

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAMILLA RIBEIRO VIEIRA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FUNCIONAIS À BASE DE FARINHA DE
ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) E REALIZAÇÃO DE ENSAIOS
CLÍNICOS**

Alfenas/MG

2019

CAMILLA RIBEIRO VIEIRA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FUNCIONAIS À BASE DE FARINHA DE
ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) E REALIZAÇÃO DE ENSAIOS
CLÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Nível Doutorado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientadora: Profa. Dra. Roberta Ribeiro Silva Barra

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Marques, Camilla Ribeiro Vieira
M357d Desenvolvimento de produtos funcionais à base de farinha de ora-pro-
nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) e realização de ensaios clínicos --
Afenas/MG, 2019.
89 f. : il. --

Orientadora: Roberta Ribeiro Silva Barra.
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade
Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Plantas Comestíveis. 2. Alimento Funcional. 3. Obesidade. I. Barra,
Roberta Ribeiro Silva. II. Título.

CDD-613.6

CAMILLA RIBEIRO VIEIRA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FUNCIONAIS À BASE DE FARINHA DE
ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) E REALIZAÇÃO DE ENSAIOS
CLÍNICOS**

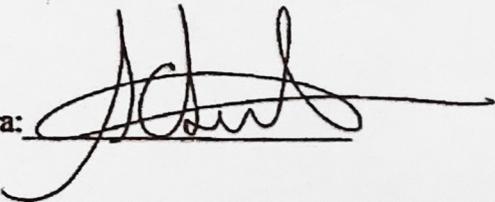
A Banca Examinadora abaixo-assinado aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 22/11/2019

Profa. Dra. Roberta Ribeiro Silva Barra
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Assinatura: 

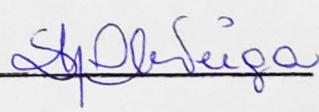
Profa. Dra. Simone Cardoso Lisboa Pereira
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Assinatura: 

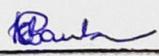
Profa. Dra. Sandra Bragança Coelho
Universidade Federal de Lavras – UFLA

Assinatura: 

Profa. Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Assinatura: 

Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Assinatura: 

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Gilson e Marta, aos meus avós Terezinha, Aurora, Hermenegildo, e João, a minha irmã Lívia, ao meu afilhado Francisco, e ao meu marido Júlio César.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força para continuar e não desistir nos momentos difíceis;

Aos meus pais por todo apoio, pela confiança e amor incondicional;

À minha irmã e ao meu afilhado pelo carinho;

Ao meu marido, Júlio César, pelo incentivo, por estar do meu lado nos momentos de dificuldade e sempre me escutar;

Ao meu padrinho Israel por ter me apresentado à planta ora-pro-nobis;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Roberta Ribeiro Silva Barra, pela confiança, suporte, orientações e ensinamentos adquiridos ao longo do mestrado e doutorado;

Aos professores colaboradores, Hércia Stampini Duarte Martino, Luciana Azevedo, Sandra Maria de Oliveira Morais Veiga, Denismar Alves Nogueira, Dionéia Evangelista César, Jorge Kleber Chavasco (*in memoriam*) pela parceria, orientações e ensinamentos adquiridos;

Aos professores da Pós-graduação em Nutrição Clínica Funcional por despertarem meu amor e interesse pelas plantas alimentícias não convencionais;

À Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho por toda ajuda com as análises microbiológicas;

Às secretárias Neide Ribeiro e Adriana Aparecida Pereira por serem sempre tão prestativas e atenciosas comigo;

Ao corpo docente e ao corpo administrativo da Universidade Federal de Alfenas, em especial à equipe do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde – PPGb e à Faculdade de Nutrição;

À Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Juiz de Fora pela parceria no desenvolvimento deste trabalho;

À Cíntia Novais, pela amizade e auxílio no desenvolvimento das bebidas;

Aos alunos da Iniciação Científica pela ajuda, dedicação e parceria;

Aos voluntários da pesquisa, pois sem eles este trabalho não existiria;

A todos meus amigos que estiveram do meu lado e torceram por este momento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento de produtos à base de farinha de ora-pro-nobis, investigar a influência da farinha de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) sobre a adesão de probióticos em células Caco-2 e avaliar o efeito de produtos à base dessa farinha sobre os sintomas gastrintestinais e parâmetros antropométricos em adultos com excesso de peso. **Métodos:** A primeira etapa do estudo foi o desenvolvimento de produtos funcionais à base de farinha de ora-pro-nobis, a realização da composição centesimal e análise de fenólicos totais deles e também da folha e farinha de ora-pro-nobis. A segunda etapa contou com a contagem de probióticos *in vitro*, a qual foi analisada pelo teste de adesão em células Caco-2. E a terceira etapa foi a realização de dois ensaios clínicos. O primeiro consistiu em um ensaio *crossover*, com homens, em um período de 14 semanas: período basal, primeira intervenção (6 semanas), pausa temporal (2 semanas) e segunda intervenção (6 semanas). Na primeira intervenção, os voluntários consumiram uma porção do biscoito teste, e na segunda intervenção uma porção do biscoito controle. A diferença entre os biscoitos foi à presença de farinha de ora-pro-nobis no teste. O segundo ensaio foi duplo-cego, com mulheres e duração de seis semanas. O grupo teste recebeu uma bebida com ora-pro-nobis e o grupo controle recebeu uma bebida com os mesmos ingredientes e quantidades, porém sem adição de ora-pro-nobis. Nos ensaios foram analisados os parâmetros antropométricos, a consistência e cor das fezes e os sintomas gastrointestinais. Especificamente nos homens avaliou-se também a glicemia e o perfil lipídico, e nas mulheres foi analisada a microbiota fecal pelo método *Fluorescence In Situ Hybridisation* (FISH). **Resultados:** *Pereskia aculeata* manteve a alta adesão de *L. casei* a células Caco-2 *in vitro*. No ensaio *crossover*, o biscoito com ora-pro-nobis melhorou os sintomas gastrointestinais dos homens. Já no segundo ensaio, a bebida com ora-pro-nobis auxiliou na perda de peso, redução da circunferência da cintura e redução da gordura corporal, também proporcionou melhora de alguns sintomas gastrointestinais. Na microbiota fecal não houve diferença significativa em ambos os grupos das voluntárias. Porém no grupo teste houve uma tendência à redução no número de procariotos totais e do *Clostridium histolyticum*, enquanto que ocorreu um aumento dos *Lactobacillus*. **Conclusão:** A farinha de ora-pro-nobis manteve a aderência de *L. casei* às células Caco-2 e não alterou os parâmetros antropométricos e bioquímicos dos homens. Nas mulheres a bebida com ora-pro-nobis promoveu perda de peso, e redução da gordura corporal

O consumo de farinha de ora-pro-nobis resultou em melhorias na saúde intestinal em ambos os ensaios.

Palavras-chaves: Plantas comestíveis. Alimento funcional. Obesidade.

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to develop the of ora-pro-nobis flour products, investigate the influence of ora-pro-nobis flour (*Pereskia aculeata* Mill.) on the adhesion of probiotics in Caco-2 cells and to evaluate the effect of flour products on gastrointestinal symptoms and parameters. anthropometric measurements in adults. **Methods:** The first stage of the study was the development of functional products based on ora-pro-nobis flour, the performance of proximate composition and analysis of their total phenolics and also of the ora-pro-nobis flour and flour. The second step was the in vitro probiotic count, which was analyzed by the Caco-2 cell adhesion test. And the third step was the realization of two clinical trials. In the first intervention, the volunteers consumed a portion of the test cookie, and in the second intervention a portion of the control cookie. The difference between the cookies was the presence of ora-pro-nobis flour in the test. The second trial was double-blind, with women and lasting six weeks. The test group received a drink with ora-pro-nobis and the control group received a drink with the same ingredients and amounts, but without the addition of ora-pro-nobis. In the trials, anthropometric parameters, stool consistency and color, and gastrointestinal symptoms were analyzed. Specifically in men, blood glucose and lipid profile were also evaluated, and in women, fecal microbiota was analyzed by the Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) method. **Results:** *Pereskia aculeata* maintained the high adhesion of *L. casei* to Caco-2 cells in vitro. In the *crossover* trial, the ora-pro-nobis cookie improved men's gastrointestinal symptoms. In the second trial, the drink with ora-pro-nobis aided in weight loss, waist circumference reduction and body fat reduction, also improved some gastrointestinal symptoms. In fecal microbiota there was no significant difference in both groups of volunteers. However, in the test group there was a tendency to decrease in the number of total prokaryotes and *C. histolyticum*, while there was an increase of *Lactobacillus*. **Conclusion:** The ora-pro-nobis flour maintained *L. casei* adherence to Caco-2 cells and did not alter the anthropometric and biochemical parameters of men. In women drinking ora-pro-nobis promoted weight loss and reduced body fat. The consumption of ora-pro-nobis flour improved intestinal health in both trials.

Keywords: Plants edible. Functional food. Obesity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos biscoitos teste e controle	34
Tabela 2 - Adesão de <i>L. casei</i> às células Caco-2 na presença de ora-pro-nobis (<i>Pereskia aculeata</i>).	35
Tabela 3 - Características basais dos voluntários que ingeriram os biscoitos.....	36
Tabela 4 - Efeito do consumo dos biscoitos nos sintomas gastrointestinais	37
Tabela 5 - Efeito do consumo dos biscoitos nos dados antropométricos e bioquímicos.....	38
Tabela 6 - Consumo de macronutrientes na dieta dos voluntários antes e após a intervenção.....	39
Tabela 7 - Formulação das bebidas controle e teste utilizadas no ensaio clínico.....	47
Tabela 8 - Composição química dos pós para o preparo das bebidas controle e teste utilizadas no ensaio clínico.	53
Tabela 9 - Características basais das voluntárias que ingeriram a bebida controle e teste.....	56
Tabela 10 - Densidade de bactérias (10^6 cel./g) no <i>baseline</i> e após a intervenção	57
Tabela 11 - Análise da cor das fezes, antes e após a intervenção com as bebidas.....	57
Tabela 12 - Análise das formas das fezes antes e após a intervenção com as bebidas....	58
Tabela 13 - Análise dos sintomas gastrointestinais antes e após a intervenção com as bebidas.	59
Tabela 14 - Análise dos parâmetros antropométricos antes e após a intervenção com as bebidas.....	60
Tabela 15 - Análise dos macronutrientes e fibras antes e após a intervenção com as bebidas.	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Delineamento do ensaio clínico *crossover* para avaliar o efeito do biscoito com farinha de ora pro-nobis nos sintomas gastrointestinais, variáveis antropométricas e bioquímicas em homens adultos.....30
- Figura 2 - Imagens de biofilmes formados *in vitro* por *L. casei* em monocamada de Caco-2, obtidas do microscópio de força atômica (AFM, Park nx10).35
- Figura 3 - Fluxograma dos voluntários do ensaio clínico *crossover* para comparar o efeito do biscoito teste (farinha de ora-pro-nobis) com biscoito controle36
- Figura 4 - Delineamento experimental do estudo randomizado duplo-cego para avaliar o efeito da bebida com farinha de ora-pro-nobis na microbiota fecal, sintomas gastrointestinais e variáveis antropométricas de mulheres adultas50
- Figura 5 - Média \pm desvio padrão dos compostos fenólicos (mg EAG/ 100 g) e capacidade antioxidante (% SRL) da farinha de ora-pro-nobis e das bebidas teste e controle.54
- Figura 6 - Fluxograma do estudo randomizado duplo-cego para avaliar o efeito da bebida com farinha de ora-pro-nobis na microbiota fecal, sintomas gastrointestinais e variáveis antropométricas em mulheres adultas.55

LISTA DE ABREVIATURAS

AIC	Akaike
CAL	Calorias
CB	Circunferência do braço
CC	Circunferência da cintura
CHO	Carboidrato
CQ	Circunferência do quadril
CT	Colesterol total
DRI's	<i>Dietary Reference Intakes</i>
DP	Desvio padrão
DM	Diferença das médias
EP	Erro-padrão
EAG	Equivalente de ácido gálico
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridisation</i>
GC	Gordura corporal
GSRS	<i>Gastrointestinal Symptom Rating Scale</i>
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LIP	Lipídeos
IC	Intervalo de confiança
MG	Massa gorda
MM	Massa magra
OPN	Ora-pro-nobis
PANC	Planta alimentícia não convencional
PTN	Proteína
RCEst	Relação cintura/estatura
SRL	Sequestro de radicais livres
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS	15
2.2	ORA-PRO-NOBIS (<i>Pereskia aculeata</i> Mill.)	15
2.3	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA ORA-PRO-NOBIS	16
2.4	INGREDIENTES FUNCIONAIS	17
3	JUSTIFICATIVA	19
4	OBJETIVOS	20
4.1	OBJETIVO GERAL	20
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5	CAPÍTULO I - EFEITO DA <i>PERESKIA ACULEATA</i> MILL. IN VITRO E EM HUMANOS COM EXCESSO DE PESO: UM ESTUDO RANDOMIZADO <i>CROSSOVER</i>	21
5.1	INTRODUÇÃO	23
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.2.1	Produtos desenvolvidos para o teste <i>in vitro</i> e o ensaio clínico <i>crossover</i>	24
5.2.1.1	<i>Testes pilotos dos produtos desenvolvidos com farinha de ora-pro-nobis</i>	24
5.2.1.2	<i>Escolha do produto a ser utilizado no teste de adesão e ensaio clínico crossover</i>	25
5.2.1.3	<i>Análise da composição química e do teor de fenólicos dos biscoitos</i>	25
5.2.2	Análise do teste de adesão – <i>in vitro</i>	26
5.2.2.1	<i>Preparação dos extratos</i>	26
5.2.2.2	<i>Digestão <i>in vitro</i></i>	27
5.2.2.3	<i>Teste de adesão</i>	27
5.2.2.4	<i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	28
5.2.3	Ensaio clínico <i>crossover</i>	28
5.2.3.1	<i>Aspectos éticos</i>	29
5.2.3.2	<i>Participantes</i>	29
5.2.3.3	<i>Delineamento do estudo</i>	29
5.2.3.4	<i>Caracterização das fezes</i>	30
5.2.3.4.1	<i>Coleta de amostra</i>	31

5.2.3.4.2	Consistência.....	31
5.2.3.4.3	Cor	31
5.2.3.4.4	Questionário <i>Gastrointestinal Symptom Rating Scale</i> (GSRS).....	31
5.2.3.5	<i>Avaliação antropométrica</i>	31
5.2.3.6	<i>Avaliação bioquímica</i>	32
5.2.3.7	Análise do consumo alimentar	32
5.2.4	Análise estatística	33
5.3	RESULTADOS	33
5.3.1	Composição química dos biscoitos	33
5.3.2	Teste de adesão – <i>in vitro</i>	34
5.3.3	Ensaio clínico <i>crossover</i>	35
5.3.2.1	<i>Questionário Gastrointestinal Symptom Rating Scale</i>	37
5.3.2.2	<i>Parâmetros antropométricos e bioquímicos</i>	38
5.3.2.3	<i>Análise do consumo alimentar</i>	39
5.4	DISCUSSÃO	39
5.5	CONCLUSÃO.....	42
6	CAPÍTULO II - BEBIDA À BASE DE FARINHA DE ORA-PRO-NOBIS MELHORA SAÚDE INTESTINAL, PESO E COMPOSIÇÃO CORPORAL: ESTUDO PROSPECTIVO RANDOMIZADO DUPLO- CEGO.....	43
6.1	INTRODUÇÃO.....	45
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
6.2.1	Aspectos éticos do ensaio clínico duplo-cego	46
6.2.2	Desenvolvimento das bebidas controle e teste	46
6.2.3	Composição química das bebidas controle e teste	47
6.2.3.1	<i>Determinação da concentração de fenólicos totais das bebidas</i>	48
6.2.3.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante das bebidas</i>	48
6.2.4	Participantes	48
6.2.5	Desenho experimental	49
6.2.6	Randomização	50
6.2.7	Conformidade	50
6.2.8	Análise da microbiota fecal	51
6.2.9	Caracterização das fezes	51
6.2.10	Avaliação antropométrica	52

6.2.11	Análise do consumo alimentar	52
6.2.12	Análise estatística	52
6.3	RESULTADOS	52
6.3.1	Composição química das bebidas	52
6.3.2	Características das voluntárias	54
6.3.3	Microbiota fecal	56
6.3.4	Características das fezes das voluntárias	57
6.3.5	Questionário <i>Gastrointestinal Symptom Rating Scale</i> (GSRs)	58
6.3.6	Análise dos parâmetros antropométricos	60
6.3.7	Análise do consumo alimentar	60
6.4	DISCUSSÃO	61
6.5	CONCLUSÃO	65
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICES	76
	ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

As plantas alimentícias não convencionais (PANC's) são espécies comestíveis, mas que não fazem parte da cadeia produtiva e da alimentação habitual atual. Nos últimos tempos essas plantas têm despertado o interesse da comunidade científica, pois elas representam um grande potencial econômico e de consumo, podendo promover diversos efeitos benéficos à saúde.

Entre essas PANC's, a ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) merece atenção, pois é uma planta brasileira, riquíssima em proteínas, vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos. Apresenta um fácil cultivo, e é encontrada no Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo que o Estado de Minas Gerais apresenta um dos principais cultivos. Logo, essa planta desperta interesse de estudo, pois envolve questões de agroecologia, sustentabilidade e resgate cultural. Os estudos *in vitro* e com animais sugerem que ela tem potencial para exercer diversos benefícios à saúde, e atuar como um ingrediente funcional, mas estudos com humanos precisam ser conduzidos para avaliar estes possíveis efeitos.

Atualmente, com o aumento das doenças crônicas não transmissíveis e com o estilo de vida da população, a indústria alimentícia e os consumidores buscam cada vez mais por produtos que auxiliem na prevenção e controle dessas doenças e proporcionam praticidade no dia a dia.

Diante disso, torna-se relevante desenvolver produtos saudáveis com farinha de ora-pro-nobis e estudar seu efeito na microbiota intestinal, parâmetros antropométricos e bioquímicos em adultos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Este capítulo apresenta o referencial teórico de embasamento para a interpretação dos resultados obtidos.

2.1 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS

As plantas alimentícias não convencionais (PANC's) são espécies comestíveis que não fazem parte da cadeia produtiva e da alimentação habitual atual. São cultivadas tradicionalmente em seus centros de origem e continuam a ser mantidas por preferências socioculturais, mas permanecem inadequadamente documentadas e negligenciadas por programas de pesquisa e conservação (CAMPANARO *et al.*, 2018).

Turra *et al.*, (2007) destacam que uma enorme quantidade de espécies de PANC's brasileiras, permanece sem muitos estudos químicos ou biológicos, o que poderia representar um potencial econômico e nutricional valioso. Ainda destacou que a biodiversidade brasileira está ameaçada pela grande extinção de espécies, o que causará não apenas a perda de substâncias de valor terapêutico, como também o seu código de expressão genética.

O desconhecimento sobre a utilidade de uso das plantas associados às tendências “modernas” resultou no uso reduzido de muitas hortaliças que faziam parte do cotidiano alimentar dos moradores de zonas rurais e periferias urbanas, principalmente. Entretanto, o uso de plantas não-convencionais, é importante fonte para complementar a alimentação e a economia (SOUZA, 2009).

A maioria das PANC's é rica em nutrientes, logo pode ser útil na diversificação das dietas, e na abordagem de deficiências de micronutrientes em comunidades rurais (MABHAUDHI *et al.*, 2017). Estudos recentes têm se concentrado em estudar algumas dessas plantas e muitos já observaram que várias apresentam diversos efeitos benéficos à saúde (CANO-LAMADRID *et al.*, 2018; SCHIESS *et al.*, 2017; YANG; GRALL; CHAPMAN, 2018).

