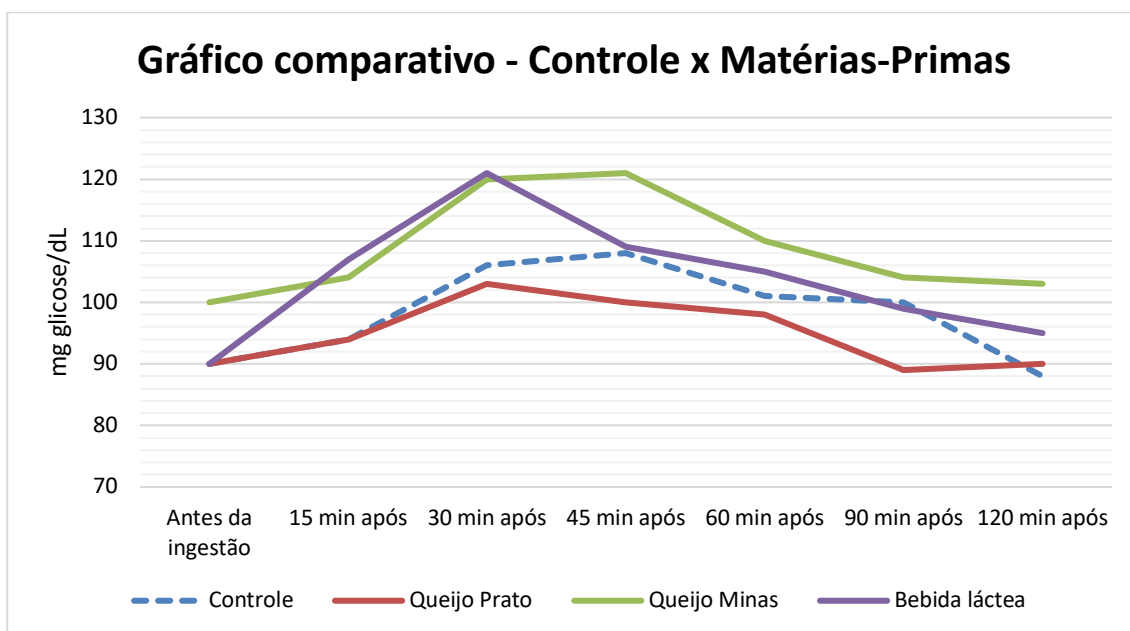


Figura 14 - Comparação dos resultados alcançados com as três matrizes probióticas nos tempos pré-estabelecidos

Enquanto o queijo Minas fresco e a bebida láctea aumentaram o pico de glicose, o queijo prato apresentou uma redução neste pico em relação ao controle ainda reduziu a taxa glicêmica pós-prandial.

Os resultados foram expressos como desvio padrão médio. A área abaixo da curva (AUC) para glicose será calculada usando a regra trapezoidal para determinar a redução da resposta glicêmica, expressa em mg/dL. Também foram avaliados as seguintes variáveis em curvas de glicose (CORRÊA et al., 2007):

- GB – Glicose no tempo zero (mg/dL);
- GPV – Valor máximo de glicose (mg/dL);
- Alg (GPV – GB) – Aumento máximo de glicose (mg/dL);
- GIP ((Alg/GB)x100) – Porcentagem incremental de glicose (%);
- GIV (Alg/horário de pico) – Velocidade incremental de glicose (mg/dL min).

Testes de variância ANOVA & Friedman foram usados para comparar os resultados da AUC entre o controle e cada matriz.

Nos experimentos *in vivo*, a matriz que melhor se comportou foi o queijo prato, apresentando um menor pico de glicose durante o experimento e consecutivamente, menor aumento máximo de glicose, menor aumento incremental de glicose, menor porcentagem incremental de glicose, menor velocidade incremental de glicose e menor área abaixo da curva.

Tabela 6 - Análise de variância do efeito do consumo de diferentes matrizes adicionadas do probiótico *L. casei* sob a glicemia pós-prandial em indivíduos saudáveis ($n = 15$)

Matriz	GPV	Alg	GIP	GIV	AUC
Bebida láctea	126,600 a	36,600 a	40,812 a	1,392 a	12518,000 ab
Queijo Minas frescal	125,333 a	25,667 b	26,512 b	0,685 b	13112,833 a
Controle	118,267 ab	28,400 ab	32,305 ab	0,676 b	11949,933 bc
Queijo Prato	110,800 b	20,800 b	23,755 b	0,548 b	11416,500 c
Pr > F (Modelo)	0,002	0,020	0,026	0,0003	< 0,0001

Os resultados foram expressos como desvio padrão médio ($n = 15$). Resultados na mesma linha com diferentes letras são significativamente diferentes. GPV = Valor máximo de glicose, Alg = aumento máximo de glicose, GIP = porcentagem incremental de glicose, GIV = velocidade incremental de glicose e AUC = área abaixo da curva.

Diferente do queijo Minas frescal, o queijo prato possui um longo período de maturação (sendo assim, mais proteico), o que pode ter feito diferença na formação dos peptídeos bioativos, que estão diretamente relacionados à inibição da atividade das enzimas α -glucosidase e α -amilase. Também é mais rico em lipídeos que as demais matérias-primas estudadas (o que pode ter facilitado o efeito de proteção à estes peptídeos e menos úmido (o que poderia interferir diretamente na dispersão dos peptídeos). Quanto maior a liberação das enzimas proteolíticas pelos probióticos, maior a produção destes peptídeos (GOMES *et al.*, 2009).

Na interação entre os componentes principais (análise PCA), a similaridade dos resultados entre as amostras e a variabilidade entre os participantes ainda pode ser observada através das elipses de confiança de

comprimento e sobreposição para três das quatro amostras, sendo que uma destas três também sobrepôs a uma quarta. As amostras mais similares, dentro dos aspectos avaliados, foram: controle, queijo prato e bebida láctea (as três se sobrepuseram). Em relação ao queijo Minas frescal, este se sobrepôs somente à bebida láctea, sendo assim, mais similar à ela do que às outras matrizes probióticas.

Quanto à análise de saciedade, a partir dos resultados abaixo demonstrados, foi possível observar um grande desvio padrão, uma vez que, fome é um sentimento extremamente subjetivo e, como apontado acima, depende de muitos fatores internos e externos. Observou-se um padrão, todas os voluntários tiveram uma maior sensação de saciedade 15 min após a ingestão das matrizes e, nas próximas medições foram se sentindo menos saciados com o tempo.

Comparando as matrizes, a bebida láctea probiótica apresentou um aumento na saciedade um pouco maior do que as outras, seguida do queijo prato e por último, o queijo Minas frescal.

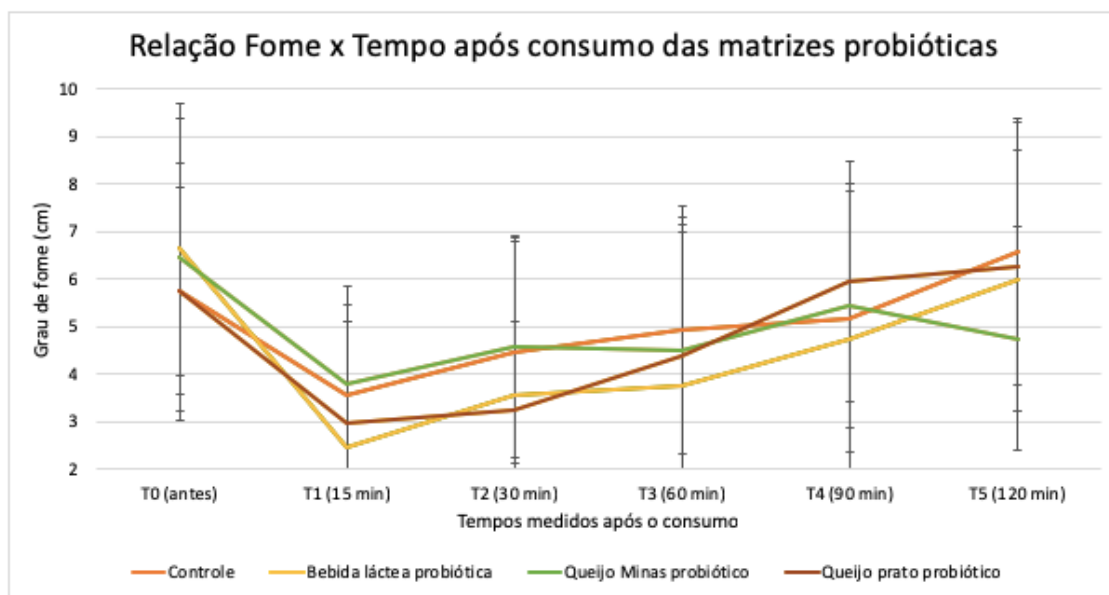


Figura 15 - Gráfico comparativo de perfis médios de fome por formulação ao longo do tempo após a ingestão do controle e matrizes probióticas. (T0) = antes de comer; (T1) = 15 min comer; (T2) = 1/2 hora após comer; (T3) = 1 hora após comer; (T4) = 1 1/2 hora após comer e (T5) = 2 horas após comer

Os resultados *in vivo* do controle ficaram entre os das demais matrizes, uma vez que, a formulação delas tinha uma carga glicêmica maior, inserida propositalmente para elevar o pico glicêmico e depois avaliar a sua possível redução.

A partir dos dados e resultados apresentados neste experimento, foi possível concluir que, dentre as três matrizes probióticas a que obteve mais sucesso na redução da glicemia pós-prandial foi o queijo prato. Em seguida vieram a bebida láctea e o queijo Minas frescal, respectivamente. Embora estes dois últimos tenham apresentado um pico maior e bem semelhante de insulina nos testes *in vivo*, notou-se uma maior redução na taxa glicêmica (confirmada nos testes *in vitro*) com a ingestão da bebida láctea probiótica.

Analisando os resultados da análise de saciedade, a matriz mais bem avaliada foi a bebida láctea, seguida do queijo prato e queijo Minas frescal.

Sensorialmente, a bebida láctea também a matriz mais bem aceita (seguida do queijo Minas frescal e em terceiro lugar, o queijo prato). Os voluntários gostaram muito do sabor dos produtos degustados e disseram que comprariam se eles estivessem disponíveis no mercado.

As elipses de confiança da análise dos componentes principais comprovaram que existe similaridade entre as amostras.

6. Conclusão

A partir dos dados e resultados apresentados neste experimento, o queijo prato foi a matriz láctea com os melhores resultados, apresentando melhor composição nutricional (maior teor de gordura e proteína), maior atividade anti-hiperglicêmica *in vitro* (maior atividade inibidora da α -amilase e α -glicosidase) e nos estudos em humanos (menor aumento da glicemia pós prandial e manutenção dos demais índices glicêmicos (GB, GPV, Alg, GIP, GIV e AUC) em indivíduos saudáveis), tornando possível observar uma correlação adequada entre os estudos *in vitro* e *in vivo*, como os produtos com maior inibição de α -glucosidase e α -amilase (*in vitro*) resultando em uma menor taxa de glicemia pós-prandial no estudo em humanos.

Este estudo é o primeiro a avaliar o efeito de diferentes matrizes lácteas na atividade anti-hiperglicêmica, com achados muito importantes, mostrando que o tipo de matriz láctea desempenha um papel crucial na observação dos efeitos anti-hiperglicêmicos e que é recomendado o uso de queijos maturados e/ou bebidas lácteas como matriz principal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADISAKWATTANA, S. *et al.* In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal alpha-glucosidase and pancreatic alpha-amylase. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 110, 2012.

ALMEIDA, K. E. de; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. de O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, p. 7-13, 2000.

ALVES, C. C. *et al.* Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo e queijo minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.

AMMOR, M.S., MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. **Meat Sci.** **76**, p. 138–146, 2007.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc. Br.** v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

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

ARAGON-ALEGRO, L.C., ALEGRO, J.H.A., CARDARELLI, H.R., CHIU *et al.* Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Sci. Technol.** v. 40, p. 669–675, 2007.

ARIHARA, K. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Sci.** v. 74, p. 219–229, 2006.

BARREIROS, A. L. , DAVID, J. M. , DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília; 1999.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento** - Regulamento técnico para fixação de Identidade e Qualidade do queijo prato - Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997; Link: http://www.agais.com/normas/leite/queijo_prato.htm - Acesso em 7 de maio de 2019 às 20:00 hrs.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, Instrução Normativa nº 16, de 23/08/2005 - Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea; Link: http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-16-2005_75591.html - Acesso em 7 de maio de 2019 às 22:00 hrs.

CASTRO, J. M., TORNADIJO, M. E., FRESNO, J. M. et al. "Biocheese: A Food Probiotic Carrier," **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 7230, 11 pages, 2015.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61–84, 2005.

CHAVAN, J.K., KADAM, S.S. Critical reviews in food science and nutrition. **J Food Sci**. v. 28, p. 348–400, 1989.

CICHOSKI, A. J. *et al.* Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

COLLINS, J. K., THORNTON, G., SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.

COPPOLA, M. de M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CORRÊA, F., NOGUEIRA, V. G., BEVILÁCQUIA, M. F. & GOMES, M. B. Insulin resistance and secretion assessment across a range of glucose tolerance from normal individuals through diabetes. **Arquivos brasileiros de Endocrinologia e Metodologia**, v. 51 (9), p. 1948 – 1955, 2007.

DUNNE, C. *et al.* In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, n. 2, p. 386-392, 2001.

EJTAHED, H. S., MOHTADI-NIA, J., HOMAYOUNI-RAD, A. *et al.* Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutr. (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 28, p. 539–543, 2012.

EJTAHED, S. H. *et al.* Iogurte probiótico melhora o estado antioxidante em doentes diabéticos tipo 2. **Nutrição**. v. 28, p. 539 – 543, 2002.

ESTATÍSTICAS DO LEITE. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 2010. Disponível em: <<http://www.cnppl.embrapa.br/>>. Acessado em: 08 ago, 2018.

FELICIO, T. L., ESMERINO, E. A., VIDAL, V. A. S. *et al.* Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. **Food Chemistry**, v. 196, p. 628-637, 2016.

FLINT, A., RABEN, A., BLUNDELL, J. E. *et al.* Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. 38 – 48, 2000.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; SWEENEY, P.L.H. Fundamentals of cheese science. **Maryland: Aspen Publication**, p. 587, 2000.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO, J.P.M. Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: **Dipemar**, p. 118, 1994.

GARCIA, G.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MEDEIROS, A.P. *et al.* Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v.101, p. 263-268, 2006.

GARDINER, G. *et al.* Evaluation of cheddar cheese as food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1379–1387, 1999.

GOMES, A. C. *et al.* Gut microbiota, probiotics and diabetes. **Nutrition Journal**. p.13-60, 2014.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

GOMES DA CRUZ, A., BURITI, F. C. A., BATISTA DE SOUZA, C. H., FONSECA FARIA, J. A., & ISAY SAAD, S. M., Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20(8), p. 344–354, 2009.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. *et al.* Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. **Trends Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, n. 9, 10, p. 334-340, 2002.