2.2 ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Mill.)

Pereskia aculeata Mill., conhecida popularmente como ora-pro-nobis, é uma PANC brasileira pertencente à família Cactaceae. É encontrada no Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul. A planta é normalmente conduzida como trepadeira, com grandes espinhos em seus ramos, folhas carnosas e com a presença de mucilagem (TOFANELLI; RESENDE, 2011; KAZAMA *et al.*, 2012).

A indústria alimentícia e farmacológica tem apresentado interesse por essa hortaliça, por causa do seu alto teor de lisina e mucilagem. Além de ser uma planta de fácil reprodução e cultivo, devido a sua rusticidade e resistência a déficit hídrico (SOUZA *et al.*, 2009).

Ora-pro-nobis é considerada uma hortaliça não convencional, cujas folhas são utilizadas para o consumo humano, em saladas, processados, cozidos, assados, bolos, sopas e sucos, devido especialmente ao seu alto conteúdo de minerais e proteínas (QUEIROZ *et al.*, 2015; PAULA *et al.*, 2016).

Segundo Rocha *et al.*, (2008), a planta também é conhecida como “carne de pobre”, por causa dos elevados teores de proteínas apresentados. Além disso, é rica em fibras solúveis e insolúveis e, ainda contém cálcio, magnésio, manganês, zinco, vitamina A, vitamina C, ácido fólico, triptofano e compostos bioativos (PINTO; SCIO, 2014).

Almeida *et al.*, (2014) relataram que apesar da presença de alguns componentes antinutricionais, como saponinas e ácido oxálico, seria necessária uma quantidade muito elevada para causar algum dano ou impacto sobre a biodisponibilidade de outros nutrientes, cerca de 1,2 Kg a 6 Kg, concluindo que esta planta é segura para o consumo diário.

2.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA ORA-PRO-NOBIS

Takeiti *et al.*, (2009) relataram que a planta *Pereskia aculeata* possui em média 39,1 g/100g de fibra alimentar total, sendo 5,2 g/100g de fibras solúveis e 33,9 g/100g de fibras insolúveis. Assim, fica evidenciado que a hortaliça pode apresentar efeitos prebióticos, já que de acordo com a legislação brasileira o alimento é considerado rico em fibras se apresentar pelo menos 6 g de fibras em 100 g de alimentos (BRASIL, 1998). A presença de fibras na dieta auxilia na modificação da microbiota intestinal, conferindo maior proteção aos colonócitos e aumento dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (CARVALHO; SAAD, 2013).

Dessa forma, a ora-pro-nobis seria importante não apenas para a microbiota intestinal, como para o organismo como um todo, pois a microbiota intestinal influencia a saúde do hospedeiro por meio de uma variedade de mecanismos, como a ativação da resposta imunitária, a síntese de bacteriocinas, competição nutricional e física com patógenos, manutenção de um ambiente ácido e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (LIU *et al.*, 2014; MONTALTO; GALLO; GASBARRINI, 2009).

As folhas de ora-pro-nobis são também utilizadas na medicina natural e prática brasileira para tratar feridas cutâneas e inflamação. Pinto *et al.*, (2015) avaliaram essa atividade anti-inflamatória das folhas em orelhas de ratos com dermatite aguda e verificaram que ocorreu uma redução do processo inflamatório, com a diminuição da interleucina 6 (IL-6) e TNF- α . Reforçaram que as atividades anti-inflamatórias da ora-pro-nobis são altamente promissoras.

Estudos *in vitro* têm mostrado que essas plantas da família Cactaceae apresentam elevada capacidade antioxidante, sendo superior à de alguns antioxidantes sintéticos e naturais, como hidroxitolueno de butila (BHT) e ácido ascórbico, respectivamente (HASSANBAGLOU *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2010; WAHAB *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante da planta está diretamente relacionada com a presença dos compostos bioativos que a mesma apresenta (SOUZA, 2014). Agostini-Costa *et al.*, (2012) verificaram a presença de catequinas, α -caroteno, β -caroteno, α -criptoxantina e β -criptoxantina. Salt, Tocker e Adler (1987) ainda verificaram a presença de esteroides, principalmente do sitosterol.

2.4 INGREDIENTES FUNCIONAIS

Os ingredientes funcionais são definidos como alimentos que recebem uma função adicional, geralmente relacionada à promoção da saúde ou prevenção de doenças (DEVARAJAN; MOHANMARUGARAJA, 2017). Devem permanecer como alimentos e demonstrar seus efeitos como parte do padrão alimentar normal, não sendo um comprimido ou cápsula (ROBERFROID, 2007).

A funcionalidade dos funcionais baseia-se nos compostos bioativos contidos naturalmente no produto, porém geralmente requer a adição de um ingrediente específico para aperfeiçoar as propriedades benéficas. Incluídos na categoria de alimentos funcionais estão: (a) alimentos comuns com substâncias bioativas de ocorrência natural, por exemplo, fibra

dietética; (b) alimentos suplementados com substâncias bioativas, por exemplo, probióticos; (c) ingredientes alimentares introduzidos a alimentos convencionais, por exemplo, prebióticos (SYNGAI *et al.*, 2016).

Atualmente, ocorre uma crescente busca por estes alimentos que proporcionem praticidade e que ofereçam algum benefício à saúde. Diante disso, a indústria, cada vez mais consciente desse potencial brasileiro, está se beneficiando da tecnologia para investir num mercado crescentemente em expansão, o dos alimentos funcionais (GARCIA; BECKER; DAMIANI, 2015).

A demanda dos consumidores por estes produtos tem sido em parte devido a mudanças socioeconômicas, como a expectativa de vida mais longa, o aumento das doenças crônicas não transmissíveis, os custos com cuidados de saúde e o desejo de uma qualidade de vida melhor (BIMBO *et al.*, 2017).

Dessa forma, é relevante desenvolver pesquisas e estudar o efeito de novos produtos, que seja saudável, acessível à comunidade e contenham ingredientes funcionais. Assim, o desenvolvimento e a aplicação clínica de produtos à base de farinha de *ora-pro-nobis* é extremamente inovador e significativo.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, ocorre uma crescente expansão no mercado de alimentos com propriedades funcionais. Evidências científicas apoiam que o desenvolvimento de produtos funcionais podem ser uma opção para contribuir com a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis.

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e buscam por alimentos saudáveis, saborosos e práticos. Assim, o desenvolvimento de produtos funcionais cresceu consistentemente nos últimos anos, pois atinge as expectativas dos consumidores. Entretanto, há uma necessidade e uma procura por produtos inovadores, que sejam uma opção não só para a indústria como também possa fortalecer a economia familiar.

O desenvolvimento de produtos a partir de plantas não convencionais é de extrema importância, pois contribui para uma alimentação mais diversificada e saudável, além de incentivar o aproveitamento econômico das espécies negligenciadas, conservação e valorização das mesmas.

A ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill) apresenta diversas vitaminas, minerais, compostos bioativos e fibras. O alto teor de fibras da planta pode indicar efeitos prebióticos, contribuindo para a modulação da microbiota intestinal e na saúde geral. Além disso, estudos *in vitro* e em animais demonstraram que a mesma apresenta elevada capacidade anti-inflamatória e antioxidante, o que poderia ajudar no combate do estresse oxidativo e consequentemente, em doenças crônicas não-transmissíveis. Entretanto, apesar de fortes evidências do alto potencial nutricional da planta, ainda não há ensaios clínicos em humanos para confirmar sua ação antioxidante, anti-inflamatória e verificação de outros possíveis efeitos benéficos. Dessa forma, tais ensaios seriam relevantes para desenvolver produtos inovadores e, além disso, estudar os possíveis efeitos benéficos desta planta em humanos.

4 OBJETIVOS

Este capítulo apresenta o objetivo geral e os objetivos específicos do trabalho.

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver produtos funcionais à base de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill) e avaliar o efeito do seu consumo regular sobre parâmetros intestinais, bioquímicos e antropométricos, em adultos com excesso de peso.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) Desenvolver produtos à base de farinha de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill);
- b) Avaliar a composição química destes produtos;
- c) Investigar a influência da farinha de ora-pro-nobis na adesão de probióticos às células Caco-2, *in vitro*;
- d) Avaliar o efeito do consumo regular destes produtos na microbiota fecal, nos sintomas gastrointestinais, na cor e consistência das fezes, nos parâmetros antropométricos e nos parâmetros bioquímicos em adultos com excesso de peso;
- e) Avaliar as alterações no consumo alimentar dos voluntários.

5 CAPÍTULO I - EFEITO DA *PERESKIA ACULEATA* MILL. *IN VITRO* E EM HUMANOS COM EXCESSO DE PESO: UM ESTUDO RANDOMIZADO *CROSSOVER*

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo foi investigar a influência da farinha de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) sobre a adesão de células epiteliais probióticas no intestino e avaliar o efeito de um produto à base dessa farinha sobre os sintomas gastrintestinais, peso, gordura corporal, glicemia e perfil lipídico em homens com excesso de peso. **Métodos:** A contagem de probióticos *in vitro*, foi analisada pelo teste de adesão de células Caco-2. Parâmetros antropométricos e bioquímicos foram avaliados em um ensaio randomizado *crossover*, realizado com voluntários adultos do sexo masculino. A microbiota intestinal foi avaliada indiretamente pela consistência, cor das fezes e sintomas gastrointestinais. **Resultados:** *Pereskia aculeata* não afetou a adesão de *L. casei* a células Caco-2 *in vitro*. No estudo *in vivo*, a farinha ora-pro-nobis melhorou os sintomas gastrointestinais e aumentou a saciedade dos voluntários. **Conclusão:** O consumo de farinha ora-pro-nobis resultou em melhorias na saúde intestinal. Além disso, a farinha de ora-pro-nobis manteve a alta aderência de *L. casei* às células intestinais e os parâmetros antropométricos e bioquímicos.

Palavras-chaves: fibra alimentar. ingrediente funcional. ora-pro-nobis. sintomas gastrointestinais.

ABSTRACT

Objectives: The objective of this study was to investigate the influence of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) flour on the adhesion of probiotic to intestinal epithelial cells and to evaluate the effect of a product based on this flour on the gastrointestinal symptoms, weight, body fat, glycemia, and lipid profile in overweight men. **Methods:** Microbiological counts (probiotic count, survival after in vitro gastrointestinal resistance, Caco-2 cell adhesion) were analysed. A study randomized, *crossover* intervention was performed. Intestinal microbiota was indirectly assessed by consistency, color of feces and gastrointestinal symptoms. **Results:** *Pereskia aculeata* no affect *L. casei* adhesion to Caco-2 cells. In the *in vivo* study, ora-pro-nobis flour improved the gastrointestinal symptoms, and increased satiety. **Conclusion:** The consumption of ora-pro-nobis flour resulted in improvements in intestinal health. In addition, the flour of ora-pro-nobis maintained the high adherence of *L. casei* to the intestinal cells and the anthropometric and biochemical parameters.

Keywords: dietary fiber. gastrointestinal symptoms. functional ingredient. ora-pro-nobis.

5.1 INTRODUÇÃO

A *Pereskia aculeata* Mill., comumente conhecida como ora-pro-nobis, é uma planta alimentícia não convencional que pertence à família Cactaceae (CALIXTO *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2015). As indústrias alimentar e farmacológica têm se interessado por este vegetal devido ao seu alto teor de nutrientes. As folhas de ora-pro-nobis apresentam níveis notáveis de fibras, proteínas, cálcio, magnésio, manganês, zinco, vitamina A, vitamina C, ácido fólico e compostos bioativos, como os carotenóides (PINTO *et al.*, 2016).

Takeiti *et al.*, (2009) relataram uma alta concentração de fibra dietética em *P. aculeata* (39,1%), responsável pela funcionalidade desta planta. A associação de fibras com probióticos para a melhoria da saúde intestinal já está bem elucidada (WESTFALL, LOMIS, & PRAKASH, 2018). No entanto, estudos sobre os efeitos dos prebióticos na adesão probiótica nas células intestinais ainda estão surgindo. Autores enfatizam a importância de estudos nessa área, uma vez que a adesão de probióticos à mucosa intestinal influencia a modulação e a exclusão competitiva de patógenos em benefício da saúde do hospedeiro (CELEBIOGLU, 2018; KANJAN; HONGPATTARAKERE, 2017; MCLOUGHLIN *et al.*, 2016; PAN, KUMAREE; SHAH, 2017). Portanto, é relevante investigar a influência de *P. aculeata* na capacidade de os probióticos em aderirem às células e avaliar se essa combinação exerceria um efeito sinérgico sobre o trofismo da mucosa intestinal.

Alguns estudos demonstraram que esta planta é segura para o consumo diário e indicaram seu potencial como alimento funcional (ALMEIDA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017). No entanto, estes efeitos prebióticos, bem como outros possíveis efeitos benéficos, devem ser confirmados em ensaios clínicos. Estudos em animais já mostraram que o ora-pro-nobis melhorou a motilidade intestinal e afetou a atividade antiinflamatória aguda e crônica de ratos (BARBALHO *et al.*, 2016; CASTRO *et al.*, 2015). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da farinha de ora-pro-nobis na adesão de probióticos às células epiteliais do intestino e avaliar o efeito de um produto à base dessa farinha sobre os sintomas gastrointestinais, peso, gordura corporal, glicemia e perfil lipídico em homens com excesso de peso.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo aborda as etapas e os materiais e métodos utilizados no estudo. A primeira etapa do estudo consta com a produção dos biscoitos utilizados para o ensaio clínico e a composição centesimal dos mesmos. A segunda etapa consta com o teste *in vitro*, que tem como objetivo avaliar a influência da planta *Pereskia aculeata* na adesão de *Lactobacillus casei* em células Caco-2. A terceira etapa consta com o ensaio clínico, seguido das análises da caracterização das fezes, aplicação do questionário para avaliar os sintomas gastrointestinais, análise dos parâmetros antropométricos e bioquímicos e análise da alteração do consumo alimentar dos voluntários.

5.2.1 Produtos desenvolvidos para o teste *in vitro* e o ensaio clínico *crossover*

Esta etapa do estudo consta com a produção dos biscoitos utilizados no ensaio clínico.

5.2.1.1 Testes pilotos dos produtos desenvolvidos com farinha de ora-pro-nobis

Foram desenvolvidos suco, “cupcakes”, panquecas e biscoitos à base de ora-pro-nobis. Utilizaram-se as folhas e a farinha da ora-pro-nobis para o desenvolvimento dos produtos. A farinha de ora-pro-nobis foi obtida por um fornecedor de Curitiba - PR (Ora-pro-nobis Brasil, PR, Brasil), pronta para o consumo, produto orgânico, o qual as folhas apenas passam por um processo de secagem e moagem. Paralelamente desenvolveram-se produtos com os mesmos ingredientes e quantidades para ser usado como controle.

Para cada dia de teste piloto, três pessoas foram convidadas aleatoriamente para, juntamente com três integrantes da equipe de trabalho, avaliar sensorialmente, as amostras dos produtos em desenvolvimento.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Nutrição (FANUT) da UNIFAL-MG e foram seguidas as boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos. Os ingredientes secos como farinha de trigo, polvilho, açúcar cristal, sal, farinha de ora-pro-nobis e fermento químico foram pesados em balança semi-analítica Marte, modelo AL 500C, precisão de 0,001g. Já os ingredientes líquidos como água e óleo foram quantificados em provetas de vidro graduada, capacidade 10 ml.

5.2.1.2 Escolha do produto a ser utilizado no teste de adesão e ensaio clínico crossover

A análise sensorial dos biscoitos de polvilho foi realizada com 85 voluntários não treinados, seguiu-se a metodologia de Reis e Minim (2006). Embora não tenham obtido notas satisfatórias na análise, foram os produtos escolhidos para serem utilizados no teste de adesão e no ensaio clínico. Pois o biscoito de polvilho com farinha de ora-pro-nobis apresenta poucos ingredientes, e poderia minimizar as interferências na ação da planta.

Os biscoitos apresentavam a seguinte composição/porção: 40 g de polvilho azedo (Amafil®); 0,8 g de sal (Cisne®); 1 ml de óleo vegetal (Liza®) e 150 ml de água filtrada. A única diferença do biscoito teste para o biscoito controle é que o teste apresentava 10 g de farinha de ora-pro-nobis (Ora-pro-nobis Brasil, Curitiba, PR, Brasil), devido ao teor de fibras.

Os biscoitos foram preparados da seguinte maneira: Os ingredientes secos foram peneirados e misturados em um bowl, depois se acrescentou os ingredientes líquidos aos secos e homogeneizou bem com uma colher. Os biscoitos foram modelados com um bico de confeitiro e em seguida foram assados em um forno industrial em 180°C, com circulação de ar, por 15 minutos (APÊNDICE A).

5.2.1.3 Análise da composição química e do teor de fenólicos dos biscoitos

Os biscoitos foram submetidos à avaliação da composição química. O conteúdo de lipídios totais foi determinado por extração utilizando o aparelho extrator de Soxhlet. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Kjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000).

Os teores de fibra alimentar total e frações solúvel e insolúvel foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico de acordo com a AOAC (2000), utilizando-se para a hidrólise enzimática a amilase termo resistente, protease e amiloglicosidase. A fibra solúvel foi calculada pela diferença entre fibra alimentar total e fibra insolúvel.

O teor de umidade foi realizado segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso antes e após a calcinação (AOAC, 2000).

O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença percentual entre os teores de proteínas, lipídios, umidade, cinzas e fibras totais (AOAC, 2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A concentração de fenólicos totais no produto desenvolvido para o grupo teste foi determinada em triplicata de acordo com metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura da absorbância em 726 nm foi feita em equipamento para ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico, utilizando-se a equação de regressão a partir de uma curva padrão de ácido gálico com concentrações variando de 0 a 250 ppm.

5.2.2 Análise do teste de adesão – *in vitro*

Esta etapa tem como objetivo avaliar a influência da planta *Pereskia aculeata* na adesão de *Lactobacillus casei* em células Caco-2.

5.2.2.1 Preparação dos extratos

Para a análise *in vitro* foram preparados extratos metanólicos da folha e farinha de ora-pro-nobis, além do biscoito teste produzido e utilizado no ensaio clínico. A folha da ora-pro-nobis foi obtida por meio de um fornecedor de Varginha (MG, Brasil) o qual apresenta um cultivo orgânico (latitude de 21°34'08.6'' S e longitude de 45°26'31.2'' W) e foram coletadas em abril de 2018. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas, com o número 2714. A farinha de ora-pro-nobis foi obtida por um fornecedor de Curitiba (Ora-pro-nobis Brasil, PR, Brasil) pronta para o consumo, produto orgânico, o qual as folhas apenas passam por um processo de secagem e moagem.

Foram pesados 2 gramas de cada amostra, adicionados 20 ml de metanol e homogeneizadas durante dois minutos em Turrax (MARCONI, Brasil), posteriormente centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm em centrifuga (5810R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany). Foi retirado o sobrenadante e estas amostras foram concentradas em um concentrador a vácuo (Centrivap Concentrador, LABCONCO Corporation, Kansas City, MO). Feito isso as amostras foram ressuspensas em água acidificada, obtendo um volume final de 4 ml, filtradas em filtro millex de 0,45 µm de diâmetro de poro e filtradas novamente em filtro millex de 0,22 µm de diâmetro de poro.

5.2.2.2 Digestão *in vitro*

Um procedimento de digestão gastrointestinal *in vitro*, mimetizando situação fisiológica no trato digestivo superior (estômago e intestino) foi utilizado para obter fração bioacessível dos extratos obtidos, descritos anteriormente. Para esta finalidade seguiu-se a metodologia proposta por Cilla *et al.* (2018). Os extratos foram reajustados para pH 2,0 com 6 M de HCl. Então uma quantidade de solução de pepsina (Sigma P-7012) recentemente preparada, rendimento 0,02 g pepsina/g foi adicionado.

As amostras foram incubadas em banho-maria a 37° C com agitação durante 2 horas. As digestões gástricas foram mantidas em gelo por 10 min para parar a pepsina. Para o estágio de digestão intestinal, o pH das digestões gástricas foi aumentada para pH 6,5 pela adição gota a gota de NaHCO₃ 1 M. Então uma quantidade de pancreatina (Sigma P7545-25G) previamente preparado e previamente desmineralizado solução salina suficiente para fornecer 0,005 g de pancreatina e 0,03 g de bile sal / g amostra foi adicionado, e a incubação foi continuada por um período 2 h. Para parar a digestão intestinal, a amostra foi mantida por 10 minutos em um banho de gelo.

O pH foi então ajustado para 7,2 pela adição gota a gota de 0,5 M NaOH. Alíquotas de 2 ml foram transferidas para eppendorf e centrifugadas a 3500 × g durante 1 h a 4 ° C (5810R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany). Sobrenadantes obtidos após a digestão *in vitro* foram imediatamente congelados a -80 ° C.

5.2.2.3 Teste de adesão

Para o teste de adesão, seguiu-se a metodologia proposta por Balthazar *et al.* (2018) com algumas modificações. A linhagem de células de epitélio intestinal Caco-2 foi utilizada para avaliar a interferência da planta *Pereskia aculeata* Mill. na habilidade de adesão do *Lactobacillus casei*. Foi analisado a folha, a farinha e o biscoito teste desenvolvido para o ensaio clínico antes do processo de digestão e após a digestão *in vitro*. A Caco-2 foi mantida em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com alta glicose (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, São Paulo, Brazil) e 100 IU penicilina/100 µg estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA). A célula foi cultivada a 37°C em estufa umidificada contendo 5% CO₂.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, em densidade de 10^5 células/poço e utilizada após atingir estágio de confluência diferenciado (15 ± 1 dias). Um dia antes do ensaio de adesão, o meio de crescimento foi substituído com o mesmo meio sem antibióticos (penicilina/estreptomicina) e lavado três vezes com solução salina tamponada com fosfato estéril. (PBS). Foi transferido para as monocamadas pós-confluentes de células Caco-2 0,9 ml de cada extrato metanólico, em uma concentração de 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e 0,1 mL de *Lactobacillus casei* (cepa liofilizada), o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na escala de McFarland. Foi realizado o controle negativo, o qual continha apenas o meio DMEM, sem adição dos extratos ou bactéria. E também o controle positivo que continha apenas os *Lactobacillus casei* na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, este controle foi denominado de probiótico.

As restantes partículas foram subsequentemente removidas e as células foram lavadas completamente com PBS de modo a remover *Lactobacillus* não aderente. A Caco-2 foi separada de cada cavidade pela adição de 1 ml de tripsina / EDTA (Sigma Aldrich, EUA) e a suspensão (1 ml) de cada cavidade foi então transferida para um tubo contendo 9 ml de água peptona, diluída em série. Um 1 ml foi transferido para placas contendo meio MRD e os *Lactobacillus* foram cultivados em anaerobiose a 37°C por 72h. As percentagens de adesão foram calculadas determinando as contagens bacterianas viáveis antes do ensaio de adesão e as contagens bacterianas viáveis aderidas às células Caco-2.

5.2.2.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de monocamada de Caco-2 e *Lactobacillus casei* foram obtidas por meio AFM para o exame qualitativo de adesão probiótica em células Caco-2. As imagens AFM com resolução de 256×256 pixels foram obtidas com um microscópio Park NX10 usando o True Non-ContacTM 189 Mode. O tamanho inicial da varredura foi $50 \times 50 \mu\text{m}$ feito com um cantilever NSC15 (da MikroMasch) na taxa de varredura de 0,15 Hz, ganho de servo de 3,5 Z e setpoint de 6 nm.

5.2.3 Ensaio clínico crossover

Esta etapa inclui o desenvolvimento do ensaio clínico.

5.2.3.1 Aspectos éticos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, nº 1.462.043 (APÊNDICE B). Todos os voluntários foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e só participaram do mesmo após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C).

Este estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ensaiosclinicos.gov.br), nº RBR-4nj799 em 13 de julho de 2018.

5.2.3.2 Participantes

Homens com idades entre 20 a 50 anos, com índice de massa corporal (IMC) entre 25 e 35 kg / m² foram incluídos na amostra do ensaio. Os participantes foram recrutados na Universidade Federal de Alfenas, Brasil. Os indivíduos foram orientados a não iniciar ou alterar a prática de exercícios físicos ou programas de dieta durante o período do estudo, bem como não ingerir esteroides, anti-inflamatórios, polivitamínicos e antioxidantes durante o estudo.

Os critérios de exclusão foram: ter diagnóstico de doenças; ter feito uso de suplementos dietéticos, laxantes e antibióticos nos últimos seis meses; ter passado por procedimento cirúrgico nos últimos seis meses; ser vegetariano; estar em uso de remédios ou preparações a base de plantas; apresentar reações alérgicas aos componentes do produto; ter ingerido probiótico no último ano.

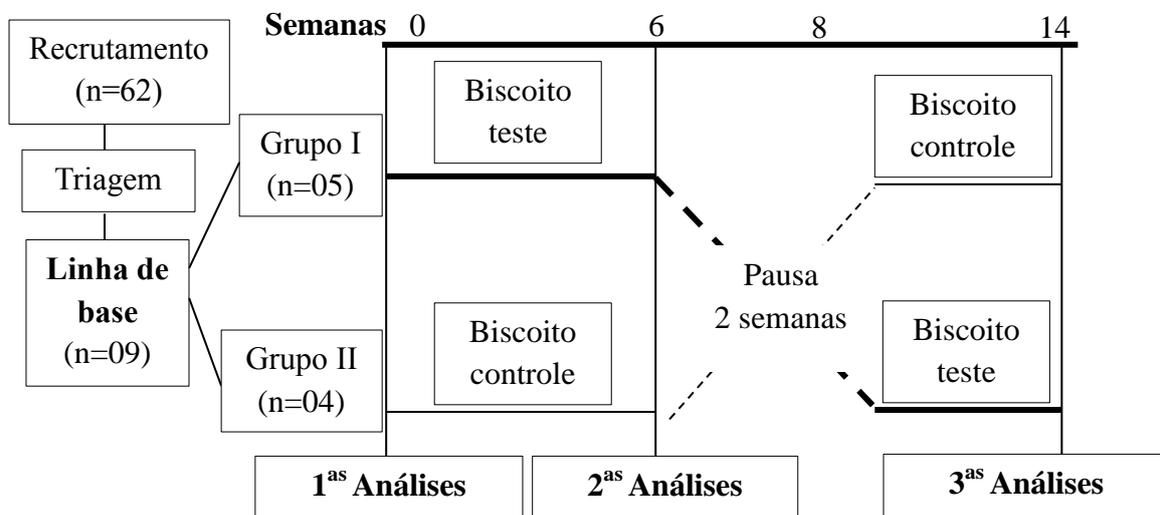
5.2.3.3 Delineamento do estudo

Este protocolo foi uma intervenção cruzada aleatória de 14 semanas com um período pré-intervenção (primeira linha de base, semana 0), uma intervenção de 6 semanas (semanas 1 a 6), seguido de um pausa temporal de 2 semanas (semanas 7-8) e uma segunda intervenção de 6 semanas (Semanas 9-14) (FIGURA 1).

Os participantes foram instruídos a não iniciar ou mudar o exercício físico ou programas de dieta durante o período de estudo, para não consumir esteroides, anti-

inflamatórios, multivitaminas e antioxidantes durante o período do estudo. Aproximadamente metade dos participantes foi aleatoriamente designada para consumir uma porção do biscoito feito com farinha ora-pro-nobis durante a primeira intervenção e receberam uma porção do biscoito controle durante a segunda intervenção, enquanto os outros indivíduos receberam primeiro o biscoito controle e recebeu o biscoito com farinha ora-pro-nobis durante a segunda intervenção.

Figura 1 - Delineamento do ensaio clínico *crossover* para avaliar o efeito do biscoito com farinha de ora-pro-nobis nos sintomas gastrointestinais, variáveis antropométricas e bioquímicas em homens adultos. GRS: *Gastrointestinal Symptom Rating Scale*.



Fonte: Do autor

Os produtos foram administrados uma porção (36 g) por dia, entregues diariamente no período da manhã. A conformidade foi calculada de acordo com a porcentagem de saquinhos retornados, para verificar se o produto tinha sido ingerido: uma taxa de >80% foi definida como o mínimo.

5.2.3.4 Caracterização das fezes

Este tópico aborda a consistência, forma e cor das fezes.

5.2.3.4.1 Coleta de amostra

Os indivíduos foram instruídos a coletar uma pequena parte de suas fezes frescas (aproximadamente 10g) em um copo de amostra selado esterilizado. Estas amostras de fezes foram rotuladas como linha de base (semana 0). Após os dois períodos de intervenção as amostras de fezes foram novamente coletadas e rotuladas como semana 6 e semana 14.

5.2.3.4.2 Consistência

A consistência das fezes foi avaliada por meio da Escala de Bristol validada para o Brasil (Martinez & Azevedo, 2012) (ANEXO A).

5.2.3.4.3 Cor

A coloração foi determinada por meio de observação macroscópica e classificada como castanho escuro, castanho claro, amarelada, fezes descoradas, preta, vermelha ou esverdeada (SILVEIRA JÚNIOR, 1988).

5.2.3.4.4 Questionário *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS)

Para avaliar os sintomas gastrintestinais foi utilizado um questionário denominado *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS), validado para o Brasil – composto por 15 questões. Apresentando uma escala do tipo *Likert*, onde 1 significa ausência de sintomas e 7 significa extremo grau do sintoma. A escala pode ser agrupada em blocos, como dor abdominal, refluxo, diarreia, constipação e indigestão (SOUZA, 2016). Esse questionário foi aplicado nas semanas 0, 6 e 14 (ANEXO B).

5.2.3.5 Avaliação antropométrica

As medidas antropométricas foram aferidas conforme Duarte (2007). Os voluntários foram orientados previamente a comparecer com roupas leves. No momento da avaliação foram instruídos a retirar calçados, meias, blusas de frios, carteiras e bonés.

O peso corporal foi avaliado por meio de balança de plataforma eletrônica digital portátil, calibrada pelo INMETRO, marca Kratos. A altura foi aferida no estadiômetro portátil Altorexata (alcance máximo de 213 cm e precisão de 1 mm). As circunferências corporais (quadril, cintura e braquial) foram obtidas utilizando-se fita métrica inelástica e inextensível, 1 mm, para comparação de seus valores absolutos. Foram utilizados os pontos de corte preconizados pela WHO (2000) para classificação do estado nutricional, segundo o IMC.

As medidas de bioimpedância (BIA) foram realizadas por meio do aparelho tetrapolar RJL Systems Quantum BIA-101Q, com o voluntário em decúbito dorsal. Antes da realização da BIA, para evitar que a alteração do estado de hidratação do indivíduo interfira nos resultados, o seguinte preparo foi solicitado: jejum de no mínimo 2 horas (em caso de grandes refeições), não consumir bebida alcoólica 48 horas antes do teste, não praticar atividade física extenuante 72 horas antes, urinar pelo menos 30 minutos antes, permanecer de 5 a 10 minutos em decúbito dorsal e não utilizar diuréticos nos sete dias que antecediam o teste.

5.2.3.6 Avaliação bioquímica

Foram realizadas a coleta do sangue e as dosagens de colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c, triglicerídeos e glicose sanguínea. Os níveis plasmáticos de colesterol foram analisados nas amostras de sangue, sendo colesterol total pelo método enzimático colorimétrico automatizado, HDL colesterol pelo método direto automatizado e triglicérides por meio do método cinético enzimático automatizado. Os níveis sanguíneos de LDL-c e VLDL-c foram obtidos por cálculo, utilizando-se a fórmula de Friedewald, Levi e Fredrickson (1972): $LDL-c = CT - HDL-c - (TG/5)$, para amostras com níveis de triglicerídeos inferiores a 400 mg/dL. A determinação da glicose sanguínea foi realizada no soro por meio do método enzimático automatizado.

5.2.3.7 Análise do consumo alimentar

O inquérito de consumo alimentar foi realizado por meio do Registro Alimentar. Os voluntários preencheram três dias antes de iniciar a intervenção, e também três dias durante a última semana do consumo dos produtos desenvolvidos no estudo. Nos dois momentos foram recomendados a preencherem dois dias durante a semana e um dia durante o final de semana. A análise da composição nutricional da dieta de cada participante foi feita no Software Avanutri® *Revolution*, versão 4.0.

5.2.4 Análise estatística

Para a avaliação estatística dos dados obtidos nos testes de aderência foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey usado para comparação de dados. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

O delineamento de *crossover* foi analisado considerando medidas repetidas utilizando metodologia de modelos mistos. O método de estimação empregado foi o de máxima verossimilhança restrita (REML) e para identificar a melhor estrutura para a matriz de covariâncias utilizou-se o critério de informação de Akaike (AIC), definindo-se pela simetria composta. As variáveis analisadas foram calculadas considerando a diferença entre a medida e os dados basais. A variável *baseline* também foi considerada no modelo como covariável, sendo os demais fatores fixos e os graus de liberdade corrigidos pela metodologia de Kenward-Roger. As análises foram feitas utilizando a PROC MIXED do SAS V9.3, LSMEANS e somas de quadrado tipo III, com 5% de significância.

5.3 RESULTADOS

Este capítulo aborda os resultados encontrados no estudo.

5.3.1 Composição química e aceitabilidade dos biscoitos

O biscoito teste apresentou alta quantidade de fibras e a concentração de fenólicos totais encontrados foi de 24,2 mg EAG/100g. A apresentação da composição química dos biscoitos está descrita na Tabela 1.

A respeito da análise sensorial, as médias dos biscoitos controle e teste variaram entre 3,55 a 4,63 e não diferiram estatisticamente entre si. Porém, os biscoitos se mostraram práticos e saudáveis, sendo isento de leite, glúten, açúcar, ovos e demais ingredientes que poderiam interferir na ação da ora-pro-nobis. Além disso, os voluntários do ensaio apresentaram tolerância razoável ao sabor dos biscoitos no momento inicial em que foram apresentados.

Tabela 1 - Composição química dos biscoitos teste e controle (g/porção).

Componentes	Biscoito teste	Biscoito controle
Carboidratos (g/porção)	23,07±2,81	27,39±1,23
Proteína (g/porção)	1,30±0,01	0,00±0,00
Lipídeos (g/porção)	0,32±0,02	0,17±0,01
Fibras dietéticas insolúveis (g/porção)	5,24±2,17	0,46±0,46
Fibras dietéticas solúveis (g/porção)	1,17±0,45	0,34±0,72
Fibras dietéticas totais (g/porção)	6,42±2,63	0,81±1,18
Minerais (g/porção)	2,00±0,10	1,16±0,07
Umidade (g/porção)	2,88±0,06	8,04±0,01
Calorias (Kcal/porção)	100,36	111,09

Fonte: Do autor

Nota: Média ± desvio-padrão em triplicatas.

5.3.2 Teste de adesão – *in vitro*

A estirpe foi fortemente adesiva e todas as formulações não afetaram a adesão de *L. casei* às células Caco-2 (TABELA 2, APÊNDICE D). A figura 2 mostra qualitativamente os *Lactobacillus casei* arranjados e aderidos em monocamadas de Caco-2.

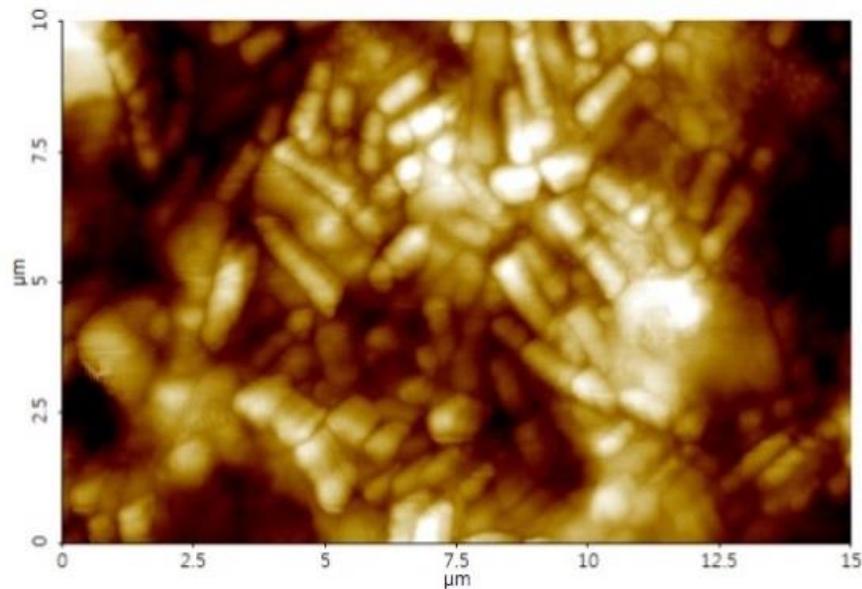
Tabela 2 - Adesão de *L. casei* às células Caco-2 na presença de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*).

	Adesão**	%
Probiótico ¹	5,61 ^a ±0,01	78,17
Folha de ora-pro-nobis	5,51 ^a ±0,02	76,84
Farinha de ora-pro-nobis	5,55 ^a ± 0,07	77,40
Biscoito teste	5,54 ^a ± 0,10	77,26
Resíduos de digestão da folha	5,53 ^a ± 0,11	77,12
Resíduos de digestão da farinha	5,58 ^a ± 0,06	77,82
Resíduos de digestão do biscoito teste	5,63 ^a ± 0,08	78,52

Fonte: Do autor

Notas: Valores expressos em média ± desvio padrão. ^aAs letras iguais na mesma coluna representam resultados estatisticamente iguais pelo teste de Tukey (p <0,05). **A adesão de CaCO-2 é expressa em log UFC/mL e percentual de adesão (%). ¹Controle positivo. Todas as formulações continham *L. casei* em nível 1,5 x 10⁷ UFC / ml.

Figura 2 - Imagens de biofilmes formados *in vitro* por *L. casei* em monocamada de Caco-2, obtidas do Microscópio de Força Atômica (AFM, Park NX10).