LAVELLI, V. *et al.* Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian alpha glucosidase and alpha-amylase—effect of food matrix and processing on efficacy. **Food & Function**, n. 7, v. 3, p. 1655–1663, 2016.

LEE, Y. K. *et al.* Handbook of probiotics. **New York: John Wiley**, 1999.

LERAYER, A. L. S. *et al.* Nova legislação comentada de produtos lácteos: revisada e ampliada. **São Paulo: Revista Indústria de Alimentos**, v. 1, 2002.

LIN, M.-Y. AND CHANG, F.-J. Antioxidative effect of intestinal bacteria bifidobacterium longum ATCC 15708 and Lactobacillus acidophilus ATCC 4356. **Digest. Dis. Sci.** v. 45, p. 1617–1622, 2000.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal, Barking**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

MADUREIRA, A. R., C. I. PEREIRA, A. M. P. GOMES, M. E. PINTADO, AND F.

X. MALCATA, Bovine whey proteins—Overview on the main biological properties. **Food Res. Int.** v. 40, p.1197–1211, 2007.

MANTZOURIDOU, F., KAROUSIOTI, A., KIOSSEOGLOU, V. Formulation optimization of a potentially prebiotic low-in-oil oat-based salad dressing to improve *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* survival and physicochemical characteristics. **LWT-Food Sci. Technol.** v. 53, p. 560–568, 2013.

MARTENSON, O., ÖSTE, R., HOLST, O. The effect of yogurth culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. **Food Res. Int.** 35, p. 775–784, 2002.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. *et al.* Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 7, p. 768-774, 2006.

MATOS, P. M. S de. Probióticos. 2010. 19 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade do Porto, Porto, 2010.

MERCOSUL. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Resolução Mercosul / GMC / RES** Nº 145/96, link: http://www.agais.com/normas/leite/queijo_minas_frescal.htm - Acesso em 7 de maio de 2019 às 19:00 hrs.

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

OLIVEIRA, M. N. *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 38, n. 1, 2002.

OMS - Organização Mundial de Saúde: **Mundial Estatísticas de Saúde OMS / FAO.** Genebra: QUEM; 2012.

PEIXOTO, L. L.; SILVA, R. P. P. Os efeitos dos probióticos e prebióticos na promoção de um organismo saudável [monografia]. Teófilo Otoni (MG): Faculdade de Educação e Estudos Sociais de Teófilo Otoni; 2008. **Fuller R. Probiotics in man and animals.** J Appl Bacteriol. p. 66, 365-378, 1989.

PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relation between quality and

rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 49, n. 1, p. 7-13, 2001.

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

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALEATA, F. X. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science Technology International**, London. v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001.

PINTO, C. P.; MASCARENHAS, M. O.; FIGUEIREDO, H. M. *et al.* Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade microbiológica. In: **Congresso nacional de laticínios**, 21, Juiz de Fora. Anais..., Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes. v. 59, p.198-201, 2004.

RAINS, J. L. AND JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biol. Med.** v. 50, p. 567–575, 2011.

REBUCCI, R., SANGALLI, L., FAVA, M. *et al.* Evaluation of functional aspects in *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. **J.Food Qual.** v. 30, p. 187–201, 2007.

REN, Y., LIANG, K., JIN, Y., ZHANG, M., CHEN, WU, H., & LAI, F., IDENTIFICATION and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa L.*) seed protein. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 439–450, 2016.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven *myrtaceous* fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005.

RIBEIRO, L.R.; GUTIERREZ, L.L.P.; RABBO, M.P.S. **Práticas em fisiologia e fisiologia do exercício**. Porto Alegre: Sulina, 2009.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low- cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam. v. 32, n. 3, p. 135-142, 2006.

SALMINEN, M. K., *et al.* *Lactobacillus bacteremia*, clinical significance and patients outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. **Clin Infect**

Dis. v. 38, p. 62-69, 2004.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SECONDULFO, M. *et al.* Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. **Dig Liver Dis**, v. 36, p. 35–45, 2004.

SILVA, B. Y.; MARTINS, T. F. Alimentos prebióticos e probióticos na manutenção da saúde humana: Qual a abrangência? **Revista de atenção à saúde**, v. 13, n. 44, p. 71-79, 2015.

SILVA, H. L. A., BALTHAZAR, C. F., ROCHA, R. S. *et al.* Sodium reduction and flavor enhancers addition: is there an impact on the availability of minerals from probiotic Prato cheese? **LWT**, v.93, p. 287–292, 2018.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.

SPERRY, M. F., SILVA, H. L. A., BALTHAZAR, C. F., ESMERINO, *et al.* Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 435–443, 2018.

STÜRMER, E. S.; CASASOLA, S.; GALL, M. C.; GALL, M. C. 2013. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.27, n.4, p , 32 – 45.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.

TUOHY, K.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C.W.; Gibson, G.R. Usando probióticos e prebióticos para melhorar a saúde do intestino. **Foco terapêutica**. v. 8, p. 692-700, 2003.

USKOVA, M. A. AND KRAVCHENKO, L. V. Antioxidant properties of lactic acid bacteria–probiotic and yogurt strains. **Vopr. Pitan**, v. 78, p. 18–23, 2009.

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

VILCACUNDO, R., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., & HERNANDEZ-LEDESMA, B., RELEASE of dipeptidyl peptidase IV, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 531–539, 2017.

YU, Z., YIN, Y., ZHAO, W., YU, Y., LIU, B., LIU, J., *et al.* Novel peptides derived from egg white protein inhibiting α -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1376–1382, 2011.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO TÉCNICO

Produtos lácteos probióticos: Eficientes para decrescer a glicemia pós-prandial?

Laís C. Grom¹, Celso F. Balthazar², Jonas T. Guimarães², Tatiana C. Pimentel³, Elisa L. Venâncio⁴, Itallo Collopy Junior⁴, Paula M.C. Maciel⁴, Mônica Q. Freitas², Erick A. Esmerino², Márcia C. Silva¹, Adriano G. Cruz^{1*}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Alimentos, 20270-021, Rio de Janeiro, Brasil

²Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Medicina Veterinária, 24230-340 Niterói, Brazil

³Instituto Federal do Paraná (IFPR), Paranavaí, 87703-536, Paraná, Brasil

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Curso de Farmácia, 21715-000, Rio de Janeiro, Brasil

1. Introdução

O diabetes é uma síndrome metabólica decorrente da ausência de produção de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente suas funções, causando um aumento da glicose no sangue (Chen *et al.*, 2014). Existem diversos tipos de diabetes, tais como: Tipo 1 (DM1, doença autoimune mediada por células T que resulta na destruição das células beta produtoras de insulina do pâncreas), Tipo 2 (DM2, desencadeada por tendência genética associada à uma rotina sem hábitos saudáveis resultando em produção insuficiente de insulina e/ou alterações em sua ação), gestacional (ocorre durante a gravidez e causada pela disfunção na produção e ação da insulina no corpo), e outras mais raras, como as ocasionadas por doenças no pâncreas, uso de medicamentos ou doenças endocrinológicas (Solis-Herrera *et al.*, 2018).

A população mundial com diabetes era de 382 milhões em 2013 e tem previsão de crescimento para 592 milhões em 2035 (Kim, Keogh & Clifton, 2018). No Brasil, 16 milhões de brasileiros têm diabetes e a taxa de incidência da doença cresceu 61,8% nos últimos dez anos (Agência Brasil, 2017). Vários fatores desempenham papel na incidência de DM2, tais como obesidade, sedentarismo e alimentação inadequada (Mahajan, Snehi, & Singh, 2018).

A glicemia pós-prandial é a medida da glicose no sangue algum tempo depois do consumo de alimentos contendo carboidratos. Em indivíduos normais, as concentrações de glicose começam a subir cerca de 10 minutos após o início de uma refeição, atingem seu pico (geralmente <140 mg/dL) após 60 minutos e retornam aos níveis pré-prandiais dentro de 2 a 3 horas (Gross, Ferreira & Oliveira, 2003). Pacientes com DM2, no entanto, apresentam níveis superiores a 200 mg/dL. Portanto, a hiperglicemia pós-prandial é uma das primeiras anormalidades da glicemia associada ao DM2 e é marcadamente alta em pacientes diabéticos que apresentam hiperglicemia em jejum (Támez-Pérez *et al.*, 2015). Devido a isso, cresce a cada dia o número de consumidores preocupados com sua saúde e que buscam os mais diversos alimentos capazes de manter uma boa saúde e bem-estar. Essa constante procura por uma alimentação equilibrada incentiva pesquisas no mundo inteiro em busca de componentes naturais biologicamente ativos capazes de fornecer esses benefícios tão almejados pelos consumidores (Nikbakht *et al.*, 2018). Neste

contexto, surgem os alimentos adicionados de bactérias probióticas (Sun *et al.*, 2019).

1.1. Bactérias ácido-láticas

As bactérias do ácido láticas (LAB) são um grupo de bactérias gram-positivas, catalase-negativas, não-esporuladas, cocos ou hastes aeróbicas estrictas ou facultativas que produzem ácido lático como um de seus principais produtos resultantes do metabolismo de carboidratos (Stackebrandt & Teuber 1988, Stiles & Holzapfel 1997). Embora a distinção entre LAB e bifidobactérias tenha sido reconhecida (Sonomoto & Yokota, 2011), alguns autores ainda usam uma definição mais ampla de LAB, que inclui bifidobactérias. Essa confusão é comum e aceita ao lidar com cepas probióticas (Hickey *et al.*, 2015).

As LAB são bem conhecidas como culturas iniciadoras na fabricação de produtos de fermentação (Carr *et al.*, 2002, Hayek & Ibrahim 2013, Khalid 2011, Pokusaeva *et al.*, 2011, Quinto *et al.*, 2014). A maioria das LAB são geralmente reconhecidas como microrganismos seguros (GRAS) e têm inúmeras aplicações em alimentos. Seu potencial probiótico também as torna muito atraentes no âmbito dos alimentos funcionais (Quinto *et al.*, 2014). Para beneficiar a saúde humana, as LAB, geralmente, precisam ser viáveis e funcionais, embora em alguns casos até organismos não viáveis possam induzir efeitos positivos para a saúde (Ditu *et al.*, 2014).

Várias revisões destacam a necessidade de mais pesquisas visando interações entre bactérias e alimentos e como essas interações são afetadas por mudanças nos alimentos, implicando, portanto, alterações nos benefícios à saúde (Hickey *et al.*, 2015, Mortazavian *et al.*, 2012, Sanders & Marco 2010). O impacto das cepas das LAB em seus hospedeiros humanos tem sido extensivamente estudado (Carr *et al.*, 2002, Quinto *et al.*, 2014, Sanders & Marco 2010), mas pesquisas com foco nas interações entre as LAB probióticas e seu formato de entrega nos alimentos permanecem relativamente escassas.

Estrutura e composição da matriz alimentar, bem como fabricação, armazenamento e digestão de alimento desempenham um papel importante no aprimoramento ou na redução dos efeitos de viabilidade e saúde de cepas das LAB (Ranadheera *et al.*, 2010, Sanders *et al.*, 2014).

Para fornecer benefícios à saúde, as LAB devem sobreviver até atingir o

trato alvo (por exemplo, o intestino) em que se destinam colonizar (Borges *et al.*, 2016). A capacidade da LAB sobreviver em uma determinada matriz (ou seja, sua viabilidade) varia de acordo com muitas condições, incluindo a tensão considerada, matriz de entrega, etapas de fabricação e condições de armazenamento.

As etapas mais críticas que afetam a entrega da LAB viável e funcional ao hospedeiro são: a fabricação da matriz alimentar onde será aplicada, armazenamento e digestão (Champagne *et al.*, 2005, Mortazavian *et al.*, 2012). A estabilização das bactérias também desempenha um papel importante na preservação da viabilidade e funcionalidade da LAB e deve ser considerada cuidadosamente antes de se envolver no processo de criação alimentícia (Champagne *et al.*, 2005, Mortazavian *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, a viabilidade da LAB é avaliada através da enumeração bacteriana. As amostras são coletadas em diferentes momentos e são inoculadas em meios de crescimento específicos. Em seguida, as contagens de colônias são realizadas.

1.2. Produtos lácteos e as cepas probióticas mais recomendadas

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (Hill *et al.*, 2014). Os probióticos devem ser mantidos viáveis ao longo do armazenamento do produto, é recomendável que sobrevivam às condições adversas do estômago e colonizem o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal humano (Pereira *et al.*, 2018). Muitos estudos consideram uma dose inicial mínima de 10^6 - 10^8 UFC/g no produto para que os probióticos possam resistir ao trato gastrointestinal e chegar ao intestino em quantidade adequada (Kim, Keogh & Clifton, 2018). Todavia, a quantidade mínima requerida e o período ideal de administração dos probióticos ainda não estão totalmente estabelecidos, já que o efeito varia de acordo com a espécie de microrganismo e com o tipo de alimento (Gomand *et al.*, 2019). O consumo de produtos probióticos é seguro, uma vez que, estudos demonstram que a administração a pessoas saudáveis não aumenta o risco de doenças. No entanto, testes de segurança devem ser realizados sempre que uma nova cepa probiótica é estudada (Pereira *et al.*, 2018).

Produtos lácteos são matrizes alimentícias preferencias para adição de probióticos como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium* (Champagne, Daga & Cruz, 2018). Os produtos lácteos fermentados constituem o maior quantitativo de produtos probióticos, principalmente por já apresentarem imagem positiva diante dos consumidores; não necessitarem de mudanças na tecnologia envolvida e no processo de fabricação e pela capacidade de proteger os probióticos através do trânsito gastrointestinal. Além disso, o processo fermentativo atua na manutenção da viabilidade microbiana e os consumidores estão familiarizados com o fato de que esses produtos contêm microrganismos vivos (Boza-Méndez, López-Calvo & Cortés-Muñoz, 2012; Gomand et al., 2019).

Entre os efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de culturas probióticas, merecem destaque o controle das infecções intestinais, o estímulo da motilidade intestinal com conseqüente alívio da constipação intestinal, a melhoria na absorção de determinados nutrientes, a melhoria na utilização da lactose, o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a diminuição dos níveis de colesterol, o efeito anticarcinogênico e o estímulo do sistema imunológico (Kerry et al., 2018; Quigley, 2019; Cheng et al., 2019).

Segundo Gomes et al., 2014, o consumo de probióticos aumenta o número de bifidobactérias. Consecutivamente, o aumento da expressão de proteínas de adesão reduz a permeabilidade intestinal, prejudicando a ativação do TLR4 (receptores que estão presentes em tecidos direcionados para ações de insulina) pelos lipopolissacarídeos (principal componente da membrana externa de células gram-negativas e conhecidos como importante ativador de resposta imunológica). Como resultado, os caminhos de ativação do NFκB (complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição) são bloqueados. A indução de células TH17 (que são responsáveis por desencadear processos inflamatórios crônicos) também é inibida, impedindo a infiltração pancreática de células TCD8 + (linfócitos com ação citolítica).