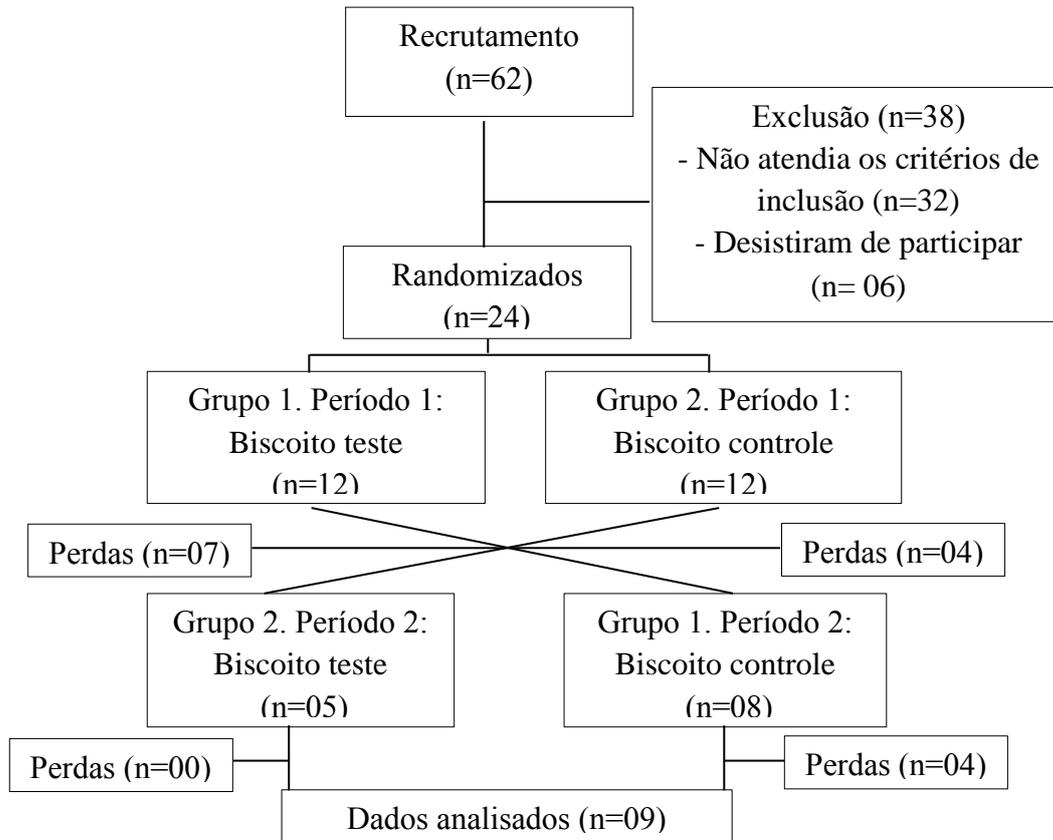


Fonte: Do autor.

5.3.3 Ensaio clínico *crossover*

Dos 24 voluntários que iniciaram o experimento, nove o completaram (FIGURA 3). As características basais do grupo estão resumidas na Tabela 3. A idade média de todos os pacientes foi de 40,78 ± 9,18 anos e o IMC médio foi de 29,46 ± 1,95 Kg / m².

Figura 3 - Delineamento do ensaio clínico *crossover* para avaliar o efeito do biscoito com farinha de ora- probis nos sintomas gastrointestinais, variáveis antropométricas e bioquímicas em homens adultos.



Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Características basais dos voluntários que ingeriram os biscoitos

(Continuação)

	Voluntários (N=09)
Idade (anos)	40,78 ± 9,18*
Peso (Kg)	89,33 ± 4,76*
IMC (Kg/m ²)	29,46 ± 1,95*
Circunferência da cintura (cm)	99,78 ± 3,63*
Hábito intestinal N, (%)	
1-3x/dia	03 (33,3)
3-4x/semana	05 (55,6)
1-2x/semana	01 (11,1)
Consistência das fezes N, (%)	
Consistência normal	06 (66,7)
Consistência pastosa	00 (00,0)
Consistência ressecada	03 (33,3)
Ingestão hídrica N,(%)	
>2 L/dia	04 (44,4)
2-1.5 L/dia	03 (33,3)
1.5-1 L/dia	02 (22,2)

	(Conclusão)
	Voluntários (N=09)
Atividade física N, (%)	
Diariamente	07 (77.8)
1-3x/semana	01 (11.1)
4x ou mais/semana	01 (11.1)

Fonte: Do autor

Legenda: IMC: Índice de massa corporal.

Nota: * Valores expressos em média \pm desvio-padrão

5.3.2.1 Questionário Gastrointestinal Symptom Rating Scale

Os sintomas gastrointestinais mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os dados basais, o biscoito controle e o biscoito teste encontrados no escore total do GSRS (24.0 ± 4.6 , 23.1 ± 6.3 , 18.5 ± 2.9 respectivamente, $P = 0.013$), bem como seu item individual nomeado de dor de fome (1.5 ± 1.13 ; 2.0 ± 0.8 ; 1.1 ± 0.3 respectivamente; $P = 0.003$). Além disso, houve diferença estatística entre os tratamentos nos itens ruído do estômago e flatulência (TABELA 4). Não foram observados efeitos significativos na consistência e cor das fezes.

Tabela 4 - Efeito do consumo dos biscoitos nos sintomas gastrointestinais.

Sintomas GSRS	Diferença dos dados basais		Diferença entre os tratamentos	95% IC		P valores para diferença entre os tratamentos
	Teste	Controle		Mín.	Máx.	
	Média \pm EP	Média \pm EP	Média \pm EP			
Dor de fome	-0,50 \pm 0,16	0,37 \pm 0,16	-0,87 \pm 0,19	-1,3	-0,4	0,003
Ruído do estômago	-0,75 \pm 0,34	0,37 \pm 0,34	-1,12 \pm 0,42	-2,1	-0,08	0,038
Aumento da flatulência	-0,12 \pm 0,42	0,62 \pm 0,42	-0,75 \pm 0,25	-1,3	-0,1	0,024
Escore total	-5,50 \pm 1,08	-0,37 \pm 1,08	-5,12 \pm 1,47	-8,7	-1,5	0,013

Fonte: Do autor

Legenda: IC: Intervalo de confiança; GSRS: *Gastrointestinal Symptom Rating Scale*; EP: erro padrão.

Nota: Os valores foram comparados usando um modelo linear misto com os dados basais sendo uma co-variável, incluindo medidas e ambos os efeitos fixos (semana, tratamento, sequência, período e interação); $P < 0,05$.

5.3.2.2 Parâmetros antropométricos e bioquímicos

Não foram observadas alterações significativas nos dados antropométricos e bioquímicos após a intervenção (TABELA 5).

Tabela 5 - Efeito do consumo dos biscoitos nos dados antropométricos e bioquímicos.

	Diferença dos dados basais		Diferenças entre os tratamentos	P valores da diferença dos tratamentos
	Teste	Controle		
	Média±EP	Média±EP	Média±EP	
Dados Antropométricos				
Peso (Kg)	- 0,10±0,07	0,15±0,12	0,56±0,29	0,1006
IMC (Kg/m ²)	- 0,04±0,03	0,03±0,03	0,18±0,09	0,0988
Circunferência da cintura (cm)	- 2,77±1,96	- 0,44±1,49	-0,07±0,71	0,9196
Circunferência do quadril (cm)	0,00±0,39	0,00±0,39	-0,10±0,57	0,8676
Circunferência do braço (cm)	0,00±0,00	0,22±0,12	0,22±0,12	0,5750
Porcentagem de gordura corporal (%)	0,32±0,22	0,84±0,42	0,20±0,37	0,5969
Gordura corporal (Kg)	0,32±0,22	0,85±0,23	0,33±0,34	0,3647
Massa muscular (Kg)	- 0,30±0,21	- 0,15±0,15	0,61±0,62	0,3603
Dados bioquímicos				
Colesterol total (mg/dL)	- 8,12 ±5,74	7,16±7,64	6,96±9,25	0,4841
LDL (mg/dL)	- 5,33±3,77	11,76±8,75	9,57±8,59	0,3277
HDL (mg/dL)	- 3,00 ±2,12	- 0,39±2,11	-1,86±2,70	0,5179
Triglicerídeos (mg/dL)	21,12±14,93	83,33±43,32	100,42±108,70	0,3980
Glicose (mg/dL)	- 8,12±5,74	- 8,71±4,87	-0,55±1,92	0,7858

Fonte: Do autor

Legenda: IMC: índice de massa corporal, LDL: colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidade. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão.

Nota: Os valores foram comparados usando um modelo linear misto com covariável de linha de base, incluíram medidas e ambos os efeitos fixos (semana, tratamento, sequência, período e interação).

5.3.2.3 Análise do consumo alimentar

A dieta dos voluntários era uma dieta brasileira padrão, consistindo em pães, cereais, legumes, frutas, legumes, café e leite. Antes e após a intervenção, não houve diferença estatística nos níveis de macronutrientes e fibras nos dois grupos; isto é, os voluntários mantiveram sua dieta habitual durante todo o estudo. Deve-se ressaltar que o consumo do biscoito não resultou em aumento significativo no consumo de fibras e macronutrientes (TABELA 6).

Tabela 6 - Consumo de macronutrientes na dieta dos voluntários antes e após a intervenção.

	Diferença dos dados basais		Diferença entre os tratamentos	P valores para diferença entre os tratamentos
	Teste	Controle		
	Média±EP ^c	Média±EP ^c	Média±EP ^c	
Proteína (g)	11,29 ± 9,13	26,70 ± 9,13	-15,41 ± 11,96	0,2386
Carboidrato (g)	46,45 ± 19,53	31,44 ± 19,53	15,00 ± 15,75	0,3725
Fibra dietética total (g)	9,17 ± 2,99	4,12 ± 2,99	5,05 ± 2,90	0,1259
Lipídeos (g)	4,05 ± 9,84	18,41 ± 9,84	-14,35 ± 13,89	0,3360
Calorias (Kcal)	402,92 ± 173,12	421,26 ± 173,12	-18,33 ± 212,33	0,9336

Fonte: Do autor

Legenda: EP: erro padrão

Nota: ^cValores são apresentados como média ± erro padrão. Os valores foram comparados usando um modelo linear misto com co-variável de linha de base, medições incluídas e ambos os efeitos fixos (semana, tratamento, sequência, período e interação).

5.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que analisa a influência da planta *Pereskia aculeata* na aderência bacteriana e o primeiro ensaio clínico *crossover* para avaliar o potencial benéfico da farinha de ora-pro-nobis em homens adultos.

Pode-se perceber *in vitro* que tanto a folha, quanto a farinha e os biscoitos mantiveram a aderência dos *Lactobacillus casei*. Este resultado associado com a redução dos sintomas gastrointestinais observado no estudo *in vivo* sugere que a planta pode beneficiar a microbiota intestinal.

O resultado do teste de adesão é interessante para o avanço de novos estudos que avaliem os possíveis parâmetros bifidogênicos desta planta. Pois ainda há poucos estudos sobre o efeito dos prebióticos na aderência dos probióticos, e alguns já relataram efeitos negativos dos prebióticos disponíveis comercialmente na habilidade de adesão de alguns probióticos (KAVANAUGH *et al.*, 2013; SARABIA-SAINZ *et al.*, 2013). De acordo com Kadlec e Jakubec (2014) a influência dos prebióticos sobre a aderência dos probióticos é fortemente específica à tensão entre eles. Assim, as combinações de prebióticos e probióticos devem ser conhecidas e avaliadas antes do uso. Este estudo sugere que a planta *Pereskia aculeata* pode ser uma boa estratégia para combinar com *Lactobacillus casei* e favorecer a homeostase intestinal.

No estudo *in vivo*, a farinha de ora-pro-nobis melhorou significativamente os escores do GSRS, promovendo a redução da dor de fome e da flatulência. Estes resultados podem ser associados com o alto teor de fibras presente no biscoito teste, estudos já demonstraram que as fibras estão relacionadas com a redução dos sintomas gastrointestinais e com o aumento da saciedade (ANDERSON *et al.*, 2009; JAKOBSDOTTIR; NYMAN; FÅK ; 2014).

A respeito da redução da flatulência observada é importante destacar o tipo de fibra presente no biscoito teste que era composto principalmente por fibras insolúveis. De acordo com Eswaran *et al.* (2013) a fibra alimentar insolúvel é minimamente fermentada e desta forma não há aumento na produção de gás. Deve-se ressaltar também que a dieta dos voluntários, era baixa em fibras, não atingindo a recomendação das *Dietary Reference Intakes* (DRI's) de 14g/1000 Kcal. Além disso, é importante destacar o efeito das diferenças individuais na microbiota intestinal na resposta às intervenções prebióticas. Diante desses fatores pode-se compreender porque ocorreu redução da flatulência e não aumento como geralmente acontece com adição de fibra à dieta.

O consumo de 36 g de biscoitos fornecendo 6,42g de fibra/dia sugere ser uma quantidade razoável para a saúde gastrointestinal. As conclusões de tolerância com base nos escores da GSRS são corroboradas pelos resultados de frequência e consistência das fezes, que revelaram alterações clínicas.

Esse ensaio foi relevante por sinalizar o efeito benéfico desta planta alimentícia não convencional nos sintomas gastrointestinais. Clarke *et al.* (2016) destacam que o impacto da

suplementação na percepção de bem-estar dos pacientes representa uma dimensão significativa que ainda não é muito explorada na prática clínica. Segundo Bailey & Holscher (2018) uma dieta rica em fibras é uma estratégia eficaz na saúde do intestino e sistêmica, contribuindo com a redução da endotoxemia metabólica.

Entretanto nossos resultados não demonstraram alteração no peso, gordura corpórea, circunferência da cintura e abdominal, colesterol, triglicerídeos e glicemia. Foram encontrados apenas dois estudos com ratos que avaliaram estes efeitos da farinha de ora-pro-nobis. Um dos estudos encontrou redução da gordura visceral e do perfil lipídico, bem como ao aumento dos níveis de HDL-c (BARBALHO *et al.*, 2016). Um segundo estudo encontrou redução do peso e nos níveis de lipídios hepáticos, porém foi usada a farinha das folhas de *Pereskia grandifolia* que é da mesma família da *Pereskia aculeata* (ALMEIDA *et al.*, 2015). Ressalta-se que nossos achados são inéditos e, portanto não houve possibilidade de comparação na literatura científica. Entretanto podemos destacar que os fatores ambientais, a quantidade e o tipo de fibra do biscoito à base de farinha de ora-pro-nobis possam ter interferido neste resultado.

A maioria dos estudos que usaram dietas com alto teor de fibras e encontraram redução do peso e alterações metabólicas investigaram em um ambiente de restrição de energia. Destaca-se que a ingestão calórica não foi modificada no presente estudo, visto que os participantes foram instruídos a manter sua dieta usual e isto pode ter interferido nestes achados. Outros estudos que investigaram o efeito da adição de alimentos funcionais e mantiveram a dieta habitual dos voluntários também não observaram efeito nestes parâmetros (HOWARTH *et al.*, 2003; SARAF-BANK *et al.*, 2016).

Os estudos de dietas *ad libitum* com alto teor de fibras mostrando perda de peso, alteração dos lipídeos e glicemia têm usado fibras solúveis isoladas. As fibras provenientes do biscoito à base de farinha de ora-pro-nobis, utilizado neste estudo, são principalmente insolúveis e este é mais um fator que pode estar relacionado com estes resultados. Estes resultados são corroborados com Hodgson *et al.* (2010) que investigaram os efeitos da adição de 12,5 g de fibras insolúveis em uma dieta *ad libitum* e não encontraram efeito nos dados antropométricos e bioquímicos.

Desta forma, os nossos resultados sugerem que a farinha de ora-pro-nobis parece ter uma expressão mais efetiva no intestino do que a nível sistêmico, em homens adultos com excesso de peso. A respeito disso devemos considerar a necessidade de novos estudos para avaliar outras dosagens e inclusive analisar se os compostos bioativos presentes na farinha são absorvidos e se continuam potencialmente ativos no organismo humano. São necessárias

novas pesquisas para avaliar melhor o potencial desta planta no consumo de indivíduos adultos.

Uma das limitações do nosso estudo é o tamanho da amostra. Essas perdas ocorreram, porque os voluntários não se adaptaram ao sabor dos biscoitos. No entanto, este ensaio foi randomizado e balanceado para efeitos de período e transição, e ajustamos os resultados para testes de comparação múltipla.

O principal impacto deste estudo foi à descoberta de uma estratégia dietética funcional, isenta de glúten, e lactose eficaz para a saúde gastrointestinal de homens adultos. Estes resultados contribuirão com a promoção da ora-pro-nobis como um ingrediente funcional, e com o desenvolvimento de novos produtos.

5.5 CONCLUSÃO

O consumo de 36 g de biscoitos fornecendo 6,42g de fibra/dia foi capaz de melhorar alguns sintomas gastrointestinais. Além disso, a farinha de ora-pro-nobis manteve a aderência dos *Lactobacillus casei* às células intestinais, e não alterou os parâmetros antropométricos e bioquímicos.

Esta parte do estudo foi publicada na Revista *Journal of Food Biochemistry* (Vieira *et al.*, 2019; ANEXO C).

6 CAPÍTULO II - BEBIDA À BASE DE FARINHA DE ORA-PRO-NOBIS MELHORA SAÚDE INTESTINAL, PESO E COMPOSIÇÃO CORPORAL: ESTUDO PROSPECTIVO RANDOMIZADO DUPLO-CEGO

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito de uma bebida à base de farinha de ora-pro-nobis (OPN), na microbiota fecal, nos sintomas gastrointestinais e nos parâmetros antropométricos em mulheres. **Metodologia:** Ensaio clínico prospectivo, duplo-cego e randomizado conduzido com 24 mulheres, com idades entre 20 e 60 anos. Durante seis semanas o grupo teste recebeu diariamente uma bebida com adição de OPN e o grupo controle recebeu uma bebida com os mesmos ingredientes e quantidades, porém sem adição de OPN. Foi avaliada a microbiota fecal pelo método *Fluorescence In Situ Hybridisation* (FISH). A consistência e forma das fezes foram analisadas pela Escala de Bristol e a cor das fezes por meio da observação macroscópica. Ainda foi aplicado um questionário baseado no *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS) para avaliar a função gastrointestinal. Os testes estatísticos apropriados foram aplicados com nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** A bebida à base de OPN auxiliou na perda de peso ($p = 0,008$), redução da circunferência da cintura ($p = 0,010$) e redução da gordura corporal ($p = 0,000$). Além desses fatores, também proporcionou redução da dor de fome ($p = 0,039$), redução da eructação ($p = 0,038$), redução da constipação ($p = 0,017$), melhora da consistência das fezes ($p = 0,017$) e redução da sensação de intestino incompleto ($p = 0,042$). **Conclusão:** A bebida à base de OPN exerce efeito na redução do peso, na composição de gordura corpórea e melhora nos sintomas gastrointestinais.

Palavras-chaves: Obesidade. Microbiota fecal. Planta não convencional. Sintomas gastrointestinais.

ABSTRACT

Objective: To assess the effect of a beverage containing ora-pro-nobis (OPN) flour on intestinal microbiota, gastrointestinal symptoms, and anthropometric parameters, in women.

Methods: This prospective, double-blinded, randomized clinical trial included 24 female volunteers between 20 and 60 years of age. For six weeks, the test group received a beverage supplemented with OPN, and the control group received the same beverage without the OPN supplementation. Fecal microbiota was evaluated by the Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) method. The consistency, shape, and color of the participants' feces were evaluated. Each participant responded to a questionnaire based on the Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS). Appropriate statistical tests were applied effects were considered significant if $p < 0.05$.

Results: OPN drink aided in weight loss ($p = 0.008$), waist circumference reduction ($p = 0.010$) and body fat reduction ($p = 0.000$). In addition to these factors, it also provided hunger pain reduction ($p = 0.039$), reduced eructation ($p = 0.038$), reduced constipation ($p = 0.017$), improved stool consistency ($p = 0.017$) and reduced incomplete bowel sensation ($p = 0.042$).

Conclusion: This OPN flour supplemented beverage have an effect on weight reduction, body fat composition and improvement in gastrointestinal symptoms.

Keywords: Gastrointestinal symptoms. Ora-pro-nobis Flour. Obesity. Underutilized plant.

6.1 INTRODUÇÃO

O excesso de peso e a obesidade continuam a ser grandes preocupações de saúde pública. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos ou mais, apresentavam excesso de peso (WHO, 2017). Com o intuito de combater a epidemia da obesidade, várias abordagens dietéticas têm sido propostas para perda de peso. O uso de plantas para fins funcionais no desenvolvimento de novos produtos pode ser uma opção viável para a prevenção e controle de doenças, inclusive a obesidade.

Há muitas espécies de plantas no mundo que são adequadas como alimentos, porém são negligenciadas e subutilizadas (BUCKMAN *et al.*, 2017). Uma dessas plantas é a *Pereskia aculeata* Mill., conhecida popularmente como ora-pro-nobis. As propriedades químicas da farinha produzida a partir da folha da planta incluem alta quantidade de proteínas e minerais (MACIEL; YOSHIDA; GOYCOOLEA, 2018).

Estudos *in vitro* relatam que a ora-pro-nobis apresenta atividade antimicrobiana contra algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas, o que sugere a presença de um amplo espectro de fitoquímicos com atividade antibiótica (GARCIA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2016).

Estudos com animais também têm demonstrado que esta planta tem poder antioxidante, anti-inflamatório e melhora a motilidade intestinal (BARBALHO *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2016). As folhas de *Pereskia aculeata* contêm altos níveis de carotenóides, minerais, fibras alimentares, vitaminas A e C, ácido fólico, esteróis (sitosterol e estigmasterol), flavonóides e compostos fenólicos, estes constituintes possivelmente são os responsáveis por estes efeitos da planta (SOUZA *et al.*, 2014). Vieira *et al.* (2019) realizaram um ensaio clínico *crossover* com homens e observaram que a farinha de ora-pro-nobis melhora a saúde gastrointestinal dos homens. Porém, ainda não há nenhum ensaio clínico conduzido com mulheres e, além disso, há necessidade de mais estudos com humanos para a confirmação destes possíveis efeitos benéficos.

Assim, o objetivo do estudo é verificar o efeito de uma bebida com farinha de ora-pro-nobis na saúde intestinal e nos parâmetros antropométricos em mulheres adultas.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo aborda as etapas e os materiais e métodos utilizados no estudo. A primeira etapa do estudo consta com a produção das bebidas utilizadas para o ensaio clínico e a composição centesimal das mesmas. A segunda etapa consta com o ensaio clínico, seguido das análises da microbiota fecal, caracterização das fezes, aplicação do questionário para avaliar os sintomas gastrointestinais, análise dos parâmetros antropométricos e análise da alteração do consumo alimentar das voluntárias.

6.2.1 Aspectos éticos do ensaio clínico duplo-cego

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, nº 2.717.855 (APÊNDICE E). Todas as voluntárias foram esclarecidas sobre os objetivos do estudo e só participaram do mesmo após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE F).

Este estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ensaiosclinicos.gov.br), nº RBR-3r3mqw em 03 de outubro de 2019.

6.2.2 Desenvolvimento das bebidas

Foram desenvolvidos dois pós para preparo de bebidas (APÊNDICE G). Ressalta-se que ambos continham os mesmos ingredientes e quantidades, com exceção da farinha de ora-pro-nobis (Ora-pro-nobis Brasil, Curitiba, PR) que é acrescentada em um deles, o qual foi denominado de pó para a bebida teste, enquanto que o outro foi denominado de pó para bebida controle. As fórmulas estão descritas na tabela 7.

Para o ensaio clínico, os pós para o preparo das bebidas foram produzidos sempre de um mesmo lote de farinha de ora-pro-nobis, porcionados, embalados e identificados, semanalmente, no Laboratório de Técnica Dietética FANUT, de acordo com as boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos. No momento de serem entregues para as voluntárias foram ressuspensos em 200 mL de água filtrada.

Ressalta-se que antes de iniciar o ensaio clínico, as amostras selecionadas foram submetidas à avaliação sensorial de 83 voluntários não treinados. As formulações foram

codificadas aleatoriamente com números de três dígitos e fornecidas com quantidades padronizadas de 50 ml. Além disso, foi oferecida água para limpeza do palato entre as avaliações.

A aceitabilidade das amostras foi avaliada pela escala hedônica verbal de nove pontos, segundo Reis e Minim (2006). A aceitação foi verificada pelos atributos: aparência, aroma, sabor, consistência e impressão geral. Os avaliadores foram todos voluntários, com idades entre 20 e 50 anos, em cabines individuais.

Tabela 7 - Formulação das bebidas controle e teste utilizadas no ensaio clínico.

Ingredientes	Pó para bebida controle	Pó para bebida teste
Leite em pó (Itambé®)	22 g	22 g
Farinha de beterraba	3 g	3 g
Stevia (Stevita®)	0,6 g	0,6 g
Goma xantana	0,3 g	0,3 g
Farinha de ora-pro-nobis (Ora-pro-nobis Brasil®)	-	10 g

Fonte: Do autor.

6.2.3 Composição química das bebidas

A farinha de ora-pro-nobis e os pós para preparo das bebidas teste controle foram submetidos à avaliação da composição química.

O conteúdo de lipídios totais foi determinado por extração utilizando o aparelho extrator de Soxhlet. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Kjeldhal (AOAC, 2000).

Os teores de fibra alimentar total e frações solúvel e insolúvel foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico, utilizando-se para a hidrólise enzimática a amilase termo resistente, protease e amiloglicosidase. A fibra solúvel foi calculada pela diferença entre fibra alimentar total e fibra insolúvel (AOAC, 2000).

O teor de umidade foi realizado segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso antes e após a calcinação (AOAC, 2000). O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença percentual entre os teores de proteínas, lipídios, umidade, cinzas e fibras totais (AOAC, 2000).

As análises para determinação do conteúdo de umidade, cinzas, proteínas foram realizadas em triplicata; as análises para lipídeos e fibras foram realizadas em duplicata.

6.2.3.1 Determinação da concentração de fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais nos produtos desenvolvidos e da farinha de ora-pro-nobis foi determinada em triplicata de acordo com metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura da absorbância em 726 nm foi feita em equipamento para ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico, utilizando-se a equação de regressão a partir de uma curva padrão de ácido gálico com concentrações variando de 0 a 250 ppm.

6.2.3.2 Determinação da capacidade antioxidante das bebidas

A atividade antioxidante foi determinada em triplicata por meio da capacidade antioxidante presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (YEN *et al.*, 2005). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH, de forma a apresentar absorbância em 517 nm. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 min de reação.

6.2.4 Participantes

O dimensionamento amostral de 30 indivíduos por grupo foi realizado conforme descrito por Hulley *et al.* (2008), com nível de confiança da ordem de 95% e margens absolutas de erro de 5%.

Os indivíduos participantes foram orientados a não iniciar ou alterar a prática de exercícios físicos ou programas de dieta durante o período do estudo, bem como não ingerir esteroides, anti-inflamatórios, polivitamínicos e antioxidantes durante o estudo.

Critérios de inclusão:

1. Mulheres, com idade entre 20 e 60 anos.
2. Porcentagem de gordura acima de 25%.

Crêterios de exclusão:

1. ter diagnóstico de doenças autoimunes, endócrinas, card cias, cerebrovasculares, renais, hepáticas, gota, gastrointestinais, inflamatórias e/ou infecciosas;
2. ter feito uso de suplementos dietéticos, laxantes e antibióticos nos últimos seis meses;
3. ter passado por procedimento cirúrgico nos últimos seis meses;
4. ter feito uso regular de álcool, cigarro e outras drogas no último ano;
5. ser vegetariana;
6. estar em uso de remédios industriais ou preparações fitoterápicas;
7. apresentar reações alérgicas aos componentes do produto;
8. ser gestante ou nutriz;
9. ter ingerido probiótico no último ano.

6.2.5 Desenho experimental

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego. As voluntárias foram distribuídas em dois grupos. O estudo apresentou duração de seis semanas e foi organizado de acordo com as etapas abaixo (FIGURA 4):

1^a Etapa – Divulgação do estudo: O estudo foi divulgado por meio de cartazes colados na faculdade, no e-mail das servidoras e Facebook.

2^a Etapa – Recrutamento: avaliação de triagem; explicação e assinatura do termo de consentimento. Coleta de dados pessoais, avaliação do perfil de atividade física e ingestão alimentar habitual, avaliação nutricional inicial (pressão arterial, medidas antropométricas e realização da avaliação por bioimpedância elétrica). Os voluntários receberam ainda os formulários para preenchimento do Registro Alimentar e protocolos para a coleta das amostras de fezes.

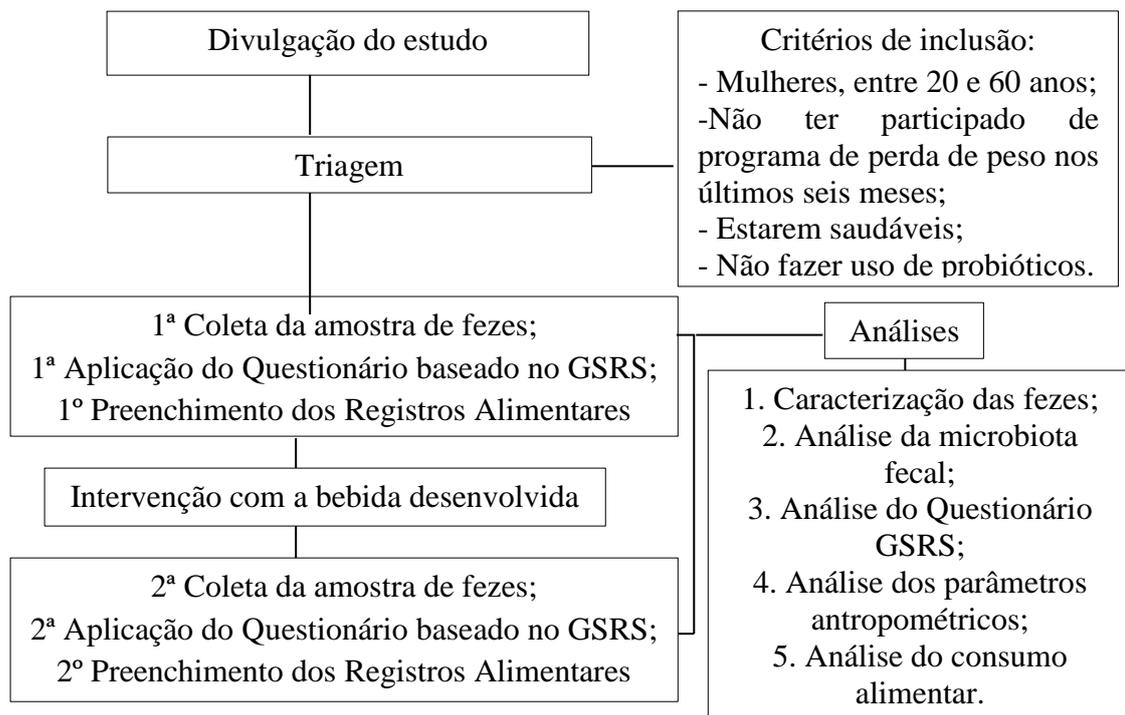
3^a Etapa – Primeiros exames: Apresentaram-se   pesquisadora para entregar os Registros Alimentares devidamente preenchidos, as amostras de fezes e responder o primeiro Questionário *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS), validado para o Brasil.

4^a Etapa – In cio com o produto desenvolvido – Receberam todos os dias os produtos desenvolvidos, durante 06 semanas. Também receberam orientação para anotar sinais e

sintomas relacionados ao consumo do mesmo que porventura viessem a ocorrer, bem como alterações no hábito intestinal, na prática de atividade física e na alimentação.

5ª Etapa – Avaliação final: foi realizada após 06 semanas completas do início da ingestão dos produtos. Repetiram os procedimentos da 2ª etapa.

Figura 4 - Delineamento experimental do estudo randomizado duplo-cego para avaliar o efeito da bebida com farinha de ora-pro-nobis na microbiota fecal, sintomas gastrointestinais e variáveis antropométricas de mulheres adultas.



Fonte: Do autor.

6.2.6 Randomização

Um indivíduo, não envolvido no estudo, atribuiu códigos para os tratamentos do estudo, alocou aleatoriamente os participantes para uma sequência de tratamento. A randomização foi realizada usando um procedimento baseado em uma sequência numérica aleatória.

6.2.7 Conformidade

Durante a semana as voluntárias consumiam toda a bebida, diariamente, na presença de algum integrante do grupo da pesquisa, ou seja, a porção diária (200 mL) foi criteriosamente supervisionada. Assim, era possível verificar se as bebidas estavam sendo realmente ingeridas. Nos finais de semana, elas levavam para a casa o pó das bebidas e retornava com os saquinhos, para a verificação do consumo. Diante disso, a conformidade foi calculada: uma taxa de >95% foi definida como o mínimo.

6.2.8 Análise da microbiota fecal

Os indivíduos foram instruídos a coletar uma pequena parte de suas fezes frescas (aproximadamente 10g) em um copo de amostra selado esterilizado. Estas amostras de fezes foram rotuladas como linha de base (semana 0). Após o período de intervenção as amostras de fezes foram novamente coletadas e rotuladas como semana 6. Os voluntários também receberam orientação para coletarem as amostras de fezes o mais próximo possível dos momentos de análise e a manterem o material sob refrigeração (4°C) até sua entrega no laboratório. As amostras de fezes foram mantidas em paraformaldeído até o momento das análises.

O método *Fluorescence In Situ Hybridisation* – FISH foi adotado para a quantificação de bactérias e grupos de bactérias específicos. O método de FISH foi conduzido de acordo com o protocolo do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos (LEBIOMM) da Universidade Federal de Juiz de Fora, adaptado de Cottrell & Kirchman (2003). De uma forma geral, as amostras foram fixadas, sonicadas, centrifugadas, filtradas, hibridizadas, lavadas, coradas com DAPI, realizada a montagem das lâminas e visualizadas em microscópio de epifluorescência respectivamente. As sondas incluíram sequências gênicas específicas para detecção do total de bactérias (Eub338), *Bifidobacterium* (Bif164), *Clostridium histolyticum* (His150), *Lactobacillus-Enterococcus* (Lab158) e *Enterobacterium* (Enter1432) (APÊNDICE H).

6.2.9 Caracterização das fezes

A consistência, cor e os sintomas gastrointestinais foram analisados utilizando as mesmas metodologias descritas no Capítulo 1.

6.2.10 Avaliação antropométrica

As medidas antropométricas foram aferidas da mesma forma que na metodologia descrita no Capítulo 1.

6.2.11 Análise do consumo alimentar

A análise do consumo alimentar foi analisada como na metodologia descrita no Capítulo 1.

6.2.12 Análise estatística

Os dados obtidos no ensaio clínico randomizado duplo-cego foram analisados utilizando o software SPSS versão 19. Para a consistência e cor das fezes foi utilizado o Teste exato de Fisher. Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para os dados antropométricos, variáveis do questionário GSRS e análise do consumo alimentar. Foi utilizado o *Teste-T* pareado para as variáveis paramétricas. O Teste *t de Student* foi utilizado para comparação do efeito entre os tratamentos. O Teste de *Wilcoxon* para as variáveis não-paramétricas e o Teste *Mann-Whitney* para comparar o efeito entre os tratamentos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6.3 RESULTADOS

Este capítulo aborda os resultados encontrados no estudo.

6.3.1 Composição química e aceitabilidade das bebidas

A bebida teste apresentou teores significativamente maiores de proteínas, fibras, lipídeos e cinzas comparados com a bebida controle (TABELA 8).

A análise sensorial mostrou que a bebida controle apresentou as notas mais altas, com aceitabilidade acima de 70% nos aspectos aparência, aroma, sabor e impressão global. O sabor residual da farinha OPN influenciou o gosto geral das bebidas, portanto, a bebida teste não foi bem aceita. Porém, como apresentava uma ótima composição química para avaliar o possível efeito da farinha OPN, foi decidido manter essa quantidade na formulação.

Tabela 8 - Composição química dos pós para o preparo das bebidas controle e teste utilizadas no ensaio clínico.

Variáveis	Pó da Bebida Controle	Pó da Bebida Teste	P
Calorias (Kcal/porção)	101,89±0,69	142,97±10,57	0,801
Carboidratos totais (g/porção)	13,85±0,16	16,38±2,72	0,215
Proteínas (g/porção)	6,12±0,11	7,78±0,03	0,002
Lipídeos totais (g/porção)	2,44±0,11	5,16±0,03	0,002
Fibras insolúveis (g/porção)	0,75±0,21	4,01±0,05	0,005
Fibras solúveis (g/porção)	0,18±0,04	0,85±0,09	0,001
Fibras totais (g/porção)	1,08±0,42	4,86±0,04	0,002
Cinzas (g/porção)	1,26±0,00	2,70±0,04	0,000
Umidade (g/porção)	1,21±0,05	2,26±0,13	0,001

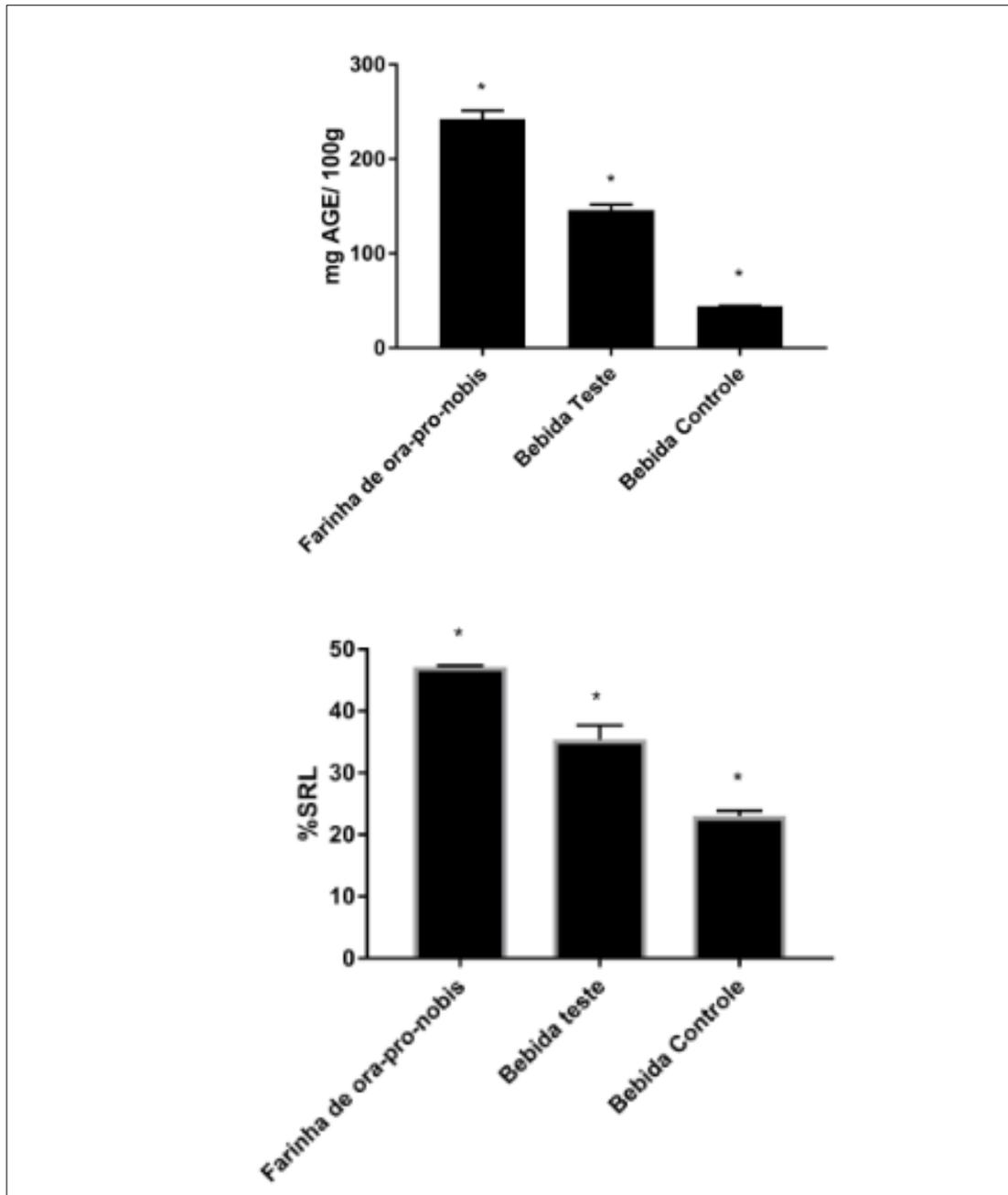
Fonte: Do autor.