Muitas cepas probióticas foram amplamente investigadas para invenção sob diferentes formas. Entretanto, declaração de consenso cujo qual delas trabalha melhor não pôde ser alcançada, pois os estudos não convergem, uma vez que, sempre são utilizadas diferentes linhagens em diferentes modelos animais (Hampe & Roth 2017). É importante mencionar que cepas probióticas

relacionadas fechadas geralmente variam consideravelmente concentrações funcionais e estruturais, como o gênero *Lactobacillus* (Canchaya *et al.*, 2006).

Por exemplo, uma meta-análise dos efeitos de determinadas *Lactobacillus spp.* mostrou que *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus ingluviei* e *Lactobacillus acidophilus* são associados ao ganho de peso, enquanto a administração de *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus plantarum* promove perda de peso em animais obesos e humanos (Million *et al.*, 2012).

Além disso, o enriquecimento da microbiota intestinal com *L. reuteri* em humanos tolerantes à glicose induziram a um pequeno aumento secreção de insulina, possivelmente devido a um aumento na liberação de incretinas. *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus plantarum* também demonstraram reduzir o peso, embora apenas limitados estudos concebidos para o nosso conhecimento exibiram seus efeitos. No entanto, um estudo controlado por placebo usando *Lactobacillus salivarius* UCC118 em 175 mulheres obesas grávidas não mostra efeitos sob a glicemia de jejum materna ou sob a gravidez após tratamento probiótico de 4 semanas (Lindsay *et al.*, 2014). Neste âmbito, fica sempre o questionamento: qual cepa probiótica funciona melhor? No entanto, antes da identificação da cepa, o gênero (por exemplo, levedura probiótica, bacilos ou bifidobactérias) devem ser determinados previamente.

O consumo de iogurte probiótico contendo um total mínimo de 10^{10} UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* La5 e *BIFIDOBACTERIUM animalis* Bb12 por 9 meses em um estudo clínico randomizado controlado concluiu que os probióticos mantêm os níveis séricos de insulina e pode ajudar as mulheres grávidas a evitar o desenvolvimento de resistência à insulina em contraste com o iogurte convencional (Asemi *et al.*, 2013). Esta meta-análise concluiu que probióticos e suplementação simbiótica podem ser benéficos na redução da glicemia em jejum em adultos e que várias espécies probióticas podem ter mais impacto que uma única espécie (Nikbakht *et al.*, 2016). Ao todo, são necessários mais estudos para identificar qual cepa deve ser utilizada e como deve ser preparada para aplicação combinada ou concentrada em múltiplas deformações como alimento funcional.

1.3. Produtos lácteos probióticos e diabetes

Os probióticos têm muitos efeitos benéficos e vários mecanismos de

intervenção probiótica no DM2 (Panwar *et al.*, 2013). Existe um grande número de estudos que viabilizam probióticos como suplemento dietético para intervenção e tratamento de distúrbios metabólicos, incluindo diabetes (Tonucci *et al.*, 2017). No geral, o efeito benéfico dos probióticos na intervenção DM2 é mediado pela melhoria da integridade intestinal, diminuição dos níveis de lipopolissacarídeos, aumento de incretinas, diminuição do estresse do retículo endoplasmático e melhora da sensibilidade periférica à insulina (Park *et al.*, 2015; Balakumar *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2016). Os probióticos também podem exercer efeitos antidiabéticos por meio de tolerância à diminuição da glicose, regulação do metabolismo lipídico melhorando o status antioxidante e modulação da flora intestinal e dos ácidos graxos de cadeia curta (Simon *et al.*, 2015; Akbari *et al.*, 2016). Além disso, eles reduzem a resposta inflamatória, a resposta autoimune e o estresse oxidativo (Gomes *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017).

Após administração oral, os probióticos podem modular a microbiota intestinal, ajustar o metabolismo energético e influenciar resposta imune. Portanto, hipoteticamente, os probióticos podem diminuir a incidência de DM2, atrasar e reverter a extensão, prejudicar a disfunção durante o início, desenvolvimento, complicando assim, os processos de desenvolvimento da doença.

A hiperglicemia é caracterizada por uma translocação bacteriana aumentada do intestino para os tecidos, levando a um baixo grau inflamação e DM2, enquanto o probiótico *Bifidobacterium* é capaz de inverter o processo de translocação e melhorar o estado inflamatório e metabólico (Amar *et al.*, 2011). Acredita-se que a inflamação metabólica crônica pode ter ligação à melhoria da resistência à insulina e essa é uma característica típica incidência de DM2.

A administração de *Bifidobacterium longum* é capaz de normalizar os níveis de lipopolissacarídeos plasmáticos, mieloperoxidase, bem como atividade inflamatória intestinal que está amplamente envolvida na doença inflamatória intestinal e diabetes (Chen *et al.*, 2011). Investigações prospectivas concluíram que a ingestão de laticínios fermentados contendo probióticos está inversamente associada à dependência do DM2 (Sluijs *et al.*, 2012; O'Connor *et al.*, 2014).

Outros estudos mostraram que os probióticos restringem o desenvolvimento de DM2, melhorando a tolerância à glicose e sensibilidade

linear (Chen *et al.*, 2012). *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 conferem efeito retardador ao desenvolvimento de DM2 por expressão ativada pelo proliferador de peroxissoma alfa-receptor. *Lactobacillus rhamnosus* GG têm efeitos anti-inflamatórios e diminuem a inflamação por citocinas, que também estão envolvidas no desenvolvimento de diabetes (Gao *et al.*, 2015). Além disso, probióticos micróbios causam alterações metabólicas e oxidativas no estresse do hospedeiros e, portanto, têm impacto na incidência e/ou desenvolvimento de diabetes. Por exemplo, *Lactobacillus reuteri* GMNL 263 revertem drasticamente a diminuição das atividades de enzimas antioxidantes em ratos com dieta rica em gorduras (Hsieh *et al.*, 2013). Suplementação com *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* reverteu significativamente as alterações de vários metabólitos enzimáticos e indicadores de estresse, como alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, glutatona, níveis de peroxidase, superóxido dismutase, catalase e malondialdeído, em ratos induzidos por dieta rica em gorduras (Nido *et al.*, 2016). *Lactobacillus fermentum* MTCC5689 resistiu ao desenvolvimento da DM2 em camundongos e modulou beneficemente todas as alterações químicas e moleculares (Balakumar *et al.*, 2018).

Coletivamente, esses estudos demonstram que os probióticos não afetam apenas o estágio inicial, mas também o estágio de extensão de diabetes.

Existem poucos ensaios clínicos registrados que investigaram a intervenção probiótica em pacientes humanos com DM. Avaliando 14 estudos encontrados, quatro investigaram os efeitos diabéticos com cepas probióticas únicas e nove estudos utilizaram cepas combinadas.

Todos estes estudos tratados por 4 a 12 semanas e 10^{10} UFC/g foram administrados por via oral para a maioria das bactérias probióticas. Cinco ensaios demonstraram uma diminuição significativa da glicemia em jejum após intervenção probiótica (Ejtahed *et al.*, 2012; Moroti *et al.*, 2012; Asemi *et al.*, 2013; Bayat *et al.*, 2016; Tajadadi Ebrahimi *et al.*, 2017). Os níveis de hemoglobina glicada (Ejtahed *et al.*, 2012; Bayat *et al.*, 2016; Firouzi *et al.*, 2017; Tonucci *et al.*, 2017b) e insulina sérica em jejum (Tajadadi-Ebrahimi *et al.*, 2014, 2017; Firouzi *et al.*, 2017) também foram significativamente reduzidos em vários estudos após intervenção probiótica, juntamente com outros índices diferentes.

Por outro lado, os probióticos aumentaram as taxas de incretina (Simon *et al.*, 2015), de sensibilidade à insulina (Andreasen *et al.*, 2010; Mobini *et al.*, 2016) e às enzimas, bem como o papel antioxidante (Ejtahed *et al.*, 2012; Asemi *et al.*, 2014). Enfim, muitos efeitos benéficos foram obtidos em estudos com animais e validados em ensaios clínicos para intervenção probiótica em pacientes com DM2, embora existam inconsistências em todos estes estudos.

Os probióticos são bons transportadores ou “dispositivos de entrega” e, desta forma, ajudam a evitar alergias ou doenças auto imunes (Robert & Steidler 2014). Além disso, efeitos sinérgicos e terapêuticos podem ser percebidos na intervenção da DM2. Com isso, outros estudiosos realizaram experimentos com animais utilizando probióticos na administração oral de alvos antidiabéticos. As proteínas-alvo são inibidores ou incretinas que têm efeitos terapêuticos diferentes. Inibidores, como peptídeos inibidores da amilase, diminuíram a glicemia em jejum após a administração de probióticos durante 20 dias em ratos diabéticos (D’Souza *et al.*, 2012). A incretina GLP-1, um peptídeo de 30 aminoácidos ainda está sendo minuciosamente estudado (Turton *et al.*, 1996), por retardar o esvaziamento gástrico, reduzir o apetite, prolongar o período de saciedade pós-prandial e desempenhar um papel crucial na homeostase da glicose, induzindo a liberação de insulina dependente de glicose e induzindo o crescimento das células-beta no pâncreas (Sandoval 2008). Após a chegada do GLP-1 pelo *Lactobacillus lactis* em ratos diabéticos e obesos, há uma notável redução da glicemia em jejum e aumento significativo da insulina (Agarwal *et al.*, 2014). Além disso, a taxa de transporte do GLP-1 através da monocamada de células MDCK aumentou oito vezes quando fornecida por probióticos recombinantes em comparação com a sua forma tradicional de solução. Da mesma forma, a administração oral do GLP-1 da *Bifidobacterium longum* melhorou a absorção do GLP-1 no dois pontos (Wei *et al.*, 2015). A administração oral de um peptídeo semelhante ao GLP-1 por *Bifidobacterium* promoveu a proliferação de “células ilhotas” e secreção de insulina. Idealmente, essa intervenção reduziu a glicemia em jejum em ratos com DM2 alimentados com uma dieta rica em gordura e induzidos por estreptozotocina, que é um agente antineoplástico alquilante e ocorrência natural que é particularmente tóxico para as células beta produtoras de de insulina do pâncreas em memíferos (Huang, 2013). Além disso, a entrega de dez repetições de GLP-1 por S.

cerevisiae INVSc1 reduziu significativamente o a glicemia em jejum em ratos com DM2 após administração oral (Wu *et al.*, 2015).

Mecanismos moleculares envolvendo os efeitos anti-diabéticos de probióticos ainda não estão completamente elucidados, mas podem ser relacionados com a redução do stress oxidativo, imunomodulação, inflamação e atenuação na modificação da microbiota intestinal (Ejtahed, *et al.*, 2012), podendo ter grade efetividade no tratamento da DM1 e DM2.

Uma das principais características da DM2 é o aumento sistêmico do estresse oxidativo (Rains & Jain, 2011). Uma maneira de contrabalançar o aumento de espécies reativas ao oxigênio e o esgotamento de antioxidantes é complementá-los através da dieta. Além dos polifenóis, bactérias intestinais como as espécies de *Bifidobacterium* e intervenções dietéticas com probióticos contendo certas cepas de *Lactobacillus acidophilus* melhoraram a tolerância à glicose e o status antioxidante total em pacientes com este tipo da doença (Ejtahed *et al.*, 2012).

Portanto, estudos anteriores mostraram que diferentes espécies de bactérias ácido lácticas exibem atividade antioxidante (Uskova e Kravchenko, 2009; Lin & Chang, 2000). As bactérias ácido lácticas mais frequentemente relatadas exibindo atividade antioxidante são *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Saccharomyces boulardi*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus* e *E. faecium SF68*. Apenas o gênero *Lactobacillus* compreende mais de 120 espécies utilizados em ensaios experimentais e clínicos.

Estudos recentes relatam que na DM2, a concentração de *Bifidobacterium spp.* no intestino pode ser positivamente correlacionada com uma melhor tolerância à glicose e secreção de insulina. Também demonstram que as bifidobactérias podem reduzir os níveis de endotoxina e melhorar as barreiras da mucosa intestinal, reduzindo assim, a inflamação sistêmica e subsequentemente a incidência de diabetes.

A suplementação de probióticos também reduz a população de bactérias patogênicas gram-negativas no intestino e modula a resposta imunitária. Vários mecanismos para a inibição de bactérias gram-negativas por probióticos foram postulados, incluindo a competição por nutrientes e locais de adesão, produção de compostos inibidores diretos (tais como bacteriocinas) e abaixamento do pH do cólon pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (Tuohy, 2003).

Como microrganismo alimentar, os probióticos são normalmente usados em combinação com outros ingredientes alimentares. No entanto, não temos nenhuma resposta exata de que forma pode ser melhor quando usada para intervenção na DM2. Apesar do status do paciente, a forma de produto probiótico como alimento em si também pode ter impacto na eficiência durante a intervenção na DM2. Portanto, uma pergunta subsequente é: de que forma a determinação das estirpes probióticas extraídas devem ser utilizadas? Yadav e cols. mostraram que a administração de iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* por 8 semanas atrasou significativamente o tolerância à glicose diminuída, hiperglicemia, hiperinsulina, hiperlipidemia, estresse oxidativo e risco reduzido de DM2 em ratos resistentes à insulina induzidos por dieta rica em gorduras (Yadav *et al.*, 2007).

1.4. Produtos lácteos probióticos e a glicemia pós-prandial

Os produtos lácteos probióticos auxiliam na redução da glicemia pós-prandial por exercerem uma função anti-diabética, que está diretamente relacionada à inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase (Chen *et al.*, 2014). A Figura 1 apresenta o mecanismo de ação de culturas probióticas sobre elas. As enzimas α -amilase e α -glucosidase estão localizadas nas bordas do intestino e são responsáveis pela hidrólise de oligossacarídeos e dissacarídeos complexos em glicose, os quais são posteriormente absorvidos pelo intestino (Chen *et al.*, 2014). Os probióticos teriam a capacidade de reduzir a atividade das dessas enzimas intestinais, com conseqüente diminuição na hidrólise de polissacarídeos e dissacarídeos e absorção de glicose, mantendo assim os níveis de glicose no sangue (Zeng *et al.*, 2016). Algumas cepas de bactérias probióticas também são capazes de estimular a secreção de incretina, que é uma substância produzida pelo pâncreas e intestino, responsável por regular o metabolismo da glicose (Panwar *et al.*, 2014).