Nota: Os valores são expressos em média \pm desvio padrão. (P) Resultados obtidos por meio do Teste t *de Student*.

A concentração de fenólicos totais encontrados na bebida teste e controle mostraram teores de 145,81 e 44,19 mg EAG/100g, respectivamente, apresentando diferenças significativas ($p=0,001$).

A atividade antioxidante mostrou que a bebida teste apresentou 35,40 % SRL e a controle 23,04 % SRL, houve diferenças significativas entre elas ($p=0,006$) (FIGURA 5).

Figura 5 - Média± desvio padrão dos compostos fenólicos (mg EAG/ 100 g) e capacidade antioxidante (% SRL) da farinha de ora-pro-nobis e das bebidas teste e controle. *Diferem estatisticamente entre si pela ANOVA/ Teste de Tukey (P<0,01).



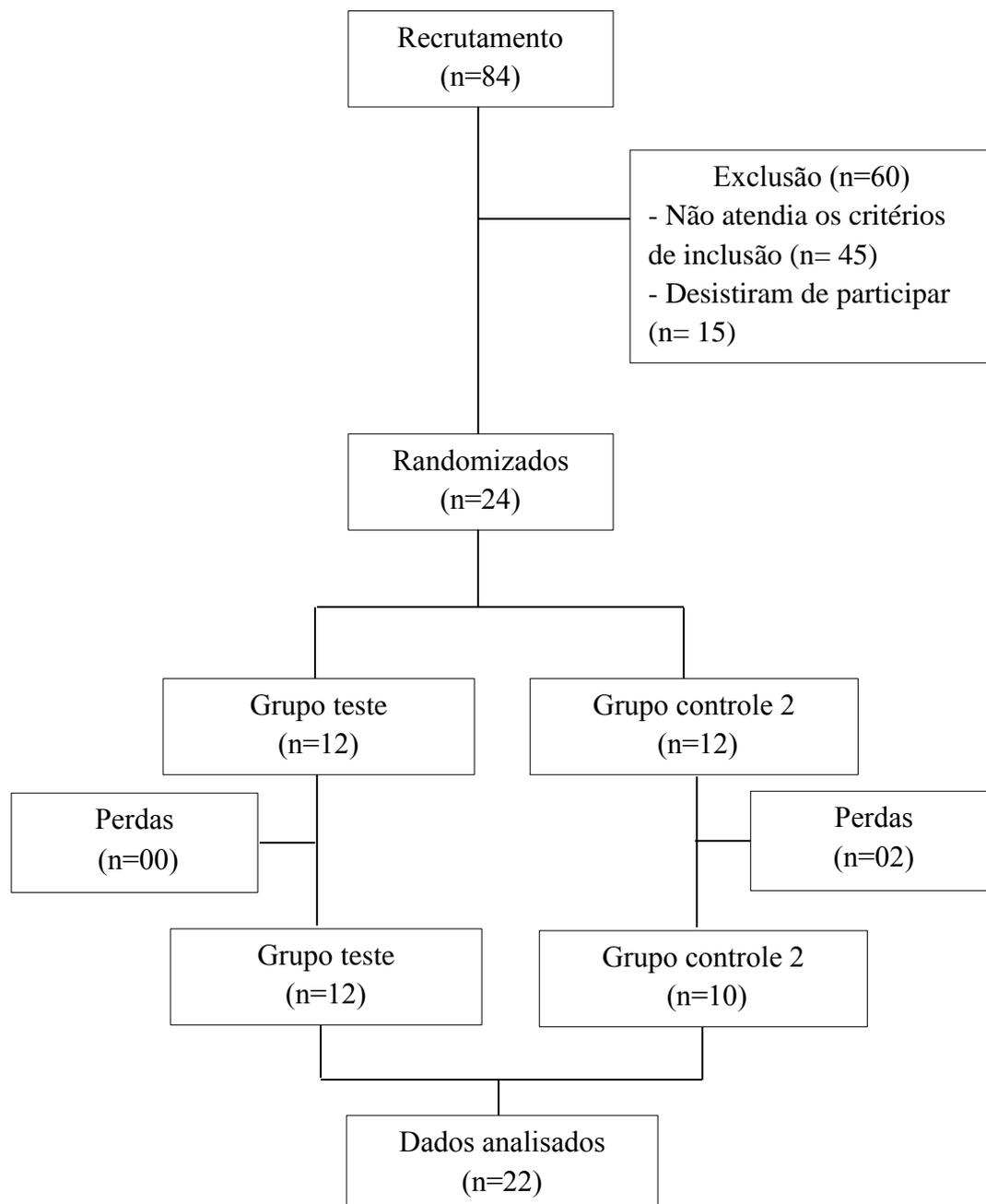
Fonte: Do autor.

6.3.2 Características das voluntárias

O fluxograma das participantes ao longo do trabalho é mostrado na Figura 6. Das 24 participantes que foram randomizados, 91,6% (n = 22) completaram todo o estudo. Duas

participantes foram retiradas do grupo controle porque relataram que alteraram a dieta durante a intervenção. As características basais das voluntárias são mostradas na Tabela 9. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

Figura 6 - Fluxograma do estudo randomizado duplo-cego para avaliar o efeito da bebida com farinha de orapro-nobis na microbiota fecal, sintomas gastrointestinais e variáveis antropométricas em mulheres adultas.



Fonte: Do autor

Tabela 9 - Características basais das voluntárias que ingeriram a bebida controle e teste.

	Grupo Controle (n=10)	Grupo Teste (n=12)	P
Idade (anos)	39,2 ± 8,2	37,1 ± 9,03	0,591
Peso (Kg)	67,40 ± 15,61	65,49 ± 10,53	0,737
IMC (Kg/m ²)	26,64 ± 5,79	24,63 ± 3,23	0,316
Consistência das fezes (%)			
Consistência Normal	70,0	66,6	0,675
Consistência ressecada	30,0	33,3	
Ingestão hídrica (%)			
>2 L/dia	10,0	33,3	
2 -1,5 L/dia	30,0	33,3	
1,5 a 1 L/dia	60,0	16,7	0,143
< 1 L/dia	0	16,7	
Atividade física (%)			
Diária	10,0	8,3	0,670
1-4x /semana	30,0	50,0	
Nenhuma	60,0	41,7	

Fonte: Do autor.

Legenda: IMC: Índice de massa corporal.

Notas: Resultados obtidos por meio do Teste t *de Student* para variáveis contínuas ou Teste Exato de Fisher para variáveis categóricas, (P<0,05).

6.3.3 Microbiota fecal

Não houve diferença significativa entre os grupos na quantificação das bactérias (TABELA 10). Porém, no grupo teste houve uma propensão à redução no número de bactérias totais e do *C. histolyticum*, enquanto que ocorreu uma tendência ao aumento dos *Lactobacillus*.

Tabela 10 - Densidade de bactérias (10^6 cel./g) no *baseline* e após a intervenção.

Procariotos	Grupo controle (n=10)		P ¹	Grupo Teste (n=10)		P ¹	P ²
	Semana 0	Semana 6		Semana 0	Semana 6		
DAPI	5,83±3,03	3,79±2,15	0,108	4,18±2,91	3,01±2,29	0,332	0,620
<i>Bifidum</i>	0,21±0,23	0,09±0,24	0,361	0,14±0,22	0,11±0,17	0,676	0,582
<i>L. paracasei</i>	0,09±0,15	0,16±0,24	0,500	0,21±0,32	0,06±0,13	0,230	0,607
<i>Lactobacillus</i>	0,31±0,41	0,12±0,05	0,198	0,15±0,12	0,23±0,15	0,338	0,116
<i>Enterococcus</i>	0,01±0,02	0,01±0,02	0,686	0,02±0,04	0,01±0,04	0,793	0,440
<i>C. histolyticum</i>	0,00±0,01	0,00±0,01	0,642	0,02±0,05	0,00±0,01	0,223	0,076

Fonte: Do autor.

Legenda: DAPI: Total de microrganismos

Notas: (P¹) Comparação no *baseline* (antes da ingestão das bebidas) e após 6 semanas de ingestão dos produtos em cada intervenção, resultados obtidos por meio do Teste *t de Student* pareado (P<0,05).

(P²) Comparação do efeito entre os tratamentos – comparação do Δ das alterações entre as duas intervenções por meio do Teste *t de Student* (P<0,05).

6.3.4 Características das fezes das voluntárias

Em relação a cor das fezes não houve diferença significativa em nenhum dos grupos (TABELA 11). Embora não tenha ocorrido diferença estatística na escala de Bristol, após a intervenção, observa-se um aumento em fezes mais líquidas na bebida teste (TABELA 12).

Tabela 11 – Análise da cor das fezes, antes e após a intervenção com as bebidas.

Coloração	Grupo Controle (n=10)		P	Grupo Teste (n=12)		P
	Antes da Intervenção (%)	Depois da Intervenção (%)		Antes da Intervenção (%)	Depois da Intervenção (%)	
Castanho Escuro	30,00	50,00		58,3	66,7	
Castanho Claro	60,00	40,00	0,333	33,3	33,3	0,109
Amarelada	10,00	10,00		8,3	0	

Fonte: Do autor.

Notas: Resultados obtidos por meio do Teste Exato de Fisher (P<0,05).

Tabela 12 – Análise das formas das fezes, antes e após a intervenção com as bebidas.

Escala de Bristol	Grupo Controle (n=10)		P	Grupo Teste (n=12)		P
	Antes da Intervenção (%)	Depois da Intervenção (%)		Antes da Intervenção (%)	Depois da Intervenção (%)	
1 e 2	30,00	30,00		41,7	8,3	
3 e 4	70,00	70,00	0,183	58,3	58,3	0,072
5 e 6	0	0		0	33,3	

Fonte: Do autor.

Legenda: 1 e 2: Fezes enrijecidas; 3 e 4: Fezes normais; 5 e 6: Fezes amolecidas.

Notas: Resultados obtidos por meio do Teste Exato de Fisher ($P < 0,05$); Forma das fezes avaliadas segundo Escala de Bristol, validada para o Brasil.

6.3.5 Questionário *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS)

A bebida com farinha de ora-pro-nobis proporcionou significativamente redução da dor de fome e redução de fezes enrijecidas (TABELA 13).

Tabela 13 – Análise dos sintomas gastrointestinais, antes e após a intervenção com as bebidas.

Sintomas	Grupo Controle (n=10)					p ¹	Grupo Teste (n=12)					p ¹	p ²
	Antes da Intervenção		Após a Intervenção		DM		Antes da Intervenção		Após a Intervenção		DM		
	Média ± DP	Mediana (P25; P75)	Média ± DP	Mediana (P25; P75)			Média ± DP	Mediana (P25; P75)	Média± DP	Mediana (P25; P75)			
Dor abdominal	2,2±2,5	2,2 (1; 7)	1,7±1,49	1,6 (1; 5)	- 0,6	0,593	1,50±1,1	1,5 (1; 4)	1,42±0,9	1,2 (1; 4)	-0,18	0,854	0,964
Dor de Fome	1,7±0,9	1,5 (1; 4)	2,1±1,1	1,8 (1; 4)	0,4	0,157	2,0±1,59	1,5 (1; 6)	1,33±0,8	1,1 (1; 4)	-0,77	0,039	0,049
Ronco	3,2±2,5	2,0 (1; 7)	2,9±2,2	2,0(1; 7)	- 1,2	0,785	1,92±1,7	1,5 (1; 7)	1,5±1,0	1,3 (1; 4)	-0,42	0,276	0,081
Estômago com ar	2,1±2,0	1,7 (1; 7)	1,7±1,49	1,6 (1; 5)	-0,4	0,157	1,25±0,8	1,2 (1; 4)	1,58±1,1	1,3 (1; 4)	0,01	0,450	0,923
Erucação	1,1±0,3	1,1 (1; 2)	1,0±0,0	1,0 (1; 0)	-0,1	0,317	1,67±0,8	1,5 (1; 3)	1,0±0,0	1,0 (1; 0)	-0,67	0,038	1,000
Flatulência	3,4±1,95	3,2 (1; 7)	3,3±1,8	3,4 (1; 6)	-0,1	0,858	2,25±1,4	1,8 (1; 6)	2,67±1,4	2,5 (1; 6)	0,42	0,435	0,398
Constipação	1,7±1,3	1,38 (1;5)	1,4±0,69	1,3 (1; 3)	-0,4	0,317	2,83±2,2	1,8 (1; 7)	1,1±0,5	1,1 (1; 3)	1,73	0,017	0,239
Diarreia	1,4±1,2	1,4 (1; 5)	1,1±0,31	1,1 (1; 2)	- 0,3	0,317	1,0±0,2	1,0 (1; 2)	1,0±0,2	1,0 (1; 2)	0,00	1,000	0,894
Fezes moles	1,6±1,35	1,4 (1; 5)	1,3±0,67	1,2 (1; 3)	- 0,4	0,317	1,33±0,8	1,1 (1; 4)	2,2±1,2	2,0 (1; 4)	0,87	0,026	0,053
Fezes duras	2,8±2,5	1,7 (1; 7)	2,1±1,96	1,5 (1; 7)	- 0,7	0,285	2,58±1,9	1,8 (1; 7)	1,0±0,0	1,0 (1; 1)	1,58	0,017	0,018
Evacuação urgente	1,1±0,31	1,1 (1; 2)	1,1±0,31	1,1 (1; 2)	0,00	1,000	1,0±0,0	1,0 (1; 1)	2,0±1,5	1,6 (1; 5)	1,0	0,041	0,070
Sensação de intestino incompleto	2,7±1,6	2,75 (1;5)	2,0±1,49	1,5 (1; 5)	-0,7	0,109	2,17±1,4	1,7 (1; 5)	1,0±0,2	1,0 (1; 2)	- 0,7	0,042	0,065

Fonte: Do autor.

Legenda: DP: desvio-padrão; DM: diferença das médias.

Notas: (1) Comparação dos dados basais e após 6 semanas de ingestão dos produtos em cada intervenção, resultados obtidos por meio do Teste de Wilcoxon (P<0,05).

(2) Comparação do efeito entre os tratamentos – por meio do Teste *Mann-Whitney*

6.3.6 Análise dos parâmetros antropométricos

Após o consumo das bebidas, no grupo controle houve redução da porcentagem de gordura; E no grupo teste houve redução significativa do peso, circunferência da cintura, redução da massa de gordura e porcentagem de gordura corporal (TABELA 14). Porém, não houve diferença significativa quando se comparou o efeito entre os tratamentos.

Tabela 14 – Análise dos parâmetros antropométricos antes e após a intervenção com as bebidas.

Variáveis	Grupo Controle (n=10)		P ¹	Grupo Teste (n=12)		P ¹	P ²
	AI	DI		AI	DI		
Peso (Kg)	67,40±15,6	67,34±15,05	0,867	65,49±10,49	64,73±10,13	0,008	0,266
IMC (Kg/m ²)	26,64±5,79	26,63±5,67	0,958	24,63±3,23	24,35±3,12	0,008	0,806
CC (cm)	81,10±11,1	80,90±10,88	0,443	77,33±8,57	76,50±8,17	0,010	0,333
RCEst (cm)	51,11±7,70	50,98±7,57	0,439	47,50±5,21	46,99±5,00	0,010	0,258
CB (cm)	28,50±3,71	28,80±3,58	0,279	28,25±3,10	28,00±3,19	0,515	0,256
GC (%)	35,22±5,92	34,48±5,81	0,022	34,36±4,20	33,35±4,15	0,000	0,201
MG (Kg)	24,46 ± 9,62	23,97±9,10	0,124	22,66±5,50	21,73±5,15	0,000	0,138
MM (Kg)	42,94± 6,33	43,36 ± 6,28	0,185	42,81±6,06	43,08±6,08	0,099	0,912

Fonte: Do autor.

Legenda: AI: antes da intervenção; DI: depois da intervenção; IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; RCEst: Relação cintura/estatura; CB: circunferência do braço; MG: massa gorda; MM: massa magra.

Notas: (P¹) Comparação no *baseline* (antes da ingestão das bebidas) e após 6 semanas de ingestão dos produtos em cada intervenção, resultados obtidos por meio do Teste *t de Student* pareado (P<0,05).

(P²) Comparação do efeito entre os tratamentos – comparação do Δ das alterações entre as duas intervenções por meio do Teste *t de Student*.

6.3.7 Análise do consumo alimentar

O consumo alimentar revelou que não houve diferença significativa nas quantidades de macronutrientes e nem nas fibras, em ambos os grupos após a intervenção. Porém, o consumo de fibras apresentou uma tendência ao aumento após o consumo das bebidas (TABELA 15).

Tabela 15 - Análise dos macronutrientes e fibras antes e após a intervenção com as bebidas.

	Grupo Controle (N=10)		p	Grupo Teste (N=12)		p
	Basal	Após intervenção		Basal	Após intervenção	
	Média±DP	Média±DP		Média±DP	Média±DP	
PTN (g)	71,3±11,9	72,4±16,5	0,851	98,4±65,84	78,0±21,95	0,327
CHO (g)	236,1±124,1	226,2±51,9	0,716	216,4±70,85	202,1±57,0	0,546
Fibras (g)	13,1±4,2	15,5±4,4	0,068	14,2±8,23	16,85±6,93	0,073
LIP (g)	80,5±56,1	59,5±21,6	0,257	103,6±74,2	73,1±56,09	0,123
CAL (Kcal)	1954,9±647,2	1822,7±431,0	0,240	2192,5±792,7	1776,8±656,0	0,108

Fonte: Do autor

Legenda: PTN: Proteína; CHO: Carboidrato; LIP: Lipídeos; CAL: Calorias; DP: desvio-padrão

Notas: Resultados obtidos por meio do Teste *t de Student* pareado ($P < 0,05$).

6.4 DISCUSSÃO

A bebida com ora-pro-nobis auxiliou na perda de peso, redução da circunferência da cintura e redução da gordura corporal. Além desses benefícios também proporcionou redução da dor de fome, redução da eructação, redução da constipação, melhora da consistência das fezes e redução da sensação de intestino incompleto. Houve ainda uma tendência na redução do número de bactérias totais, do *C. histolyticum* e aumento dos Lactobacilos.

A redução do peso, circunferência da cintura e redução da gordura corporal observada após o consumo da bebida teste, pode estar relacionada com o acréscimo de fibras, proteínas e fenólicos provenientes da farinha de ora-pro-nobis.