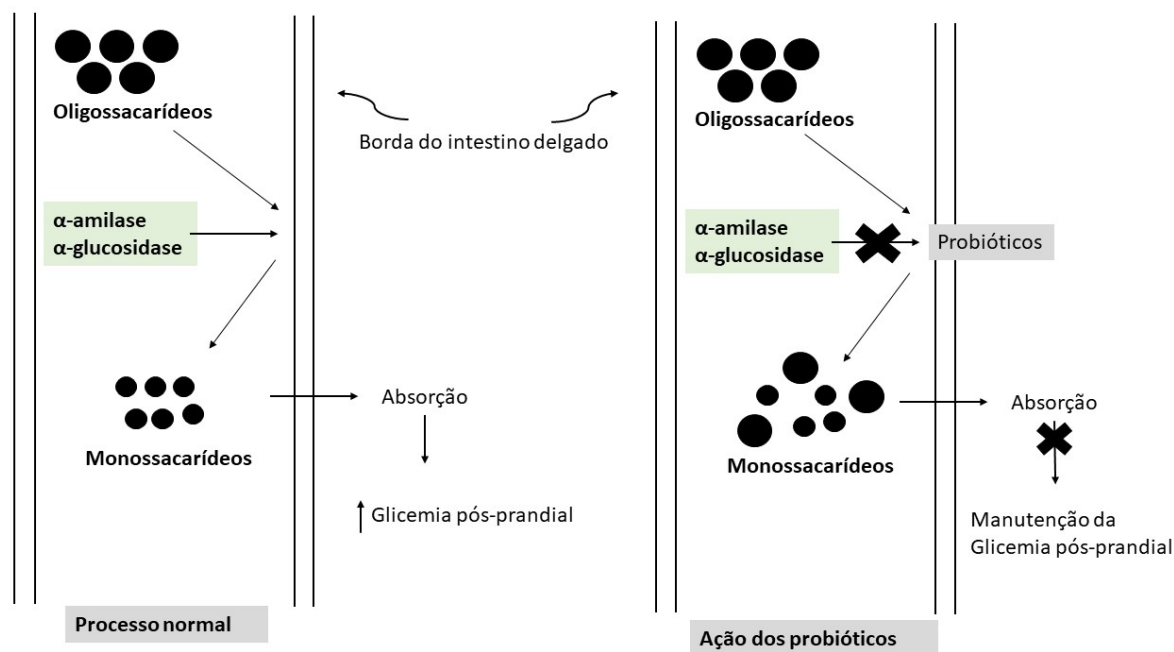


Figura 1. Mecanismo de ação de culturas probióticas sob as enzimas α -amilase e α -glucosidase. Adaptado de Patil *et al.* (2015).

Desta forma, inibidores da α -glucosidase são uma abordagem terapêutica, e a acarbose é utilizado para diabéticos como uma potente inibidora da α -glucosidase.

Em um estudo, descobriram que os níveis de glicose no sangue em camundongos administrados com *Lactobacillus gasseri* BNR17 foram inferiores aos do grupo controle com acarbose (Yun, Park & Kang, 2009). Outro estudo adicional demonstrou que as células GG de *Lactobacillus rhamnosus* abaixaram significativamente os níveis de glicose no sangue e melhoraram a hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina neonatal em comparação com grupo controle ($p < 0,05$) com acarbose (Tabuchi *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, têm aumentado o interesse nos potenciais efeitos benéficos da probióticos, particularmente em termos dos seus efeitos imunomoduladores. Pesquisas anteriores mostraram que as bactérias probióticas podem diminuir significativamente o estresse oxidativo dos níveis elevados na indução da frutose em ratos diabéticos (Yadav, Jain & Sinha, 2007) e inclusive melhorar o desempenho biossintese de glutathiona, reduzindo o estresse oxidativo na pancreatite (Lutgendorff *et al.*, 2008). Graças às suas capacidades antioxidantes e redutoras de glicose no sangue, espera-se que os

probióticos se provem úteis no futuro tratamento de DM2 em humanos.

Estudos relatam que a ingestão de sucos pode minimizar a glicemia pós-prandial (Balisteiro *et al.*, 2017), porém, para produtos lácteos probióticos, eles ainda são escassos. As pesquisas disponíveis abrangem *testes in vitro* que simulam a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase (Ayyash *et al.*, 2018) ou poucos estudos clínicos com humanos (Watson *et al.*, 2019, Khoury *et al.*, 2019). Em estudo ainda não publicado, nosso grupo observou que produtos lácteos probióticos (queijo Minas frescal, queijo prato ou bebida láctea adicionados de *L. casei*) apresentam atividade anti-hiperglicêmica *in vitro* (atividade inibidora da α -amilase e α -glicosidase) e *in vivo* (menor aumento na glicemia pós-prandial em indivíduos saudáveis).

Como resumido, a maioria dos estudos em animais utiliza probióticos para intervenção em DM2. Contudo, benefícios do uso dessas cepas nem sempre são consistentes. Entre os estudos limitados avaliando os efeitos dos probióticos no DM2, em alguns pacientes, algumas cepas probióticas reduziram a glicemia em jejum e os níveis de hemoglobina glicada em seres humanos. Como estirpe única, *Lactobacillus Acidophilus* NCFM e *Lactobacillus reuteri* SD5865 podem ser de particular importância. Como o primeiro preservou a sensibilidade à insulina em ambos indivíduos não diabéticos e diabéticos, e o último melhorou significativamente a secreção de uma proteína semelhante ao glucagon e insulina.

Entretanto, outro regulador, como o fator de crescimento 21 dos fibroblastos, pode ser um novo alvo para entrega de probióticos e é promissor para o tratamento da diabetes (Suh *et al.*, 2014): microRNAs são RNAs não codificantes que impedem o diabetes lesão de órgão induzida (Zhang *et al.*, 2017). Esses estudos forneceram novos alvos para entrega de probióticos na intervenção de diabetes.

Exceto os probióticos amplamente utilizados, o *Akkermansia muciniphila* é novo probiótico com potencial na avaliação da propriedade antidiabética. A transferência do *A. muciniphila* pode reduzir ou atrasar o desenvolvimento de diabetes em camundongos. Este probiótico é capaz de promover a produção de muco e aumentar a expressão do peptídeo antimicrobiano Reg3c, diminuindo níveis séricos de endotoxina. O consumo diário de *A. muciniphila* melhora a tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e redução expressão gênica

relacionada à síntese e transporte de ácidos graxos ao fígado e músculo. Enquanto isso, em estudo recente, a suplementação de *A. muciniphila* reduziu o nível crônico de baixo grau de inflamação (Zhao *et al.*, 2017). Portanto, a prioridade deste novo probiótico é garantir seus efeitos benéficos tanto no DM1 quanto no DM2, especialmente durante a fase de intervenção precoce.

No entanto, novas experiências e ensaios clínicos são inevitavelmente necessário para identificar e comparar os efeitos de diferentes diferentes cepas probióticas e doses no futuro (Tonucci *et al.*, 2017).

A probabilidade de ação dos probióticos também é um fator muito importante que afeta sua atividade antidiabética (Toshimitsu *et al.*, 2017; Evvie *et al.*, 2017). A duração e o cronograma ideais da terapia devem ser determinados para alcançar resultados constantes e favoráveis resultados clínicos. Como observado, mais estudos com quantidade representativa de amostragem e uma metodologia científica sólida são necessários para formar as diretrizes de tratamento baseadas em evidências para intervenção probiótica no diabetes (Rad *et al.*, 2017).

1.5. Peptídeos bioativos

As proteínas do leite, principalmente os peptídeos e aminoácidos derivados, foram associados à regulação da glicemia pós-prandial e à secreção de insulina em pacientes normais e com DM2 (Kung *et al.*, 2018). Os peptídeos bioativos são encontrados, principalmente, em produtos lácteos fermentados, como iogurtes, bebidas lácteas e queijos de longa maturação, devido à ação dos microrganismos sob a caseína durante o processo fermentativo (Ayyash *et al.*, 2018). Esses compostos desempenham um papel vital no controle da DM2 por meio de vários mecanismos, como resposta à saciedade, regulação de hormônios incretinas e dos níveis de insulina, e redução da atividade de enzimas digestivas degradadoras de carboidratos (Horner *et al.*, 2016).

As proteínas do soro do leite representam apenas cerca de 20% (p/p) de todo o estoque de proteínas do leite, enquanto as caseínas são responsáveis pela maior parte. Estas proteínas possuem importantes propriedades nutricionais e biológicas, particularmente no que diz respeito à promoção da saúde e prevenção de doenças e condições de saúde (Madureira *et al.*, 2007).

Os peptídeos bioativos derivados de leite foram identificados como ingredientes potenciais de alimentos funcionais que promovem a saúde. A hidrólise controlada das proteínas do soro libera estes peptídeos, a maioria dos quais ainda não foram caracterizados no mesmo grau dos peptídeos derivados da caseína. No entanto, os peptídeos de soro têm o potencial de desempenhar papéis importantes, atuando como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, antioxidante, hipocolesterolêmico, reguladores da função imune, assim como, fatores de crescimento.

Fragmentos peptídicos biologicamente ativos são formados durante a degradação do leite. Proteínas (soro de leite e caseína) são degradadas por enzimas digestivas no trato gastrointestinal e pelas LABs durante a fermentação do leite. Nestes processos, variedades de peptídeos contendo de 2 a 20 aminoácidos residuais são formados. Uma vez liberados e absorvidos, esses peptídeos bioativos podem exercer efeitos fisiológicos no sistema cardiovascular, digestivo, endócrino, imunológico e nervoso.

Peptídeos derivados de proteínas do leite também podem exercer múltiplas atividades fisiológicas, incluindo, antioxidante, antitrombótico, antihipertensivo, atividade de síntese, modulação de enzimas digestivas, absorção de nutrientes e respostas imunes. Muitos peptídeos derivados do leite revelam propriedades multifuncionais, isto é, sequências peptídicas específicas que podem exercer duas ou mais diferentes atividades biológicas. Por causa da sua fisiologia e versatilidade bioquímica, os peptídeos do leite são considerados constituintes muito importantes para a incorporação em alimentos funcionais, novos suplementos alimentares e até produtos farmacêuticos com o objetivo de atingir doenças específicas.

Diferentes estudos demonstraram um profundo potencial inibitório de peptídeos bioativos derivados de alimentos contra as enzimas α -glucosidase e α -amilase, devido à sua especificidade de ação e afinidade com o alvo molecular (Yu *et al.*, 2011). O possível mecanismo de ação pelo qual os peptídeos inibem as enzimas é que eles interagem via ligações hidrofóbicas com o sítio ativo da enzima, entretanto, o mecanismo exato envolvido para sua atividade inibitória ainda é desconhecido (Vilcacundo, Martínez-Villaluenga, & Hernandez-Ledesma, 2017). O potencial inibitório da α -glucosidase e α -amilase dos

peptídeos acontece devido aos aminoácidos hidrofóbicos, como confirmado por Ren *et al.*, (2016).

Uma abordagem terapêutica para o manejo do DM2 é através da inibição das enzimas hidrolisantes, como alfa-amilases e alfa- glucosidases no órgão digestivo. Outra abordagem terapêutica para a gestão do DM2 é a utilização de agentes redutores de glicose. Atualmente, no campo da pesquisa diabética, o foco principal está no desenvolvimento de agentes hiperglicêmicos de origem natural e seguros sem efeitos colaterais. A intervenção nutricional foi estabelecida como o elemento principal na prevenção e gerenciamento do DM2.

Nos seres humanos, vários biomarcadores diabéticos são afetados pela ingestão alimentar de proteínas alimentares e hidrolisados pelas mesmas. Foi investigado que as proteínas do leite, principalmente peptídeos derivados de proteínas do leite e aminoácidos também têm sido associados à regulação da glicemia pós-prandial e secreção de insulina em pacientes normais e com DM2.

2. Conclusão

A ingestão de produtos lácteos probióticos pode trazer benefícios à saúde relacionados com o diabetes, reduzindo a glicemia pós-prandial. Embora o uso potencial de probióticos como suplemento dietético e alimento funcional para diabetes seja incerto, tal abordagem pode oferecer vantagens sobre terapias com medicamentos, uma vez que possui um espectro de atuação mais amplo e menos efeitos colaterais. Estudos adicionais devem ser realizados utilizando diversas matrizes lácteas.

Referências bibliográficas

Adisakwattana, S. *et al.* (2012) *In vitro* inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal alpha-glucosidase and pancreatic alpha-amylase. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 110.

Agência Brasil. (2017) Pesquisa revela que diabetes no Brasil cresceu 61,8% em dez anos. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-04/pesquisa-revela-que-diabetes-no-brasil-cresceu-618-em-dez-anos>. Acesso em 05 de agosto de 2019.

Asemi, Z., Khorrani-Rad, S. A., H. Alizadeh, Shakeri, H., Esmailzadeh, A. (2014) Effects of synbiotic food consumption on metabolic status of diabetic patients: A double-blind randomized crossover controlled clinical trial. *Clinical Nutrition* 33, 2, 198–203.

Ayyash, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S. *et al.* (2018) *In vitro* investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 239, 588-597.

Balakumar, M., D. Prabhu, C. Sathishkumar, P. Prabu, N. Rokana, R. Kumar, S. Raghavan, A. Soundarajan, S. Grover, V. K. Batish, *et al.* (2018) Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *European Journal of Nutrition* 57, 1, 279–295.

Balisteiro, D. M., De Araújo, R. L., Giacaglia, I. R. *et al.* (2017) Effect of clarified Brazilian native fruit juices on postprandial glycemia in healthy subjects. *Food Research International*, 100, 196-203.

Borges, S., Barbosa, J., Silva, J., Gomes, A. M., Pintado, M., *et al.* (2016^a) A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 381–88.

Borges, S., Barbosa, J., Teixeira, P. (2016^b) Gynecological health and probiotics. *In Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*, 741–52.

Boza-Méndez, E., López-Calvo, R., Cortés-Muñoz, M. (2012) Innovative dairy products development using probiotics: challenges and limitations. *Probiotics*, 213-226.

Canchaya, C., M. J. Claesson, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen, and P. W. O'Toole (2006) Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* 152, 11, 3185–3196.

Carr, F. J, Chill, D., Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 4, 281–370.

Champagne, C. P., Cruz, A. G. & Daga, M. (2018) Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, 22, 160-166.

Chen, P., Zhang, Q., Dang, H. *et al.*, (2014) Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. *Food Control*, 35, 65-72.

Cheng, D., Song, J., Xie, M. *et al.*, (2019) The bidirectional relationship between host physiology and microbiota and health benefits of probiotics: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 426-435.

Corrêa, F., Nogueira, V. G., Beviláquia, M. F. & Gomes, M. BIFIDOBACTERIUM (2007) Insulin resistance and secretion assessment across a range of glucose tolerance from normal individuals through diabetes. *Arquivos brasileiros de Endocrinologia e Metodologia*, 51, 1948 – 1955.