Algumas fibras podem retardar o esvaziamento gástrico e diminuir a taxa de absorção de glicose no intestino delgado. Respostas pós-prandiais lentas e constantes de glicose e insulina às vezes são correlacionadas com saciedade. Além disso, hormônios intestinais como grelina, polipeptídeo YY e peptídeo semelhante ao glucagon são liberados no processo digestório e contribuem com a regulação da saciedade, redução da ingestão de alimentos e do balanço energético geral (SLAVIN, 2013), o que leva a uma redução do peso e melhora da composição corporal.

As fibras também podem modular o perfil da microbiota intestinal, auxiliando na homeostase intestinal, gerando efeitos antiinflamatórios e promovendo a redução do peso (SUGIZAKI; NAVES, 2018). Dessa forma, as fibras alimentares presentes na farinha de ora-pro-nobis podem ter contribuído com estes resultados.

Alguns aminoácidos essenciais, como o triptofano e a leucina, presentes na planta *Pereskia aculeata* (TAKEITI *et al.*, 2009) também podem estar relacionados com a redução do peso, pois estudos mostraram que ambos os aminoácidos exercem efeitos potentes sobre o apetite (BOLSTER *et al.* 2018; MEYER-GERSPACH *et al.*, 2016; STEINERT *et al.*, 2014).

A bebida teste ainda apresentou teores significativos de polifenóis provenientes da farinha de ora-pro-nobis. Estes compostos bioativos também têm sido implicados no aumento da saciedade, redução do consumo de energia e aumento da termogênese, envolvidos no controle do peso corporal (FARHAT; DRUMMOND; AL-DUJAILI, 2017).

Os polifenóis possuem grupos fenólicos doadores de elétrons em suas estruturas, o que permite que eles previnam localmente danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio no trato intestinal. No entanto, embora sua capacidade antioxidante seja frequentemente citada, pesquisas recentes sugerem que essa não é a principal causa de seus efeitos na gordura corporal (VAN HUL; CANI, 2019). Uma das possíveis maneiras para os polifenóis reduzirem o peso é por meio da inibição de enzimas como lipase pancreática, amilase e glucosidase, pois assim diminuem as taxas de absorção de gorduras e açúcares, promovendo a redução do peso (ROTHENBERG; ZHOU; ZHANG, 2018).

O grupo controle também apresentou redução da porcentagem de gordura corporal, com isso, não se descarta a possibilidade do efeito combinado da farinha de ora-pro-nobis com os outros ingredientes da bebida. A estévia é um dos componentes que poderia favorecer estes resultados. Segundo Ashwell (2015), após fazer uma revisão deste edulcorante, concluiu que esta pode ser uma ferramenta promissora para ajudar na redução do consumo de energia, e como consequência levar à redução e prevenção da obesidade. A farinha de beterraba é outro ingrediente que apresenta compostos bioativos e capacidade antioxidante (GULDIKEN *et al.*, 2016), apesar de estar em baixa dosagem nas bebidas pode ter contribuído com o aporte destes compostos que modulam o estresse oxidativo.

Como o grupo teste apresentou maior perda de peso e percentual de gordura corporal comparado ao controle, acredita-se que houve um efeito sinérgico dos ingredientes com os da planta *Pereskia aculeata*. Segundo Rein *et al.* (2012), a bioacessibilidade é influenciada pelos sinergismos e antagonismos dos diferentes componentes. Sendo que a biodisponibilidade dos compostos bioativos é dependente da forma em que é ingerida, da matriz alimentar na qual

está inserida e das diferenças individuais da microbiota. Vieira *et al.* (2017) realizaram um ensaio clínico randomizado para avaliar uma bebida composta por cacau e farinha de banana verde e observaram que os efeitos dos alimentos funcionais depende da combinação com os demais ingredientes do produto ofertado.

Outro resultado relevante deste trabalho foi à melhora dos sintomas gastrointestinais, avaliado por meio do questionário GSRS. O grupo controle não apresentou nenhuma diferença significativa, enquanto que o grupo teste houve redução da dor de fome, redução da eructação, redução de fezes enrijecidas e redução da sensação de intestino incompleto. Provavelmente isto se deve ao teor de fibra alimentar presente na farinha de ora-pro-nobis. A fibra alimentar desempenha um papel fundamental em influenciar no volume das fezes, reduzir o pH do trato digestivo, sintetizar ácidos graxos voláteis e reduzir o tempo de trânsito intestinal (ADAMS *et al.*, 2018).

Este resultado corrobora com os resultados de Barbalho *et al.* (2016) que realizaram uma pesquisa com ratos machos e observaram que a farinha de ora-pro-nobis melhorou a motilidade intestinal. Vieira *et al.* (2019) avaliaram o efeito da farinha de ora-pro-nobis em homens por meio de um ensaio clínico *crossover* e também observaram uma melhora dos sintomas gastrointestinais. Dessa forma, o consumo de farinha de ora-pro-nobis sugere ser uma boa estratégia para favorecer a saúde gastrointestinal de adultos.

Embora não tenha ocorrido diferença da presença e quantidades das bactérias analisadas nas fezes, foi observado que com o consumo da bebida teste houve uma tendência à redução no número de bactérias totais e do *C. histolyticum*, enquanto que ocorreu um aumento em números absolutos dos *Lactobacillus*. Em intervenções com poucos participantes, como em nosso estudo, é mais difícil observar os efeitos na microbiota fecal. Pois os indivíduos apresentam composições bacterianas distintas, sendo em parte definidas geneticamente e em outra determinada por características individuais e ambientais, o que resulta numa grande variabilidade intra e interindividual (MORAES *et al.*, 2014). Além disso, Kjølbaek *et al.* (2019) sugeriram que indivíduos, dependendo da microbiota intestinal inicial, poderia responder de forma diferente a uma intervenção dietética.

Esta tendência ao aumento dos *Lactobacillus* está de acordo com os resultados obtidos por outros estudos (GARCÍA-PERIS *et al.*, 2012; GULLÓN *et al.*, 2016), os quais também utilizaram o método de FISH e relataram que os prebióticos estimulam a multiplicação ou atividade de alguns grupos bacterianos como *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* que podem beneficiar a saúde intestinal. Assim, levanta-se a hipótese que a planta *Pereskia aculeata*

possa ter contribuído com a modulação da microbiota intestinal e favorecido a saúde intestinal, o que repercutiu no resultado dos sintomas avaliados.

Este estudo apresenta algumas limitações. Os resultados poderiam ser influenciados pelo tamanho da amostra, duração da ingestão das bebidas e o método de avaliação dietética. Registros dietéticos de três dias no início do estudo e no final da intervenção podem ter algum grau de erro devido a relatos imprecisos. Para minimizar esse erro, os participantes foram orientados a fornecer relatórios detalhados e todos os registros foram revisados. Além disso, o ensaio foi randomizado e balanceado.

Deve-se considerar também a possibilidade de um efeito placebo. Estudos têm observado a interferência deste efeito nos desfechos (FINNISS, 2018; GUPTA; VERMA, 2013). Dessa maneira, pode ter ocorrido um viés de expectativa nas participantes do estudo, o que pode ter influenciado nos resultados.

Destaca-se que a maior dificuldade do trabalho era em como ofertar a farinha de ora-pro-nobis, pois esta apresenta um sabor amargo, que geralmente não é agradável ao paladar. Por isso, era necessário um produto que fosse tolerado pelas voluntárias, a fim de evitar a perda de amostras. Deveria ser ainda um produto saudável e que houvesse um mascaramento da cor das bebidas, por se tratar de um ensaio duplo-cego. Dessa forma, cada ingrediente da bebida foi pensado com o intuito de resolver todas essas questões. Durante o ensaio, foi surpreendente observar que as voluntárias, contrariamente ao resultado de baixa aceitação da bebida teste, aderiram bem ao produto, divulgaram para as colegas que nos procuravam para participar do estudo e ainda se mostraram dispostas a continuar a consumi-lo por mais tempo caso necessitasse.

A dieta das participantes é um fator que deve ser considerado nos achados. O uso de produtos com ora-pro-nobis foi realizada dentro do contexto de vida cotidiana, com ingestão *ad libitum*. Entretanto as voluntárias apresentavam uma dieta habitual bem padronizada, sem muitas variações o que controlam os fatores de interferência.

O principal impacto deste estudo é a descoberta de uma estratégia dietética eficaz na redução do peso e gordura corporal e melhora na saúde intestinal de mulheres adultas. Assim, esta pesquisa contribuirá com a promoção da ora-pro-nobis como um ingrediente funcional.

6.5 CONCLUSÃO

A bebida com farinha de ora-pro-nobis promoveu a redução do peso, da circunferência da cintura e porcentagem de gordura corporal; melhorou a consistência das fezes, e promoveu a redução da dor de fome em mulheres adultas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A planta *Pereskia aculeata* manteve a alta adesão do *Lactobacillus casei* em células Caco-2. Mais pesquisas são necessárias para avaliar este possível efeito sinérgico da planta com probióticos em células epiteliais intestinais.

A adição de farinha de ora-pro-nobis nos produtos desenvolvidos, proporcionou melhora de alguns sintomas gastrointestinais tanto em homens quanto em mulheres.

O biscoito com farinha de ora-pro-nobis manteve estáveis os parâmetros antropométricos e bioquímicos dos homens. Já a bebida com ora-pro-nobis reduziu o peso, circunferência da cintura e gordura corpórea das mulheres.

A microbiota fecal mostrou uma tendência de aumento dos *Lactobacillus* que deve ser melhor investigada.

Estes resultados contribuem para a promoção desta planta como ingrediente funcional. Além de ajudar com o resgate cultural da *Pereskia aculeata*, o trabalho também incentiva novas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de produtos com efeitos positivos na saúde de indivíduos adultos.

São necessárias novas pesquisas para avaliar melhor o potencial desta planta no consumo de indivíduos adultos. Deve-se considerar a necessidade de estudos para aperfeiçoar o desenvolvimento de novos produtos, avaliar outras dosagens e inclusive analisar se os compostos bioativos presentes na farinha são absorvidos e se continuam potencialmente ativos no organismo humano.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. *et al.* Interactions of dietary fibre with nutritional components on gut microbial composition, function and health in monogastrics. **Curr Protein Pept Sci.**, v. 19, n. 10, p. 1011-1023, 2018.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. *et al.* Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 34, n. 1, 2012.
- ALMEIDA, M. E. F. *et al.* Caracterização química das hortaliças não convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Biosci J**, v. 30, p. 431-439, 2014.
- ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciênc. Rural**, v. 42, n. 4, 2012.
- ALMEIDA, M. E. F. *et al.* Improvement of physiological parameters of rats subjected to hypercaloric diet, with the use of *Pereskia grandifolia* (Cactaceae) leaf flour. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 10, p. 701-709, 2015.
- ANDERSON, J. W. *et al.* Health benefits of dietary fiber. **Nutr Rev.**, v. 67, n. 4, p. 188–205, 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 17. ed. Washington: AOAC, 2000.
- ASHWELL, M. Stevia, nature's zero-calorie sustainable sweetener. **Food and Nutrition**, v. 50, n. 3, 2015.
- BAILEY, M. A.; HOLSCHER, H. D. Microbiome-Mediated Effects of the Mediterranean Diet on Inflammation. **Adv Nutr.**, v. 9, n. 3, p. 193–206, 2018.
- BALTHAZAR, C. F. *et al.* The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. **Food Chemistry**, v. 25, n. 246, p. 464-472, 2018.
- BARBALHO, S. M. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller flour: metabolic effects and composition. **J Med Food**, v. 19, n. 9, p. 890-894, 2016.

BIMBO, F. *et al.* Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. **Appetite**, v. 1, n. 113, p. 141-154, 2017.

BOLSTER, D. R. *et al.* Consuming lower-protein nutrition bars with added leucine elicits postprandial changes in appetite sensations in healthy women. **The Journal of Nutrition**, v. 0, p. 1-9, 2018.

BRASIL. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jan. 1998.

BUCKMAN, E. S. *et al.* Determination of the chemical and functional properties of yam bean (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) flour for food systems. **Food Sci Nutr**, v. 6, p. 457-463, 2018.

CALIXTO, C. *et al.* Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n.1, p. 86–93, 2012.

CAMPANARO, A. *et al.* DNA barcoding to promote social awareness and identity of neglected, underutilized plant species having valuable nutritional properties. **Food Research International**, v. 115, p. 1-9, 2018.

CANO-LAMADRID, M. *et al.* Phytochemical composition of smoothies combining pomegranate juice (*Punica granatum* L) and Mediterranean minor crop purées (*Ficus carica*, *Cydonia oblonga*, and *Ziziphus jujube*). **J Sci Food Agric.**, v. 98, n. 15, p. 5731-5741, 2018.

CARVALHO, B. M.; SAAD, M. J. A. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

CASTRO, N. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015.

CELEBIOGLU, H. U. *et al.* Plant polyphenols stimulate adhesion to intestinal mucosa and induce proteome changes in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Mol Nutr Food Res.**, v. 62, n. 4, 2018.

CILLA, A. *et al.* Protective effect of bioaccessible fractions of citrus fruit pulps against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. **Food Research International**, v. 103, n. (October 2017), p. 335–344, 2018.

CLARKE, S. T. *et al.* β 2-1 Fructan supplementation alters host immune responses in a manner consistent with increased exposure to microbial components : results from a double-blinded , randomised , *crossover* study in healthy adults. **Br J Nutr.**, v.115, n. 10, p. 1748–1759, 2016.

COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. **Limnol Oceanogr.**, v. 48, n. 1, p. 168-178, 2003.

DEVARAJAN, A. MOHANMARUGARAJA, M. K. A Comprehensive review on rasam: A south indian traditional functional food. **Pharmacogn Rev.**, v. 11, n. 22, p. 73-82, 2017.

DUARTE, A. C. G. **Avaliação nutricional: aspectos clínicos e laboratoriais.** São Paulo: Atheneu, 2007. 607p.

ESWARAN, S., MUIR, J., CHEY, W. D. Fiber and Functional Gastrointestinal Disorders. **Am J Gastroenterol.**, v. 108, n. 5, p. 718–727, 2013.

FARHAT, G., DRUMMOND S., AL-DUJAILI E.A.S. Polyphenols and their role in obesity management: A systematic review of randomized clinical trials. **Phytother Res.**, v. 31, n. 7, p. 1005-1018, 2017.

FINNISS, D. G. Placebo effects: historical and modern evaluation. **Int Rev Neurobiol.**, v. 139, p. 1-27, 2018.

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

GARCIA, L. G. C.; BECKER, F. S.; DAMIANI, C. Néctar de buriti (*Mauritia flexuosa*): a bebida funcional do cerrado. **Rev. Verde Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.**, v. 10, n. 1, 2015.

GARCIA, J. A. A. *et al.* Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302-308, 2019.

- GARCÍA-PERIS, P. *et al.* Effect of a mixture of inulin and fructo-oligosaccharide on *Lactobacillus* and bifidobacterium intestinal microbiota of patients receiving radiotherapy; a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 6, p. 1908-1915, 2012.
- GULDIKEN, B. *et al.* Home-processed red beetroot (*Beta vulgaris* L.) products: changes in antioxidant properties and bioaccessibility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 858, 2016.
- GULLÓN, B. *et al.* Assessment of the prebiotic effect of quinoa and amaranth in the human intestinal ecosystem. **Food Funct.**, v. 7, n. 9, p. 3782-3788, 2016.
- GUPTA, U.; VERMA, M. Placebo in clinical trials. **Perspect Clin Res.**, v. 4, n. 1, p. 49-52, 2013.
- HASSANBAGLOU, B. *et al.* Antioxidant activity of different extracts from leaves of *Pereskia bleo* (Cactaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 15, p. 2932-2937, 2012.
- HODGSON, J. M. *et al.* Effects of increasing dietary protein and fibre intake with lupin on body weight and composition and blood lipids in overweight men and women. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 6, p. 1086–1094, 2010.
- HOWARTH, N. C. *et al.* Fermentable and nonfermentable fiber supplements did not alter hunger, satiety or body weight in a pilot study of men and women consuming self-selected diets. **J Nutr.**, v. 133, n. 10, p. 3141-3144.
- HULLEY, S. B. *et al.* **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 384p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p. (Série A – Normas e Manuais Técnicos).
- JAKOBSDOTTIR, G.; NYMAN, M., FÅK, F. Designing future prebiotic fiber to target metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 497-502, 2014.
- KADLEC, R.; JAKUBEC, M. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 1983–1990, 2014.

KANJAN, P.; HONGPATTARAKERE, T. Prebiotic efficacy and mechanism of inulin combined with inulin-degrading *Lactobacillus paracasei* I321 in competition with Salmonella. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 236–244, 2017.

KAVANAUGH, D. W. *et al.* Exposure of Bifidobacterium longum subsp. infantis to Milk Oligosaccharides Increases Adhesion to Epithelial Cells and Induces a Substantial Transcriptional Response. **PLOS One**, 2013.

KAZAMA, C. C. *et al.* Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 86-93, 2012.

KJØLBÆK, A. *et al.* Arabinoxylan oligosaccharides and polyunsaturated fatty acid effects on gut microbiota and metabolic markers in overweight individuals with signs of metabolic syndrome: A randomized *crossover* trial. **Clinical Nutrition**, 2019.

LIU, Z. *et al.* Prebiotic effects of almonds and almond skins on intestinal microbiota in healthy adult humans. **Anaerobe**, v. 26, p. 1- 6, 2014.

MABHAUDHI, T. Developing a Roadmap for Improving Neglected and Underutilized Crops: A Case Study of South Africa. **Front Plant Sci.**, v. 8, n. 2143, 2017.

MACIEL, V.B.V., YOSHIDA, C.M.P., GOYCOOLEA, F. Agronomic Cultivation, Chemical Composition, Functional Activities and Applications of Pereskia Species - A Mini Review. **Curr Med Chem.**, 2018.

MADSEN, L. *et al.* Links between Dietary Protein Sources, the Gut Microbiota, and Obesity. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

MARTINEZ, A. P; AZEVEDO, G. R. Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 20, n. 3, mai./jun., 2012.

MCLOUGHLIN, K. *et al.* Host Selection of Microbiota via Differential Theory Host Selection of Microbiota via Differential Adhesion. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 4, p. 550–559, 2016.

MEYER-GERSPACH, A. C. *et al.* Effect of L-tryptophan and L-leucine on gut hormone secretion, appetite feelings and gastric emptying rates in lean and non-diabetic obese participants: a randomized, double-blind, parallel-group trial. **PLOS One**, 2016.

MONTALTO, M; GALLO, F. D. O; GASBARRINI, C. G. Intestinal microbiota and its functions. **Digestive and Liver Disease**, v. 3, p. 30-34, 2009.

MORAES, A. C. F. *et al.* Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 4, 2014.

PAN, M.; KUMAREE, K. K.; SHAH, N. P. Physiological changes of surface membrane in *Lactobacillus* with prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 744–750, 2017.

PAULA, M. C. *et al.* Processamento de bolo com a planta *Pereskia aculeata* Mill. (ora-pro-nóbis). **Rev. Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 18, n. 2, p. 167-174, 2016.

PINTO, N. C. C.; SCIO, E. The Biological activities and chemical composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)—A review. **Plant Foods Human Nutr.**, v. 69, p. 189-195, 2014.

PINTO, N. C. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **J Ethnopharmacol.**, v. 15, n. 173, p. 330-337, 2015.

PINTO, N. C. C. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 194, p. 131-136, 2016.

QUEIROZ, C. R. A. A. *et al.* Growing *Pereskia aculeata* under intermittent irrigation according to levels of matric potential reduction. **Pesqui. Agropecu. Trop.**, v. 45, n. 1, 2015.

REIN, M. J. *et al.* Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588-602, 2012.