Ditu, L.M., Chifiriuc, M. C., Bezirtzoglou, E., Marutescu, L., Bleotu, C. *et al.* (2014) Immunomodulatory effect of non-viable components of probiotic culture stimulated with heat-inactivated *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* on holoxenic mice. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 25, 23-39.

Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A. *et al.*, (2012) Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutr. (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28, 539–543.

Felicio, T. L., Esmerino, E. A., Vidal, V. A. S. *et al.*, (2016) Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, 196, 628-637.

Flint, A., Raben, A., Blundell, J. E. *et al.*, (2000) Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *International Journal of Obesity*, 24, 38 – 48.

Gao, K., C. Wang, L. Liu, X. Dou, J. Liu, L. Yuan, W. Zhang, and H. Wang (2015) Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50, 5, 700–713.

Gomand, F., Borges, F., Burgain, J. *et al.*, (2019) Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 285-310.

Gomes Da Cruz, A., Buriti, F. C. A., Batista De Souza, C. H., Fonseca Faria, J. A., & Isay Saad, S. M. (2009) Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20, p. 344–354.

Gross, J. L., Ferreira, S. R., & Oliveira, J. E. D. (2003) Glicemia pós-prandial. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 47, 728-738.

Hampe, C. S., and C. L. Roth. (2017) Probiotic strains and mechanistic insights for the treatment of type 2 diabetes. *Endocrine* 58, 2, 1–21.

Hickey, C. D., Auty, M. A. E., Wilkinson, M. G., Sheehan, J. J. (2015a) The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localization and their interactions during ripening: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 41, 2, 135–48

Hickey, C. D., Sheehan, J. J., Wilkinson, M. G., Auty, M. A. E. (2015b) Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. *Front. Microbiol.* 6, 99.

Hsieh, F. C., C. L. Lee, C. Y. Chai, W. T. Chen, Y. C. Lu, and C. S. Wu. (2013) Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutrition & Metabolism* 10, 1-35.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., *et al.*, (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506-514.

Horner, K., Drummond, E., Brennan, L. (2016) Bioavailability of milk protein-derived bioactive peptides: a glycaemic management perspective. *Nutrition Research Reviews*, 29, 91-101.

Kerry, R G., Patra, J. K., Gouda, S. *et al.*, (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 927-939.

Khoury, D., Vien, S., Sanchez-Hernandez, D. *et al.*, (2019) Increased milk protein content and whey-to-casein ratio in milk served with breakfast cereal reduce postprandial glycemia in healthy adults: An examination of mechanisms of action. *Journal of Dairy Science*, DOI: 10.3168/jds.2019-16358.

Kim, Y. A., Keogh, J. BIFIDOBACTERIUM, Clifton, P. M. (2018) Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews*, 31, 35-51.

Kung, BIFIDOBACTERIUM, Anderson, G. H., Paré, S. *et al.*, (2018) Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake. *Journal of Dairy Science*, 101, 8688-8701.

Lindsay, K. L., M. Kennelly, M. Culliton, T. Smith, O. C. Maguire, F. Shanahan, L. Brennan, and F. M. McAuliffe. (2014) Probiotics in obese pregnancy do not reduce maternal fasting glucose: A double-blind, placebo-controlled, randomized trial (Probiotics in Pregnancy Study). *The American Journal of Clinical Nutrition* 99, 6, 1432–1439.

Madureira, A. R., C. I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, And F. X. Malcata. (2001) Bovine whey proteins—Overview on the main biological properties. *Food Res. Int.*, 40, 1197–1211.

Mahajan, BIFIDOBACTERIUM, Snehi, S. K., Singh, V. (2018) Antidiabetic and anti-inflammatory effect of probiotic *Lactobacillus paracasei* MCC3195 in high fructose fed type 2 diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9, 3764-3773.

MERCOSUL. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. *Resolução Mercosul / GMC / RES N° 145/96*, link: http://www.agais.com/normas/leite/queijo_minas_frescal.htm Acesso em 7 de maio de 2019.

Million, M., E. Angelakis, M. Paul, F. Armougom, L. Leibovici, and D. Raoult (2012) Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis* 53, 2, 100–108.

Nido, S. A., S. A. Shituleni, B. M. Mengistu, Y. Liu, A. Z. Khan, F. Gan, S. Kumbhar, and K. Huang. (2016) Effects of selenium-enriched probiotics on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in mice fed a high-fat diet. *Biological Trace Element Research* 171, 2, 399–409.

Nikbakht, E., S. Khalesi, I. Singh, L. T. Williams, N. P. West, and N. Colson (2016) Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *European Journal of Nutrition* 57, 1, 95–106.

Nikbakht, E., Khalesi, S., Singh, I., *et al.*, (2018) Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *European Journal of Nutrition*, 57, 95-106.

Panwar, H.; Calderwood, D.; Grant, I. *et al.*, (2014) *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential. *European Journal of Nutrition*, 57, 1465-1474.

Park, K. Y., B. Kim, and C. K. Hyun (2015) *Lactobacillus rhamnosus* GG improves glucose tolerance through alleviating ER stress and suppressing macrophage activation in db/db mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 56, 3, 240–246.

Pereira, G. V. M, de Oliveira Coelho, BIFIDOBACTERIUM, Júnior, A. I. M., *et al.*, (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36, 2060-2076.

Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food Nutr. Sci.* 5(18):1765–75

Quigley, E. M. Microbiome-directed therapies: past, present, and future. (2019) Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17, 333-344.

Rains, J. L. And Jain, S. K. (2011) Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biol. Med.* 50, 567–575.

Ren, Y., Liang, K., Jin, Y., Zhang, M., Chen, Wu, H., & Lai, F. (2016) Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa L.*) seed protein. *Journal of Functional Foods*, 26, 439–450.

Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Rocha, R. S. *et al.* (2018) Sodium reduction and flavor enhancers addition: is there an impact on the availability of minerals from probiotic Prato cheese? *LWT*, 93, 287–292.

Sperry, M. F., Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Esmerino, *et al.* (2018) Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, 45, 435–443.

Solis-Herrera, C., Triplitt, C., Reasner, C., Defronzo, R. A., & Cersosimo, E. (2018). Classification of diabetes mellitus. *In Endotext [Internet]*. MDText. com, Inc. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279119/>.

Sluijs, I., N. G. Forouhi, J. W. Beulens, Y. T. van der Schouw, C. Agnoli, L. Arriola, B. Balkau, A. Barricarte, H. Boeing, H. B. Bueno-de-Mesquita, *et al.* (2012) The amount and type of dairy product intake and incident type 2 diabetes: Results from the EPIC-InterAct Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 96, 2, 382–390.

Simon, M.C., K. Strassburger, B. Nowotny, H. T. Kolb, P. Nowotny, V. Burkart, F. Zivehe, J. H. Hwang, P. Stehle, G. Pacini, *et al.* (2015) Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: A proof of concept. *Diabetes Care* 38, 10, 827–1834.

Sonomoto, K., Yokota, A. (2011) Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research. Poole, UK: *Horizon Sci. Press*.

Stackebrandt, E., Teuber, M. (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 317–24

Suh, J. M., J. W. Jonker, M. Ahmadian, R. Goetz, D. Lackey, O. Osborn, Z. Huang, W. Liu, E. Yoshihara, T. H. van Dijk, *et al.* (2014) Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer. *Nature* 513, 7518, 436–439.

Sun, Z., Sun, X., L. I., J., *et al.* (2019) Using probiotics for type 2 diabetes mellitus intervention: Advances, questions, and potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14.

Támez-Pérez, H. E., Quintanilla-Flores, D. L., Rodríguez-Gutiérrez, R., *et al.*, (2015) Steroid hyperglycemia: Prevalence, early detection and therapeutic recommendations: A narrative review. *World Journal of Diabetes*, 6, 1073.

Tuohy, K.; Probert, H. M.; Smejkal, C.W.; Gibson, G.R. (2001) Usando probióticos e prebióticos para melhorar a saúde do intestino. *Foco terapêutica*, 8, 692-700.

Tonucci, L. B., K. M. Olbrich dos Santos, L. Licursi de Oliveira, S. M. Rocha Ribeiro, and H. S. Duarte Martino (2017b) Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo controlled study. *Clinical Nutrition* 36, 1, 85–92.

Toshimitsu, T., S. Ozaki, J. Mochizuki, K. Furuichi, and Y. Asami (2017) Effects of *Lactobacillus plantarum* strain OLL2712 culture conditions on the anti-inflammatory activities for murine immune cells and obese and type 2 diabetic mice. *Applied and Environmental Microbiology* 83, 7, 03001-16.

Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernandez-Ledesma, (2017) *Bifidobacterium* release of dipeptidyl peptidase IV, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539.

Watson, L. E., *et al.*, (2019) Differentiating the effects of whey protein and guar gum preloads on postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Clinical Nutrition*, DOI: 10.1016/j.clnu.2018.12.014

Yadav, H., J.-H. Lee, J. Lloyd, P. Walter, and S. G. Rane (2013) Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *Journal of Biological Chemistry* 288, 35, 25088–25097.

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, BIFIDOBACTERIUM, Liu, J., *et al.*, (2011) Novel peptides derived from egg white protein inhibiting α -glucosidase. *Food Chemistry*, 129, 1376–1382.

Zhang, Y., X. Sun, B. Icli, and M. W. Feinberg (2017) Emerging roles for MicroRNAs in diabetic microvascular disease: Novel targets for therapy. *Endocrine Reviews* 38, 2, 145–168.

Zhao, S., W. Liu, J. Wang, J. Shi, Y. Sun, W. Wang, G. Ning, R. Liu, and J. Hong (2017) *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. *Journal of Molecular Endocrinology* 58, 1, 1–14.

Zeng, Z., Luo, J., Zuo, F. *et al.*, (2016) Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase inhibitory activity. *Journal of Functional Foods*, 20, 486-495.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO

The article was published in the Journal of Dairy Science in February 2020: Volume 103, Issue 2, Pages 1110–1119.

Postprandial glycemia in healthy subjects: Which probiotic dairy food is more adequate?

Laís C. Grom¹, Celso F. Balthazar², Jonas T. Guimarães², Cassia P. Barros², Tatiana C. Pimentel³, Elisa L. Venâncio⁴, Itallo Collopy Junior⁴, Paula M.C. Maciel⁴, Paulo Henrique F. Silva⁵, Mônica Q. Freitas², Erick A. Esmerino², Márcia C. Silva¹, Adriano G. Cruz¹

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Alimentos, 20270-021, Rio de Janeiro, Brasil

² Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Medicina Veterinária, 24230-340 Niterói, Brazil

³ Instituto Federal do Paraná (IFPR), Paranavaí, 87703-536, Paraná, Brasil

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Farmácia, 21715-000, Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Departamento de Nutrição, 36036-330 Juiz de Fora, Brazil

ABSTRACT

The consumption of probiotic-enriched dairy products is associated with many health benefits, including the antihyperglycemic activity. The impact on health is dependent on the type of probiotic culture used and the dairy product consumed. This study aimed to evaluate the effect of different probiotic-enriched dairy matrices (Minas Frescal cheese, Prato cheese, and whey dairy beverage) containing the probiotic culture *L. casei* on the antihyperglycemic activity *in vitro* determined by α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities, and in human

study through postprandial glycemia of healthy individuals (n = 15, consumption of bread as a control; bread + Minas Frescal cheese; bread + Prato cheese; bread + dairy beverage). Prato cheese presented the highest lipids (36.9 g/100 g) and protein (26.5 g/100 g) levels, as well as the highest α -amylase (60.7%) and α -glycosidase (52.6%) inhibitory activities among the dairy matrices studied. The consumption of Prato cheese resulted in a lower increase in blood glucose level (13 mg/dL) when compared to the consumption of bread alone (19 mg/dL), Minas Frescal cheese (20 mg/dL) and whey dairy beverage (30 mg/dL), with glycemic indices (PGV, peak glucose values; Δ g, absolute increase of glucose; GIP, glucose incremental percentage; GIV, glucose incremental velocity, AUC, area under the curve; BG, basal glucose; and HP, hyperglycemic peak) similar to that observed for the control. The present results demonstrated a good correlation between the *in vitro* and in human studies, and that the type of dairy matrix has an influence on the antihyperglycemic activity. It is concluded that the consumption of probiotic Prato cheese can contribute to the reduction of the postprandial glycemia in healthy individuals.

Key-words: Postprandial glycemia, probiotic, dairy foods

1. INTRODUCTION

The prevalence of diabetes is a global health problem, with a considerable increase in treatment costs, posing a serious problem for healthcare services. Thus, the development of dietary strategies to reduce the risk of diabetes and improve the health of the population is required (Kung et al., 2018, Koutnikova et al., 2018). Although *in vitro* assays of α -amylase and α -glycosidase activity inhibition can be considered effective approaches to investigate the effect of food intake on diabetes control (Ayyash et al., 2018), evidence of efficacy depends on clinical trials (Brown et al., 2018). The frequent consumption of cow's milk and dairy products has been associated with a lower risk of type 2 diabetes due to lower postprandial glycemia (Law et al., 2017a,b), and the inclusion of probiotic cultures to dairy matrices can improve this effect. Concerning the control of type 2 diabetes, the postprandial glycemia is the most important parameter to be controlled, because in the long term, it can lead to serious complications,

including hypertension, cardiovascular disorders, blindness, and renal failure (Patil et al., 2015).

Probiotics are living microorganisms which when administered in appropriate amounts can confer beneficial effects on the individual (Hill et al., 2014). For probiotic cultures to exert the health benefits, they should be viable ($> 10^6$ - 10^7 CFU/g) in the food product (Gomand et al., 2019). *L. casei* 01 is a known probiotic strain associated with several health benefits, such as antihypertensive (Sperry et al., 2018), antioxidant (Vasconcelos et al., 2019), hypocholesterolemic (Sperry et al., 2018), and anti-carcinogenic properties (Liu et al., 2011), as well as alleviation of the symptoms and inflammatory biomarkers of rheumatoid arthritis (Alipour et al., 2014, Vaghef-Mehrabany et al., 2014). The mechanisms of action include the improvement of the antioxidant activity and increase in the concentration of bioactive peptides that have hypotensive action (Sperry et al., 2018), regulation of the immune system and improvement of the disease status and inflammatory biomarkers of rheumatoid arthritis (Alipour et al., 2014), binding of cholesterol on the probiotic cellular surface, incorporation into the cell membrane and decrease in the serum cholesterol (Sperry et al., 2018), and increase in the antiproliferation activity on HT-29 cells and anticytotoxic activity (Liu et al., 2011). However, to date, there are no studies on the antihyperglycemic activity of this probiotic culture.

Minas Frescal cheese is considered one of the most popular cheeses in Brazil, has high production yield, provides excellent conditions for survival of probiotic strains, has high water activity, pH above 5.0, low salt levels, and absence of synthetic preservatives, besides allowing the consumption in the fresh form, once it is not a ripened cheese (Sperry et al., 2018). Prato cheese is a typical Brazilian ripened cheese, obtained by the coagulation of milk with rennet and/or other coagulant enzymes, complemented or not by the action of specific lactic acid bacteria (Vasconcelos et al., 2019). Whey Dairy beverages have a very promising market due to its sustainability appeal, since whey is a by-product from cheese production. In addition, studies have shown that whey dairy beverages have health benefits associated with the bioactive peptides, antioxidants, and essential amino acids present in whey (Turkmen et al., 2019; Coutinho et al., 2019), besides the attenuation of blood glucose and appetite (Zafar et al., 2013, Law et al., 2017a).

The impact of the consumption of probiotic dairy products on human health has been extensively studied, but the effect of the interactions between the probiotic culture and the type of matrix remains relatively scarce. The structure (solid or liquid) and the composition of the food matrix, as well as the manufacture and storage conditions, play an important role in increasing or decreasing the probiotic viability and the health effects provided by the products (Gomand et al., 2019). Previous studies have evaluated the impact of consumption of probiotic-enriched dairy matrices (Ruan et al., 2015, Rezaei et al., 2016; Barengolts et al., 2019) and probiotic capsules (Khalili et al., 2019) on the glucose regulation. These studies have focused on yogurts as probiotic-enriched dairy products and the effects of the consumption on the fasting glucose and fasting plasma insulin of patients with type II diabetes. To the best of our knowledge, there are no studies about the effect of different probiotic dairy matrices in postprandial glycemia in healthy individuals. In this sense, this study aimed to evaluate the effect of different probiotic dairy matrices (Minas Frescal cheese, Prato cheese and whey dairy beverage) on the antihyperglycemic activity *in vitro* (α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity) and in human studies (postprandial glycemia in healthy subjects).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. PROCESSING OF PROBIOTIC-ENRICHED DAIRY MATRICES

2.1.1. Probiotic Minas Frescal cheese

For manufacture of Minas Frescal cheese, refrigerated raw milk (3.4% fat) was pasteurized at 72 °C for 15 seconds and then cooled to 37 °C. Then, 0.2 g/L calcium chloride (Labsynth, Sao Paulo, Brazil), 0.1 g/L probiotic culture *Lactobacillus casei* 01 (Chr. Hansen, Valinhos, Brazil, 7-8 log CFU/g) and 3 g/L of coagulant powder (Halamix power, Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brazil) were added. Milk was maintained in a double jacketed tank for 40 minutes to coagulate. The curd was cut, the whey was removed, and the grains were put in 250g plastic molds. Dry salting was performed by direct addition of 0.8g NaCl on the cheese surface (250g). The cheeses were packed and stored at 5 °C (Sperry et al., 2018).

2.1.2. Probiotic Prato cheese

For the manufacture of probiotic Prato cheese, refrigerated raw milk (3.4% fat) was pasteurized at 72 °C for 15 seconds and then cooled to 37 °C. Then, 0.1 g/L of probiotic culture *Lactobacillus casei* 01 (Chr. Hansen, Valinhos, Brazil, 7-8 log CFU/g) was added and milk was left to rest in the manufacturing tank for 40 minutes at 45 °C. After this period, 0.2 g/L of calcium chloride (Labsynth, São Paulo, Brazil), 3 g/L of coagulant powder (Halamix power, Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brazil) and 5 mL of urucum dye was added. After coagulation (40 minutes), the curd was cut into cubes of 1 cm, followed by slow and continuous stirring for 15 minutes. Then, 30% of whey was replaced by hot water at 80 °C for a temperature increase of 1 °C every 3 minutes. The cheese grains were maintained for 40 minutes in the manufacturing tank, followed by total removal of whey and the addition of NaCl (1%). The grains were put in plastic molds and pressed at 0.1 MPa for 15 min; 0.24 MPa for 30 min; and 0.31 MPa for 90 min. After pressing, cheeses were vacuum packed in plastic packages and stored at 10 °C for 60 days for ripening (Silva et al., 2018).

2.1.3. Probiotic whey dairy beverage

For manufacture of the dairy beverage, whey powder was reconstituted in drinking water (11 g/100 mL) and mixed to cooled raw milk (3.4% fat) in whey: milk ratio of 30:70. Then, 50 g/L of sugar and 0.1 g/L of vanilla extract were added. The beverage was pasteurized at 72 °C for 15 seconds and cooled to 37 °C. Then, 0.1 g/L of probiotic culture *Lactobacillus casei* 01 (Chr. Hansen, Valinhos, Brazil, 7-8 log CFU/g) was added, and the beverage was packaged in sterile plastic bottles and stored at 5 °C. All dairy matrices showed probiotic counts between 7 and 8 log CFU/g.

2.2. PROXIMATE COMPOSITION

The dairy products were characterized for moisture, protein and fat contents according to the methodologies of the AOAC (2004).

2.3. *IN VITRO TESTS - DETERMINATION OF INHIBITORY ACTIVITIES OF α -GLYCOSIDASE AND α -AMYLASE*

For each dairy matrix (Minas frescal cheese, Prato cheese, and dairy beverage), water-soluble extracts (WSE) were prepared by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatants were filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ filter (Mixed Cellulose Esters, EMD Millipore Corporation, MA, USA) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis (Ayyash et al., 2018).

The α -glycosidase and α -amylase inhibitory activities were determined according to methodologies proposed by Adisakwattana et al. (2012) and Lavelli et al. (2016). The α -glycosidase inhibitory activity was determined by dissolving $100\text{ }\mu\text{L}$ of α -glycosidase (0.2 units/mL) in $100\text{ }\mu\text{L}$ of phosphate buffer ($\text{pH } 6.8$) and mixing with $150\text{ }\mu\text{L}$ of WSE. The mixture was incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes. The reaction started by the addition of $100\text{ }\mu\text{L}$ of substrate (2.5 mM p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, pNPG). After incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes, an aliquot of $80\text{ }\mu\text{L}$ of sodium carbonate solution (0.2 mol/L) was added to stop the reaction. The amount of p-nitrophenol (pNP) was quantified using a CMax Plus microplate reader at 405 nm . The percent inhibition was calculated according to Equation 1.

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

where,

Abs = absorbance readings.

For the α -amylase inhibitory activity, $100\text{ }\mu\text{L}$ of human salivary α -amylase (20 units/mL) were mixed to $100\text{ }\mu\text{L}$ of WSE and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes. The reaction started by the addition of $250\text{ }\mu\text{L}$ of starch solution (10 g/L) in phosphate buffer ($\text{pH } 6.8$) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. Then, $250\text{ }\mu\text{L}$ of dinitrosalicylic reagent (1% 3,5-dinitrosalicylic acid and 12% sodium potassium tartrate in 0.4 M NaOH) was added to stop the reaction, and the mixture was heated at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes. After cooling to room temperature in a cold-water bath, $2000\text{ }\mu\text{L}$ of distilled water was added to the mixture and absorbance readings were performed at 540 nm in a spectrophotometer. The percent inhibition was calculated according to Equation 2.

$$\% \text{ Inhibition} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{control}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100 \text{ (Equation 2)}$$

where,

Abs = absorbance readings.

2.4. HUMAN TEST

The experimental clinical protocol for the human testing is presented in Figure 1 and consisted in a repeated measure design. Adults (male and female) were recruited at the Federal Institute of Rio de Janeiro. The inclusion criteria included healthy individuals aged between 20 and 50 years, body mass index between 18 and 25 kg/m², and regular consumers of milk and/or dairy products (> 2 servings/week). The exclusion criteria included medical events, including regular use of medications, gastrointestinal disorders, food allergy, drug use, or smoking. High-intensity athletes, people using dietary supplements, pregnant women, and breast-feeding women were also excluded, as well as individuals trying to lose weight or whose weight has changed more than 5 kg in the last 6 months (Kung et al., 2018). The selection of volunteers was performed in a preliminary section, using self-assessed questionnaires and measurement of weight and height of the participants.

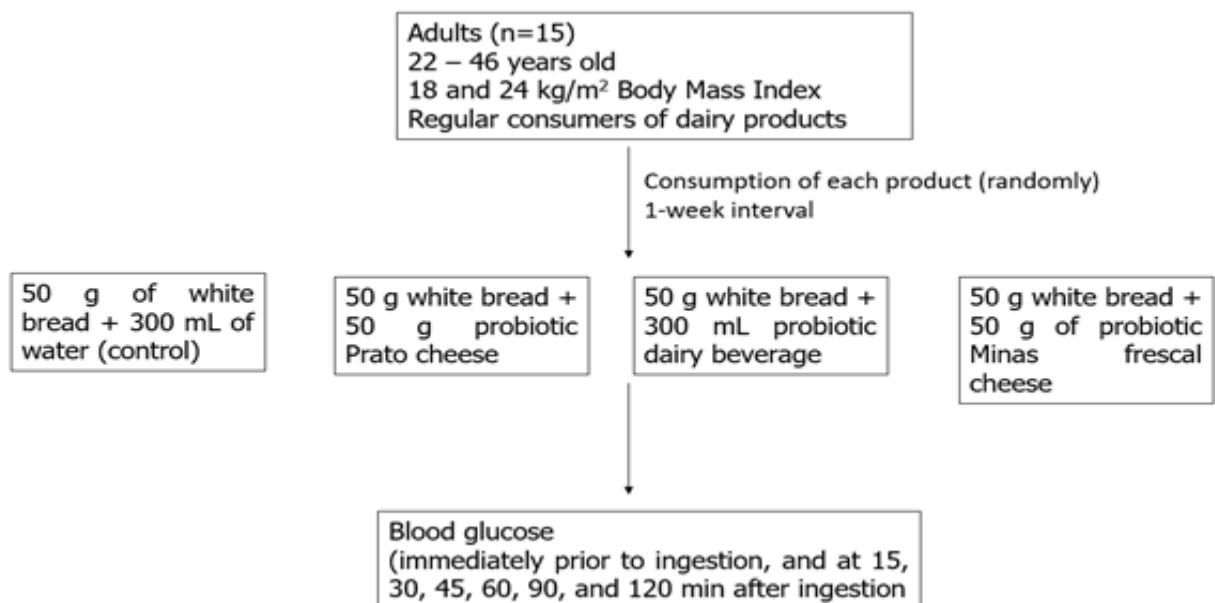


Figure 1. Experimental Clinical Protocol

A group of 15 healthy individuals (ages 22-46 years, male and female, with a mean BMI of 18-24 kg/m²) participated in the experiment. Participants consumed each of the 4 treatments coded with 3 random digits, with a 1-week interval between the experiments. The order of consumption was randomly selected. The treatments were: (1) 50 g of white bread + 300 mL of water (control); (2) 50 g white bread + 50 g probiotic Prato cheese; (3) 50 g white bread + 300 mL probiotic-enriched dairy beverage; and (4) 50 g white bread + 50 g of probiotic Minas frescal cheese. Before food intake, participants have fasted for 10 to 12 hours. Blood glucose levels were measured with the Accu-Chek® glucometer at the following times: immediately prior to ingestion, and at 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after ingestion. Therefore, the postprandial study lasted 2 h.

The area under the curve (AUC) of glucose was calculated using the trapezoidal rule to determine the reduction in glycemic response, expressed in mg/dL. Other variables were also evaluated (Corrêa, Nogueira, Bevilacqua & Gomes, 2007) as follows: baseline glucose (BG), obtained at time zero; peak glucose value (PGV), defined as the highest value above baseline observed after ingestion of the product and expressed in mg/dL; absolute increase of glucose (Alg), defined as the absolute difference between the maximum value obtained after stimulation period (PGV) and the baseline glucose (BG), expressed in mg/dL ($Alg = PGV - BG$); glucose incremental percentage (GIP), defined as the ratio between the absolute increase in glucose (Alg) and the baseline value (BG), expressed as a percentage ($GIP = (Alg/BG) \times 100$), and glucose incremental velocity (GIV), defined as the ratio between the absolute glucose increment (Alg) and the time in minutes where the peak value was recorded, expressed in mg/dLmin.

2.5. STATISTICAL ANALYSIS

The experiment (physicochemical characterization and *in vitro* assays) was repeated twice and the analyses were performed in triplicate. Data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's comparison test ($p = 0.05$). For the human assays, ANOVA and Friedman were used to compare the results between the control and the dairy matrices ($p = 0.05$). Principal component

analysis (PCA) was performed using a correlation matrix and aimed to obtain a two-dimensional representation of the dairy matrices and the glycemic parameters. In addition, confidence ellipses were constructed using the bootstrapping technique. Data set consisted of a 4×7 matrix, with the lines representing the products and the columns representing the parameters analyzed (Balthazar et al., 2018). The confidence ellipses represent the multidimensional stability of a sample within the map, and two overlapping ellipses indicate similarity between samples (Vidal et al., 2016). Statistical analyses were performed using XLSTAT 2019.2 software (Adinsoft, Paris, France).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of probiotic-enriched dairy matrices

Table 1 shows the results of the physicochemical composition (moisture, protein, and fat levels) of the probiotic-enriched dairy matrices. Minas Frescal cheese presented 66.2 g/100 g of moisture, 15.8 g/100 g of proteins, and 15.9 g/100 g of lipids, corroborating previous studies (Sperry et al., 2018, Matera et al., 2018). Prato cheese presented 51.5 g/100g of moisture, 26.5 g/100g of proteins, and 36.9 g/100g of lipids, as also reported by other authors (Matera et al., 2018, Domingos et al., 2018). The dairy beverage had 81.7 g/100 g of moisture, 2.12 g/100 g of protein, and 1.4 g/100 g of lipids, corroborating the findings of Janiaski et al. (2016).

Table 1. Gross composition of the probiotic dairy matrices

Dairy product	Moisture (g/100g)	Protein (g/100g)	Lipids (g/100g)
Minas Frescal cheese	66.2 ± 1.2 ^b	15.8 ± 1.1 ^b	15.9 ± 0.8 ^b
Prato cheese	51.5 ± 0.7 ^c	26.5 ± 0.7 ^a	36.9 ± 0.9 ^a
Whey beverage	81.7 ± 0.2 ^a	2.12 ± 0.4 ^c	1.4 ± 0.2 ^c

* Results are expressed in mean ± standard deviation. Numbers with different letter superscripts indicate a significant difference (p <0.05) between the different probiotic dairy matrices in accordance with Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test.

Prato cheese exhibited higher fat and protein contents when compared to all the products studied (p <0.05), and, consequently, a lower moisture content (p <0.05). Prato cheese undergoes a more intense pressing process than Minas Frescal cheese, contributing to a greater release of whey and an increase in the solids content (proteins and fat) of the product. In addition, this type of cheese is

subjected to ripening, thus the biochemical reactions can contribute to the physicochemical and sensory characteristics of the product (Domingos et al., 2018). The high moisture content of the milk beverage (81.7 g/100g) is related to the use of whey and milk, which present water as the main component (Turkmen et al., 2019).

In vitro tests -Determination of α -glycosidase and α -amylase inhibitory activity

Table 2 shows the α -glycosidase and α -amylase inhibitory activities of the different probiotic-enriched dairy matrices studied. In general, the α -glycosidase and α -amylase inhibitory activities were higher than 30% in all matrices, indicating that the products have hypoglycemic potential. Prato cheese presented the highest α -amylase (60.7%) and α -glycosidase (52.6%) inhibitory activities among the matrices. The dairy beverage had the second highest α -amylase (42.3%) and α -glycosidase (35.1%) inhibitory activities ($p < 0.05$). Finally, the Minas Frescal cheese presented the lowest inhibitory activity ($p < 0.05$).

Table 2. Inhibitory activities of α -glycosidase and α -amylase of probiotic dairy matrices

Dairy product	α -amylase (%)	α -glycosidase (%)
Minas Frescal cheese	37.9 \pm 0.3 ^c	30.0 \pm 0.4 ^c
Prato cheese	60.7 \pm 0.5 ^a	52.6 \pm 0.5 ^a
Whey Dairy beverage	42.3 \pm 0.1 ^b	35.1 \pm 0.3 ^b

* Results are expressed in mean \pm standard deviation. Numbers with different letter superscripts indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the different probiotic dairy matrices. Data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test.

The presence of bioactive peptides, particularly those with smaller chain lengths, is associated with α -glycosidase and α -amylase inhibitory activity (Ayyash et al., 2018). Peptides are produced in cheese by a combination of factors such as the presence of chymosin, endogenous proteinases in milk (mainly plasmin), and proteolytic enzymes of probiotics and lactic acid cultures, as well as the pretreatment of milk, scalding during the cheesemaking, and ripening period. Primary caseins are cleaved by chymosin and endogenous proteinases, while the secondary cleavage is catalyzed by proteinases and several peptidases of the cultures used (Uenish et al., 2012). Prato cheese has a long ripening period, resulting in a higher formation of bioactive peptides due to casein proteolysis, which is directly related to the α -glycosidase and α -amylase inhibitory activities (Cruz et al., 2009, Pessione and Cirrincione, 2016). The

thermal processing of whey-based products, such as dairy beverages, may result in partial protein denaturation with a consequent increase in bioactive peptides. These compounds can be considered functional compounds, with health benefits, modulating different biological and physiological properties (Coutinho et al., 2019). In addition, some probiotic strains may have the ability to release bioactive peptides from protein products, especially milk caseins (Pessione and Cirrincione, 2016).

The results of the *in vitro* assays indicated that Prato cheese had a higher antihyperglycemic activity, once it exhibited a higher α -glycosidase and α -amylase inhibitory activity, followed by the dairy beverage and Minas Frescal cheese. The results indicate that the cheese ripening allowed the further development of bioactive peptides related to the inhibition effects on the enzymes. The use of whey in the manufacture of dairy products, such as dairy beverages, also contributed to the effects observed. Santiago-López et al. (2018) reported an increase in the proteolytic activity during cheese ripening, with consequent increase in the number of bioactive peptides. Mushtaq et al. (2019) reported that cheeses presented high α -glycosidase and α -amylase inhibitory activities, probably due to the presence of bioactive peptides. Furthermore, Santiago-López et al. (2018) also reported that the heat treatment of milk proteins can affect the concentration and specific sequence of bioactive peptides.

Clinical study

Figure 2 shows the blood glucose levels before and after the ingestion of probiotic-enriched dairy matrices, and Table 3 shows the results of the different parameters evaluated after the ingestion of different matrices. Similar results were observed for basal glucose (before consumption, GB) (\cong 90 mg/dL) for the control, Prato cheese, and dairy beverage ($p > 0.05$), while Minas Frescal cheese exhibited higher levels (\cong 100 mg/dL) ($p < 0.05$). The consumption of Minas Frescal cheese led to a higher blood glucose level for all times evaluated (0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min) when compared to the control ($p < 0.05$). The consumption of dairy beverage resulted in a higher blood glucose level only after 15 and 30 min of ingestion ($p < 0.05$), while the consumption of Prato cheese resulted in a lower blood glucose level after 45, 60, and 90 min of ingestion ($p < 0.05$).

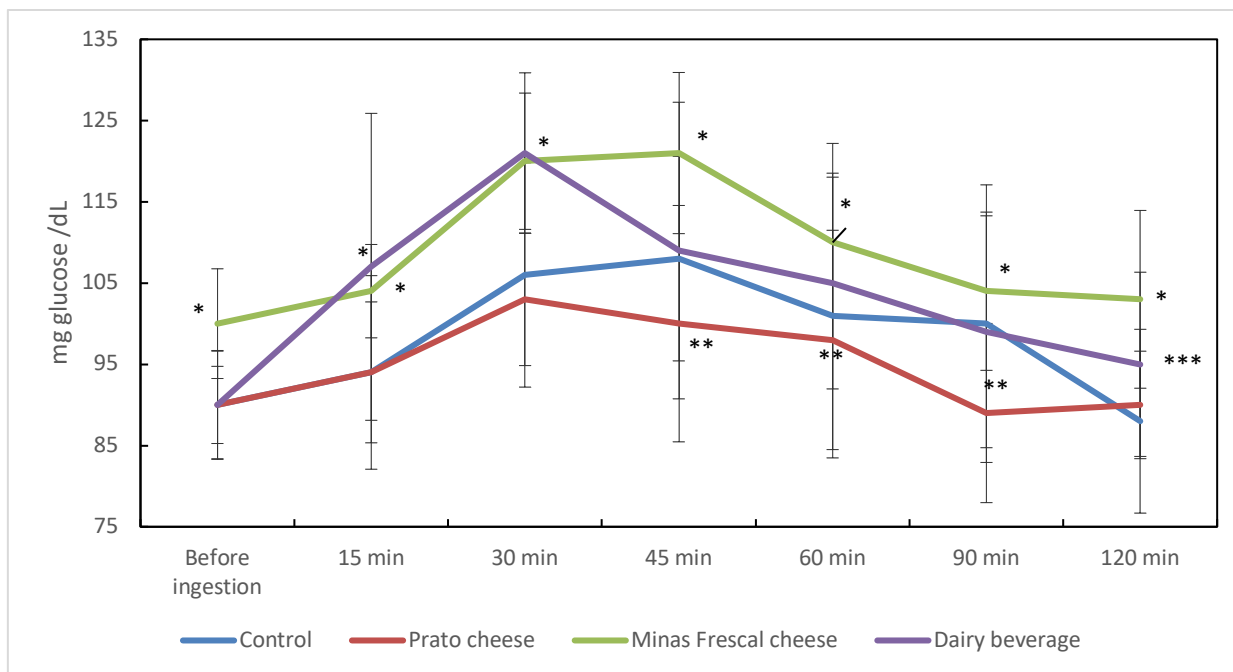


Figure 2. Blood glucose levels before and after ingestion of probiotic dairy matrices. The error bars represent the standard deviation (n = 15). Data was submitted to ANOVA and Friedman aiming to compare the results between the control and the dairy matrices. Presence of *, ** and *** means statistical difference (p < 0.05) between the Minas Frescal cheese, Prato cheese or Dairy beverage and the control.

Table 3. Effect of the consumption of probiotic dairy matrices on postprandial glycemia in healthy individuals

Dairy product	GPV	Alg	GIP	GIV	AUC	GB	HP
Minas Frescal cheese	125.3 ± 8.9 ^a	25.7 ± 13.0 ^b	26.5 ± 14.5 ^b	0.7 ± 0.4 ^b	13112 ± 708 ^a	99.7 ± 6.7 ^a	40.0 ± 10.8 ^{ab}
Prato cheese	110.8 ± 8.5 ^b	20.8 ± 10.7 ^b	23.8 ± 13.4 ^b	0.6 ± 0.3 ^b	11416 ± 981 ^c	90.0 ± 6.7 ^b	40.0 ± 12.2 ^{ab}
Dairy beverage	126.6 ± 14.4 ^a	36.6 ± 13.8 ^a	40.8 ± 15.3 ^a	1.4 ± 0.8 ^a	12518 ± 1096 ^{ab}	90.0 ± 4.7 ^b	31.0 ± 10.5 ^b
Control	118.3 ± 14.7 ^{ab}	28.4 ± 16.2 ^{ab}	32.3 ± 19.9 ^{ab}	0.7 ± 0.4 ^b	11949 ± 1010 ^{bc}	89.9 ± 6.6 ^b	51.0 ± 23.2 ^a

*Results are expressed in mean ± standard deviation. Numbers with different letter superscripts indicate a significant difference (p < 0.05) between the different probiotic dairy matrices. (n = 15). Data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's comparison test (p = 0.05). GPV = Maximum glucose value, Alg = maximum glucose increase, GIP = incremental glucose percentage, GIV = incremental glucose rate, AUC = area below the curve, GB = basal glucose, HP = peak blood glucose time.

The consumption of bread alone (control) resulted in an increase in the blood glucose levels up to 109 mg/dL within 45 minutes after ingestion (increase of 19 mg/dL), with a subsequent reduction to initial values (90 mg/dL) after 120 minutes (Figure 2). In fact, according to Gross, Ferreira, and Oliveira (2003), the blood sugar levels start to rise 10 minutes after food intake, with the maximum values at 60 minutes after ingestion, reaching the basal levels within 2 to 3 hours.

The glycemic load depends on the amount of carbohydrates, type, and composition of food, and time of food intake.

The consumption of Minas Frescal cheese resulted in similar trend to the control, with an increase in the blood glucose levels up to 120 mg/dL at 30 minutes after ingestion (increase of 20 mg/dL), with a subsequent reduction to initial values (103 mg/dL) after 120 minutes. The consumption of Minas Frescal cheese also resulted in maintenance of the other glycemic indices PGV, Alg, GIP, and GIV ($p > 0.05$, Table 3), with an increase in AUC and BG ($p < 0.05$), as previously reported. Thus, the results indicate no changes in the glycemic indices of healthy individuals after consumption of Minas Frescal cheese + bread, when compared to the consumption of bread alone.

The consumption of dairy beverage resulted in an accelerated increase in the glycemic levels (30 mg/dL in 30 minutes) when compared to that observed after the consumption of bread alone (control) and both cheeses (19-20 mg/dL, $p < 0.05$, Figure 2). Thus, there was an increase in GIV and a decrease in HP ($p < 0.05$, Table 3). The consumption of dairy beverage led to an increase in glucose incremental velocity (GIV), mainly due to the presence of sucrose in its composition (50 g/L), with a consequent decrease in the hyperglycemic peak. After reaching the hyperglycemic peak, there was a decrease in the levels observed, with final values of 95 mg/dL, slightly higher than the initial values (90 mg/dL, Figure 2). It is worth emphasizing that the dairy beverage, despite containing a great amount of sugars (50 g/L), exhibited a similar effect on lowering the blood glucose levels when compared to the consumption of bread alone, suggesting that this dairy matrix has the ability to control blood glucose. These results corroborate those observed for α -glycosidase and α -amylase inhibitory activity *in vitro* (Table 2). Kung et al. (2018) reported that whey protein is an insulinemic agent, with a positive effect on the reduction of glycemia when compared to casein. Pessione and Cirrincione (2016) reported that the proteolytic activity of probiotic cultures on whey proteins may result in the appearance of peptides that enhance glucose absorption, thus controlling hyperglycemia.

The consumption of Prato cheese led to an increase in the blood glucose levels up to 103 mg/dL in 30 minutes (increase of 13 mg/dL), with a subsequent reduction to initial values (90 mg/dL) after 120 minutes (Figure 2). In addition, it resulted in the maintenance of all glycemic indices (GPV, Alg, GIP, GIV, and

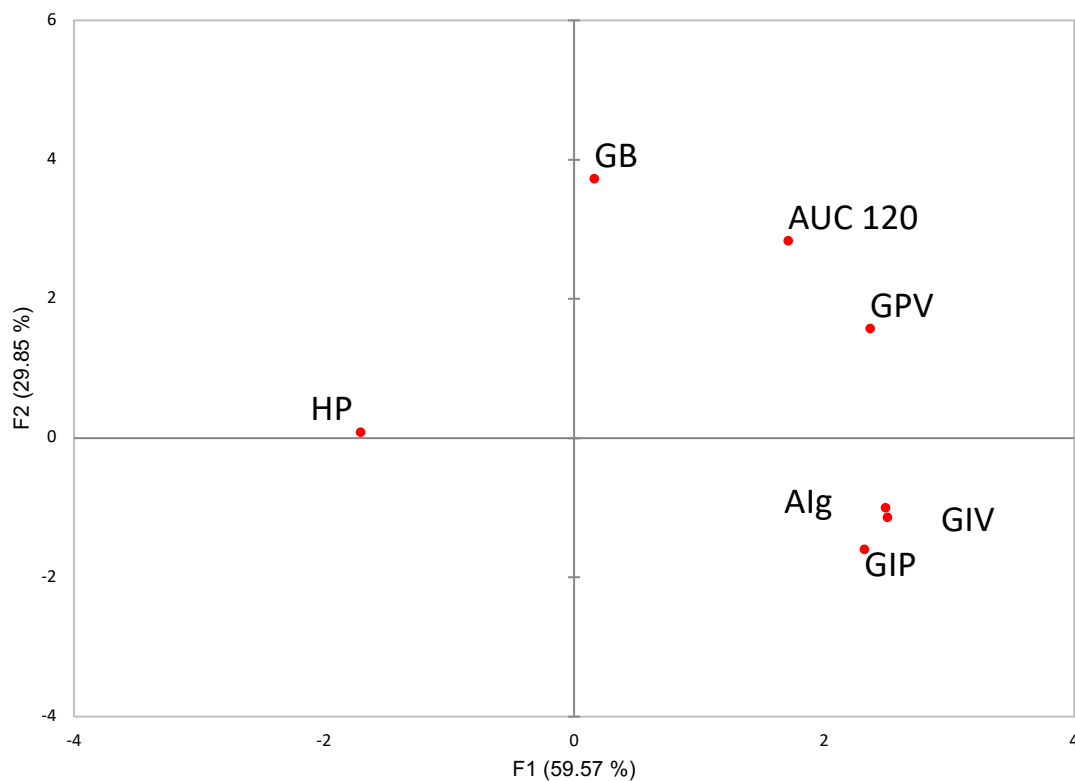
AUC) similar to the control group ($p > 0.05$). Therefore, the consumption of Prato cheese resulted in a lower increase in glycemia (13 mg/dL) when compared to the consumption of bread alone (19 mg/dL), demonstrating the role of this dairy product in the reduction of the postprandial blood glucose levels. These results corroborate those observed for α -glycosidase and α -amylase inhibitory activity *in vitro* (Table 2) and may be due to the presence of a greater number of bioactive peptides, as well as the chemical composition of this product. Kung et al. (2018) reported that products with higher protein contents have the ability to attenuate the increase in blood glucose within 15-90 minutes after the food intake. Geurts et al. (2012) observed that the ripening time of the cheeses under study (0, 15, or 35 days) had a significant influence on the physiological characteristics of obese and type 2 diabetic mice. Cheeses with 35 days ripening significantly improved glucose regulation, without affecting body weight, food intake, and fat mass. The authors reported that the production of metabolites by lactic or probiotic cultures and the proteolysis events are related to the ripening time, which may have contributed to improve the host metabolism. Similar results were found in the present study after consumption of Prato cheeses by health individuals, a ripened Brazilian cheese (60 days).

The probiotic addition to the dairy matrices may have contributed to the findings of the present study. Probiotic cultures are able to modify the gut microbiota, which stimulates the glucose absorption by the production of insulinotropic polypeptides and glucagon-like peptides (Nikbakht et al., 2018). Furthermore, the probiotic cultures presented in intestinal epithelium can use glucose and reduce the intestinal glucose absorption, as well as inhibit the production of proinflammatory cytokines that are responsible for pancreatic cell destruction and reduced insulin production (Nikbakht et al., 2018). Although all probiotic dairy matrices exhibited similar probiotic counts (7-8 log CFU/g), the health effect is dependent on the dairy matrix and the probiotic survival through the gastrointestinal tract.

Figure 3 shows the PCA of data from the human assays. The principal component 1 (CP1) explained 59.57% of the variance of the original variables, while component 2 (CP2) explained 29.85%, totaling 89.42% of explanation. Minas Frescal cheese was strongly associated with high glucose values at time zero (BG), area under the curve (AUC), and peak value of glucose (GPV). The

dairy beverage was correlated with absolute increase of glucose (Alg), glucose incremental velocity (GIV), and glucose incremental percentage (GIP). The control and Prato cheese were associated with the hyperglycemic peak.

In PCA, the confidence ellipses allowed better observation of data on the map. Well-separated ellipses indicate complete discrimination of samples, while the samples that strongly overlap are associated with products that cannot be discriminated (Pereira et al., 2019). In this study, the ellipses of control, Prato cheese, and dairy beverage were overlapping, indicating that the consumption of these dairy matrices has an effect on blood glucose similar to the consumption of bread alone, with a different effect when consuming Minas Frescal cheese.



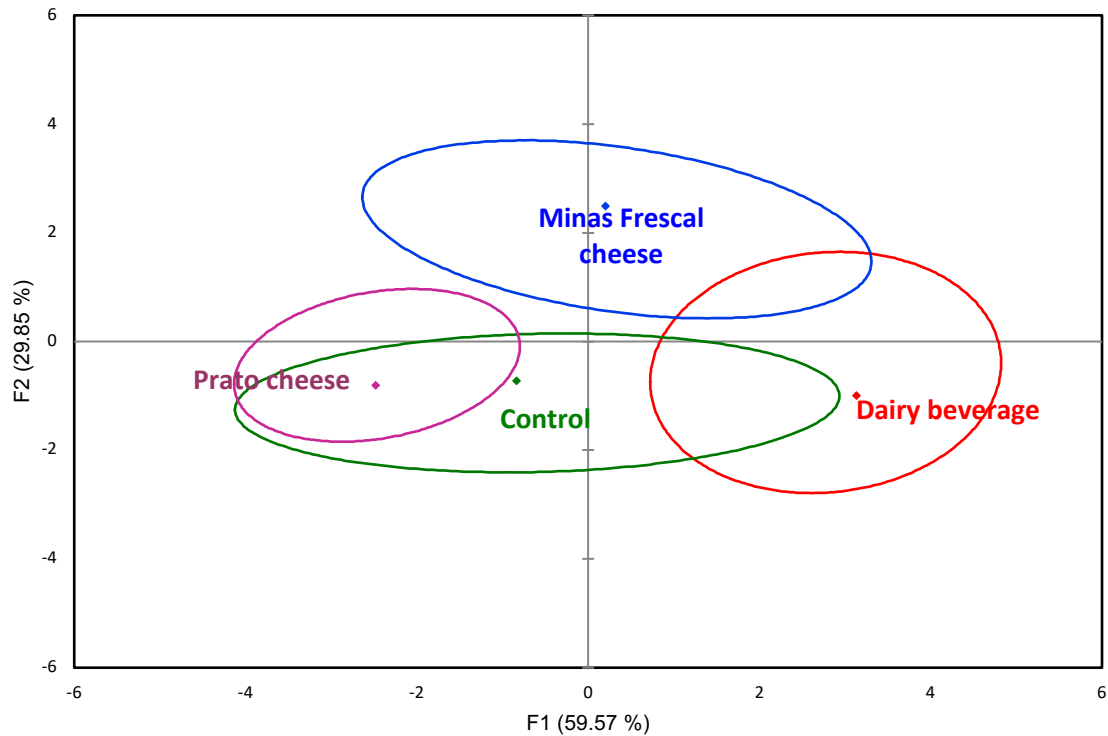


Figure 3. Representation of the samples and attributes in the first and second dimensions of the principal component analysis (PCA) in the correlation matrix of the mean scores of the analytical attributes of the postprandial glycemia reduction analysis of three probiotic and control dairy matrices. GB = Glucose at time zero, HP = hyperglycemic peak, GPV = maximum glucose value, Alg = maximum glucose increase, GIP = incremental glucose percentage, GIV = incremental glucose rate and AUC 120 = area below of the curve.

This study has some limitations. The menstrual cycle of the women was not controlled, and the human tests were conducted with healthy individuals, not considering the impact of the gender on the glycemic indexes. The glucose metabolism is affected by the menstrual cycle phase, as the glucose rates of appearance and disappearance may be lower during the luteal phase (high progesterone-to-estrogen ratio) when compared to the follicular phase (high estrogen-to-progesterone ratio) (Varlamov et al., 2015). Furthermore, glucose effectiveness and glucose appearance rates are generally higher in women (Varlamov et al., 2015).

4. CONCLUSION

Prato cheese was the dairy matrix with the best results, presenting a better nutritional composition (higher fat and protein contents) and higher antihyperglycemic activity *in vitro* (higher α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity) and in human assays (lower increase in postprandial glycemia and maintenance of the other glycemic indexes (PGV, Alg, GIP, GIV, AUC, BG, HP) in healthy subjects. An adequate correlation was observed between the *in vitro* and human studies, as the products with higher α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities (*in vitro*) resulted in a lower postprandial glycemia in the human study. This study is the first to evaluate the effect of different dairy matrices on the antihyperglycemic activity, with very important findings, showing that the type of dairy matrix plays an important role in the observation of the effects, and the use of ripened cheese and/or whey dairy beverage as a dairy matrix is recommended.

5. REFERENCES

- Adisakwattana, S., T. Ruengsamran, P. Kampa, and W. Sompong, W. 2012. In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *BMC Complement. Altern. Med.* 12:110.
- Ayyash, M., A. K. Al-Nuaimi, S. Al-Mahadin, and S. Q. Liu. 2018. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chem.* 239:588-597.
- AOAC International. 2004. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC International, Washington, DC.
- Balthazar, C. F., A. Santillo, L. Figliola, H. L. Silva, E. A. Esmerino, M. Q. Freitas, A. G. Cruz, and M. Albenzio. 2018. Sensory evaluation of a novel prebiotic sheep milk strawberry beverage. *LWT-Food Sci and Technol.* 98:94-98.
- Brown, L., S. P. Caligiuri, D. Brown, and G. N. Pierce. 2018. Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *J. Funct. Foods* 45:233-238.
- Coutinho, N. M., M. R. Silveira, L. M. Fernandes, J. Moraes, T. C. Pimentel, M. Q. Freitas, M. C. Silva, R. S. L. Raices, C. S. Ranadheera, F. O. Borges, R. P. C. Neto, M. I. B. Tavares, F. A. N. Fernandes, T. V. Fonteneles, F. Nazzaro, S. Rodrigues, and A. G. Cruz. 2019. Processing chocolate milk drink by low-pressure cold plasma technology. *Food Chem.* 278: 276-283.

- Corrêa, F. H., V. G. Nogueira, M. D. F. Bevilacqua, and M. D. B. Gomes. 2007. Insulin resistance and secretion assessment across a range of glucose tolerance from normal individuals through diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 51:1498-1505.
- Cruz, A. G., F. C. A. Burity, C. H. B. de Souza, J. A. F. Faria, and S. M. I. Saad. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci Technol.* 20:344-354.
- Domingos, L. D., H. A. L. de Souza, L. R. B. Mariutti, M. T. Benassi, N. Bragagnolo, and W. H. Viotto. 2019. Fat reduction and whey protein concentrate addition alter the concentration of volatile compounds during Prato cheese ripening. *Food Res. Int.* 119: 793-804.
- Gomand, F., F. Borges, J. Burgain, J. Guerin, J., A. M. Revol-Junelles, and C. Gaiani. 2019. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10.
- Gross, J. L., Ferreira, S. R., & Oliveira, J. E. D. (2003). Glicemia pós-prandial. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 47:728-738.
- Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R. B. Canani, H. J. Flint, S. Salminen, P. C. Calder, and M. E. Sanders. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11:506-514.
- Janiaski, D. R., T. C. Pimentel, A. G. Cruz, and S. H. Prudencio. 2016. Strawberry-flavored yogurts and whey beverages: What is the sensory profile of the ideal product?. *J. Dairy Sci.* 99:5273-5283.
- Koutnikova, H., B. Genser, M. Monteiro-Sepulveda, J. M. Faurie, S. Rizkalla, J. Schrezenmeir, and K. Clément. 2019. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 9:e017995.
- Kung, B., G. H. Anderson, S. Paré, A. J. Tucker, S. Vien, A. J. Wright, and H. D. Goff. 2018. Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake. *J. Dairy Sci.* 101:8688-8701.
- Lavelli, V., P. S. Harsha, P. Ferranti, A. Scarafoni, and S. Iametti, S. 2016. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian α -glucosidase and α -amylase—effect of food matrix and processing on efficacy. *Food & Function* 7(3):1655-1663.
- Law, M., P. S. P. Huot, Y. T. Lee, S. Vien, B. L. Luhovyy, and G. H. Anderson. 2017a. The effect of dairy and non-dairy beverages consumed with high glycemic cereal on subjective appetite, food intake and postprandial glycemia in young adults. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 42:1201–1209.
- Law, M., Y. T. Lee, B. L. T. Luhovyy, and G. H. Anderson. 2017b. The effect of dairy products consumed with high glycemic carbohydrate on subjective appetite, food intake and post-prandial glycemia in older adults. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 42:1210–1216.
- Liu, C. T., F. J. Chu, C. C. Chou, and R. C. Yu. 2011. Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 721:157-162.

Matera, J., A. S. Luna, D. B. Batista, T. C. Pimentel, J. Moraes, B. A. Kamimura, M.V.S. Ferreira, H. L. A. Silva, S. P. Mathias, E. A. Esmerino, M. Q. Freitas, R. S. L. Raices, S. L. Quitério, A. S. Sant'Ana, M. C. Silva, and A. G. Cruz. 2018. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Res. Int.* 108:18-26.

Pessione, E., and S. Cirrincione. 2016. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. *Front Microbiol.* 7:876.

Pereira, G. S., A. R. Honorio, B. R. Gasparetto, C. M. Lopes, D. C. D. Lima, and A. A. Tribst. 2019. Influence of information received by the consumer on the sensory perception of processed orange juice. *J. Sens. Stud.* 12497.

Silva, H. L. A., C. F. Balthazar, R. S. Rocha, J. Moraes, E. A. Esmerino, M. C. Silva, R. S. L. Raices, T. C. Pimentel, M. Q. Freitas, and A. G. Cruz. 2018. Sodium reduction and flavor enhancers addition: is there an impact on the availability of minerals from probiotic Prato cheese?. *LWT* 93:287-292.

Sperry, M. F., H. L. A. Silva, C. F. Balthazar, E. A. Esmerino, S. Verruck, E. S. Prudencio, R. P. C. Neto, M. I. B. Tavares, J. C. Peixoto, F. Nazzaro, R. S. Rocha, J. Moraes, A. S. G. Gomes, R. S. L. Raices, M. C. Silva, D. Granato, T. C. Pimentel, M. Q. Freitas, and A. G. Cruz. 2018. Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women—A randomized double-blind pilot trial. *J. Funct. Foods* 45:435-443.

Turkmen, N., C. Akal, and B. Özer. 2019. Probiotic dairy-based beverages: A review. *J. Funct. Foods* 53:62-75.

Uenishi, H., T. Kabuki, Y. Seto, A. Serizawa, and H. Nakajima. 2012. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *Int. Dairy J.* 22:24-30.

Vasconcelos, F. M., H. L. A. Silva, S. M. Poso, M. V. Barroso, M. Lanzetti, R. S. Rocha, J. S. Graça, E. A. Esmerino, M. Q. Freitas, M. C. Silva, R. S. L. Raices, D. Granato, T. C. Pimentel, A. S. Sant'Ana, A. G. Cruz, and S. S. Valença. 2019. Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. *Food Res. Int.* 123:697-703.

Vidal, L., S. R. Jaeger, L. Antúnez, A. Giménez, and G. Ares. 2016. Product spaces derived from projective mapping and CATA questions: Influence of replicated assessments and increased number of study participants. *J. Sens. Stud* 31:373-381.

CAPÍTULO 4 – RESUMO SLACA

Postprandial glycemia in healthy subjects: Is there an adequate probiotic dairy matrix ?

This study aimed to evaluate the effect of different probiotic dairy matrices (Minas Frescal cheese, Prato cheese, and whey dairy beverage) containing the probiotic culture *L. casei* 7-8 log CFU/g) on the antihyperglycemic activity *in vitro* determined by α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities, and *in vivo* through postprandial glycemia of healthy individuals (n = 15, consumption of bread as a control; bread + Minas Frescal cheese; bread + Prato cheese; bread + dairy beverage). Prato cheese presented increased values α -amylase and α -glucosidase inhibitory values (60.7% and 52.6%) among the dairy matrices evaluated. The consumption of Prato cheese resulted in a lower increase in glycemia (13 mg/dL) when compared to the consumption of bread alone, Minas Frescal cheese and whey dairy beverage (13 against 19,20, 30 mg/dL, respectively, $p < 0.05$) and simultaneous decreased values of glycemic indices (peak values of glucose, absolute increase of glucose, glucose incremental percentage, glucose incremental velocity, area under the curve, basal glucose and hyperglycemic peak; GPV, Alg, GIP, GIV, AUC, GB, HP, respectively). Our findings suggested a good correlation between the *in vitro* and *in vivo* studies, indicating there is an effect of dairy food matrix in postprandial glycemia. Therefore, it is concluded that the consumption of probiotic Prato cheese can contribute to the reduction of the postprandial glycemic rate in healthy individuals.

Key Words: postprandial glycemia, probiotics, dairy products.