REIS, R.; MINIM, V. P. R. Testes de aceitação. In: MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: UFV. 2006.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **J Nutr.**, v. 137, n. 11, 2007.

ROCHA, D. R. C. *et al.* Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia Aculeata* Miller) desidratado*. **Alim. Nutr.**, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2008.

ROTHENBERG, D.O.; ZHOU, C.; ZHANG, L. A Review on the weight-loss effects of oxidized tea polyphenols. **Molecules**, v. 23, n. 5, 2018.

SALT, T. A.; TOCKER, J.E.; ADLER, J. H. Dominance of Δ^5 -sterols in eight species of the Cactaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p. 731–733, 1987.

SARABIA-SAINZ, H. M. *et al.* Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to neoglycans synthesised with prebiotic galactooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2727–2734, 2013.

SARAF-BANK, S. *et al.* Effects of Legume-Enriched Diet on Cardiometabolic Risk Factors among Individuals at Risk for Diabetes: A *Crossover Study*. **J Am Coll Nutr.**, v. 35, n. 1, p. 31–40, 2016.

SCHIESS, S. *et al.* Oral administration of nasturtium affects peptide YY secretion in male subjects. **Mol Nutr Food Res.**, v. 61, n. 8, 2017.

SHARAFI, M. *et al.* Effect of a high-protein, high-fiber beverage preload on subjective appetite ratings and subsequent ad libitum energy intake in overweight men and women: A randomized, double-blind placebo-controlled, crossover study. **Current Developments in Nutrition**, 2018.

SILVA, D. O. *et al.* Acute toxicity and cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a highly nutritious cactaceae plant. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 4, p. 403–409, 2017.

SILVEIRA JÚNIOR, A. O. **O exame coprológico e as funções digestivas**. São Paulo: Santos, 1988.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer, L. (Ed.), *Oxidants and Antioxidants, Part A*. **Meth Enzymol**, v. 299, p. 299:152-178. 1999.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SOUZA, G. S. Translation and validation of the brazilian portuguese version of the gastrointestinal symptom rating scale (GSRS) questionnaire. **Arq Gastroenterol**, v. 53, n. 3, 2016.

SOUZA, M. R. M. *et al.* O Potencial do Ora-pro-nobis na Diversificação da Produção Agrícola Familiar. **Rev. Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

SOUZA, T. C. L. **Perfil de compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller)**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SOUZA, L. F. *et al.* *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) leaves: chemical composition and biological activities. **Int J Mol Sci.**, v. 17, n. 9, p. 1478, 2016.

STEINERT, R. E. *et al.* Effects of intraduodenal infusion of the branched-chain amino acid leucine on ad libitum eating, gut motor and hormone functions, and glycemia in healthy men. **Am J Clin Nutr.**, v. 102, n. 4, p. 820-827, 2015.

SUGIZAKI, C. S. A.; NAVES, M. M. V. Potential prebiotic properties of nuts and edible seeds and their relationship to obesity. **Nutrients**, v. 10, 2018.

SYNGAI, G. G. *et al.* Probiotics - the versatile functional food ingredients. **J Food Sci Technol.**, v. 53, n. 2, p. 921-933, 2016.

TAKEITI, C. Y. *et al.* Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **Int J Food Sci Nutr.**, v. 60, n. 1, p. 148-160, 2009.

TURRA, A. F. *et al.* Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (Cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, Cascavel, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2007.

TOFANELLI, M. B. D.; RESENDE, S. G. Sistemas de condução na produção de folhas de Ora-pro-nobis. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 41, n. 3, p. 466-469, 2011.

VAN HUL, M.; CANI, P.D. Targeting carbohydrates and polyphenols for a healthy microbiome and healthy weight. **Curr Nutr Rep.**, v. 3, 2019.

VIEIRA, C. R. *et al.* Clinical application of a cocoa and unripe banana flour beverage for overweight women with abdominal obesity: Prospective, double-blinded and randomized clinical trial. **Journal of Food Biochemistry**, e12372, 2017.

VIEIRA, C. R. *et al.* Effect of *Pereskia aculeata* Mill. in vitro and in overweight humans: A randomized controlled trial. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. e12903, 2019.

VIEIRA, D. A. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante das folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis. **Rev. Bras. Pesq. Alim.**, v. 1 n. 2, p. 129-134, 2010.

WAHAB, S. I. A. *et al.* Biological activities of *Pereskia bleo* extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 71-75, 2009.

WESTFALL, S.; LOMIS, N.; PRAKASH, S. A novel polyphenolic prebiotic and probiotic formulation have synergistic effects on the gut microbiota influencing *Drosophila melanogaster* physiology. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva. 2000.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. Geneva, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-andoverweight>> Acesso em: 7 jan. 2018.

YANG S., GRALL, A., CHAPMAN, M. A. Origin and diversification of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.), a multipurpose underutilized legume. **Am J Bot.**, v. 105, n. 5, p. 888-897, 2018.

YEN, W. J. *et al.* Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 193-200, 2005.

ZAKARI, M. *et al.* Gender differences in chronic constipation on anorectal motility. **Neurogastroenterology & Motility**, p. 1-8, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Imagens dos biscoitos desenvolvidos



Figura – Imagens dos biscoitos desenvolvidos.

APÊNDICE B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do ensaio clínico *crossover*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO À BASE DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) E SUA INFLUÊNCIA NA MICROBIOTA INTESTINAL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ANTROPOMÉTRICOS EM HOMENS ADULTOS.

Pesquisador: Camilla Ribeiro Vieira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54297116.9.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.462.043

Apresentação do Projeto:

A ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill), apresenta diversas vitaminas, minerais, compostos bioativos e fibras. O alto teor de fibras da planta pode indicar efeitos prebióticos, contribuindo para a modulação da microbiota intestinal e na saúde geral. Além disso, estudos *in vitro* e em animais demonstraram que a mesma apresenta elevada capacidade anti-inflamatória e antioxidante, o que poderia ajudar no combate do estresse oxidativo e conseqüentemente em doenças crônicas não-transmissíveis. Dessa forma, o estudo seria relevante por desenvolver um produto inovador e, além disso, estudar os possíveis efeitos benéficos da planta em humanos.

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do ensaio clínico *crossover*.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa **Desenvolvimento de produto à base de farinha ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* mill.) e sua influência na microbiota intestinal, capacidade antioxidante, anti-inflamatória, parâmetros bioquímicos e antropométricos em homens adultos**, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço da pesquisadora principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

TÍTULO DA PESQUISA: Desenvolvimento de produto à base de farinha de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* mill.) e sua influência na microbiota intestinal, capacidade antioxidante, anti-inflamatória, parâmetros bioquímicos e antropométricos em homens adultos

PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS: Camilla Ribeiro Vieira

Profa. Dra. Roberta Ribeiro Silva

ENDEREÇO: Rua Travessa Pio XII, 21, Vila Betânia, Alfenas -MG

TELEFONE: (35) 99176-8233

OBJETIVOS: avaliar os efeitos do consumo diário de ora-pro-nobis na microbiota intestinal, nos exames bioquímicos de glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos, nos metabólitos da urina, perda de peso e alteração do percentual de gordura corporal de indivíduos saudáveis.

JUSTIFICATIVA: A ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill), apresenta diversas vitaminas, minerais, compostos bioativos e fibras. O alto teor de fibras da planta pode indicar efeitos prebióticos, contribuindo para a modulação da microbiota intestinal e na saúde geral. Além disso, estudos in vitro e em animais demonstraram que a mesma apresenta elevada capacidade anti-inflamatória e antioxidante, o que poderia ajudar no combate do estresse oxidativo e consequentemente em doenças crônicas não-transmissíveis. Dessa forma, o estudo seria relevante por desenvolver um produto inovador e, além disso, estudar os possíveis efeitos benéficos da planta em humanos.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Trata-se de um ensaio clínico *crossover*. O estudo terá duração de quatorze semanas e será organizado de acordo com as etapas abaixo:

1ª Etapa - Recrutamento: avaliação de triagem; explicação e assinatura deste termo. Coleta de dados pessoais, avaliação do perfil de atividade física e ingestão alimentar habitual, avaliação nutricional inicial (pressão arterial, medidas antropométricas e realização da avaliação por bioimpedância elétrica). Você receberá ainda os formulários para preenchimento do Registro Alimentar, pedidos de exames bioquímicos e protocolos para a coleta das amostras de fezes e urina.

2ª Etapa- Primeiros exames: exames de sangue no Laboratório de Análises Clínicas. Após o exame você receberá o produto no Laboratório de Avaliação Nutricional da UNIFAL-MG, bem como orientação para anotar sinais e sintomas relacionados ao consumo do mesmo que porventura venham a ocorrer, bem como alterações no hábito intestinal, na prática de atividade física e na alimentação. Também deverá apresentar-se à pesquisadora para entregar os Registros Alimentares devidamente preenchidos, as amostras de fezes e de urina, responder o primeiro Questionário Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS), validado para o Brasil.

3ª Etapa – Início com o produto desenvolvido – Receberá todos os dias o produto desenvolvido à base de ora-pro-nobis, durante 06 semanas, todos os dias. Receberá orientação para anotar sinais e sintomas relacionados ao

consumo do mesmo que porventura venham a ocorrer, bem como alterações no hábito intestinal, na prática de atividade física e na alimentação. Também poderá esclarecer possíveis dúvidas e dificuldades.

4ª Etapa – Avaliação: será realizada após 06 semanas completas do início de ingestão dos produtos. Após 06 semanas completas de ingestão do produto, serão realizadas novamente as avaliações antropométricas, bioquímicas e coleta das fezes e da urina. Da mesma forma que na segunda etapa, após comparecerem no Laboratório de Análises Clínicas para colher as amostras de sangue, deverá entregar os registros alimentares da semana anterior, bem como a avaliação antropométrica, responder a segunda aplicação do Questionário GSRS e entregar as amostras de fezes e urina.

5ª Etapa – Início sem o produto desenvolvido – Após duas semanas da realização dos últimos exames, irá receber o produto controle, sem ora-pro-nobis, durante 06 semanas, todos os dias.

6ª Etapa - será realizada após 06 semanas completas do início de ingestão do produto controle. Deverá repetir os procedimentos da 4ª etapa.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Você tem liberdade para retirar o consentimento, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Há total garantia de sigilo quanto às informações obtidas no estudo, sendo garantida a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, os dados não serão divulgados.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Eu, _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pelo pesquisador(a) – Camilla Ribeiro Vieira – dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa.

Disponho-me a disponibilizar amostras de fezes, sangue e urina e a responder o questionário baseado no Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS).

Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado) ou o CEPUNIFAL-MG, com endereço na Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP 37130-000, no e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

Alfenas, ____ de _____ de 2017.

(Nome por extenso) (Assinatura)

APÊNDICE D – Placas do teste de adesão

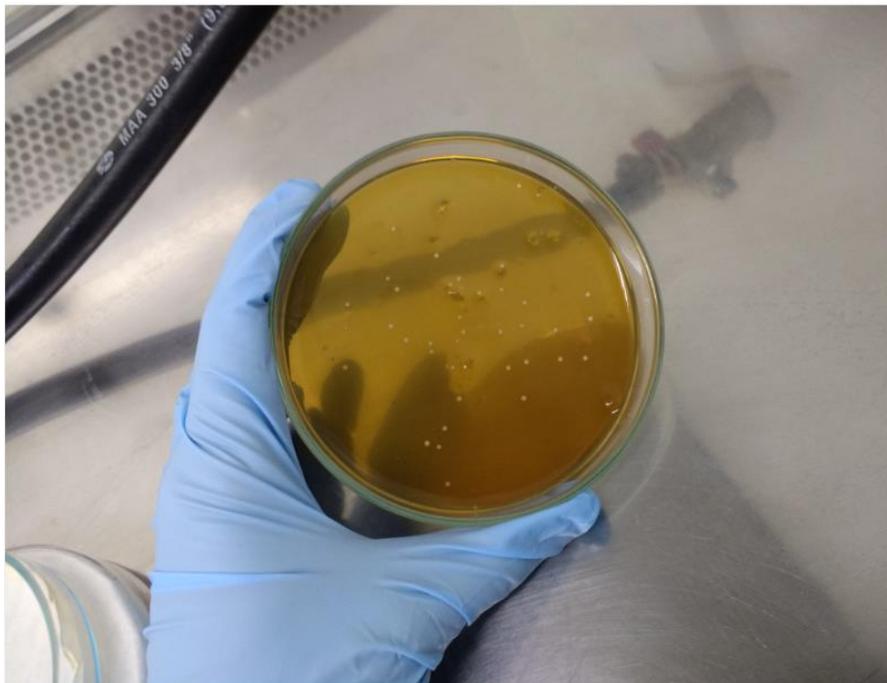
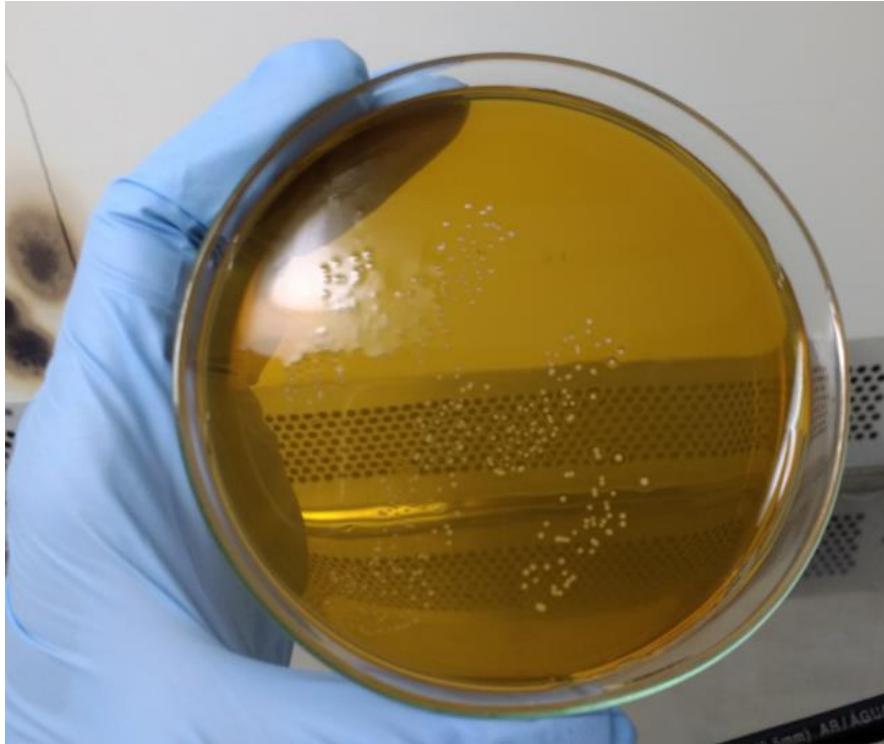


Figura – Imagens de duas placas do teste de adesão.

APÊNDICE E - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do ensaio clínico randomizado duplo-cego.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO À BASE DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) E SUA INFLUÊNCIA NA MICROBIOTA INTESTINAL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ANTROPOMÉTRICOS EM ADULTOS.

Pesquisador: Camilla Ribeiro Vieira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54297116.9.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.717.855

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_115474_3_E1.pdf	13/06/2018 15:12:54		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	11/06/2018 15:28:10	Camilla Ribeiro Vieira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocomite.docx	11/06/2018 10:37:00	Camilla Ribeiro Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimento.docx	11/06/2018 10:34:40	Camilla Ribeiro Vieira	Aceito
Parecer Anterior	parecercomite.pdf	11/06/2018 10:32:57	Camilla Ribeiro Vieira	Aceito
Outros	Cartacomite.doc	11/06/2018 10:29:35	Camilla Ribeiro Vieira	Aceito
Cronograma	cronogramacomite.docx	11/06/2018 10:27:41	Camilla Ribeiro Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

APÊNDICE F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do ensaio clínico randomizado duplo-cego.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa **Desenvolvimento de produto à base de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* mill.) e sua influência na microbiota intestinal, capacidade antioxidante, anti-inflamatória, parâmetros bioquímicos e antropométricos em adultos**, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço da pesquisadora principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

TÍTULO DA PESQUISA: Desenvolvimento de produto à base de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* mill.) e sua influência na microbiota intestinal, capacidade antioxidante, anti-inflamatória, parâmetros bioquímicos e antropométricos em adultos

PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS: Camilla Ribeiro Vieira

Profa. Dra. Roberta Ribeiro Silva

ENDEREÇO: Rua Emerson Engel Ayer, 313, Residencial São Lucas, Alfenas -MG

TELEFONE: (35) 99176-8233

OBJETIVOS: avaliar os efeitos do consumo diário de ora-pro-nobis na microbiota intestinal, nos exames bioquímicos de glicemia e insulina de jejum, colesterol total e frações, triglicerídeos, perda de peso e alteração do percentual de gordura corporal de indivíduos saudáveis.

JUSTIFICATIVA: A ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill), apresenta diversas vitaminas, minerais, compostos bioativos e fibras. O alto teor de fibras da planta pode indicar efeitos prebióticos, contribuindo para a modulação da microbiota intestinal e na saúde geral. Além disso, estudos in vitro e em animais demonstraram que a mesma apresenta elevada capacidade anti-inflamatória e antioxidante, o que poderia ajudar no combate do estresse oxidativo e consequentemente em doenças crônicas não-transmissíveis. Dessa forma, o estudo seria relevante por desenvolver um produto inovador e, além disso, estudar os possíveis efeitos benéficos da planta em humanos.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego. O estudo terá duração de seis semanas e será organizado de acordo com as etapas abaixo:

1ª Etapa - Recrutamento: avaliação de triagem; explicação e assinatura deste termo. Coleta de dados pessoais, avaliação do perfil de atividade física e ingestão alimentar habitual, avaliação nutricional inicial (pressão arterial, medidas antropométricas e realização da avaliação por bioimpedância elétrica). Você receberá ainda os formulários para preenchimento do Registro Alimentar, pedidos de exames bioquímicos e protocolos para a coleta das amostras de fezes.

2ª Etapa- Primeiros exames: exames de sangue no Laboratório de Análises Clínicas. Após o exame você receberá orientação para anotar sinais e sintomas relacionados ao consumo do mesmo que porventura venham a ocorrer, bem como alterações no hábito intestinal, na prática de atividade física e na alimentação. Também deverá apresentar-se à pesquisadora para entregar os Registros Alimentares devidamente preenchidos, as amostras de fezes e responder o primeiro Questionário Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS), validado para o Brasil.

3ª Etapa – Início com o produto desenvolvido – Receberá todos os dias o produto desenvolvido à base de ora-pro-nobis, durante 06 semanas, todos os dias. Receberá orientação para anotar sinais e sintomas relacionados ao

consumo do mesmo que porventura venham a ocorrer, bem como alterações no hábito intestinal, na prática de atividade física e na alimentação. Também poderá esclarecer possíveis dúvidas e dificuldades.

4ª Etapa – Avaliação final: será realizada após 06 semanas completas do início de ingestão dos produtos. Deverão repetir os procedimentos da 2ª etapa.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Você tem liberdade para retirar o consentimento, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Há total garantia de sigilo quanto às informações obtidas no estudo, sendo garantida a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, os dados não serão divulgados.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Eu, _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pelo pesquisador(a) – Camilla Ribeiro Vieira – dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa.

Disponho-me a disponibilizar amostras de fezes, sangue e a responder o questionário baseado no Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS).

Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado) ou o CEPUNIFAL-MG, com endereço na Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP 37130-000, no e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

Alfenas, ___ de _____ de 2018.

(Nome por extenso) (Assinatura)

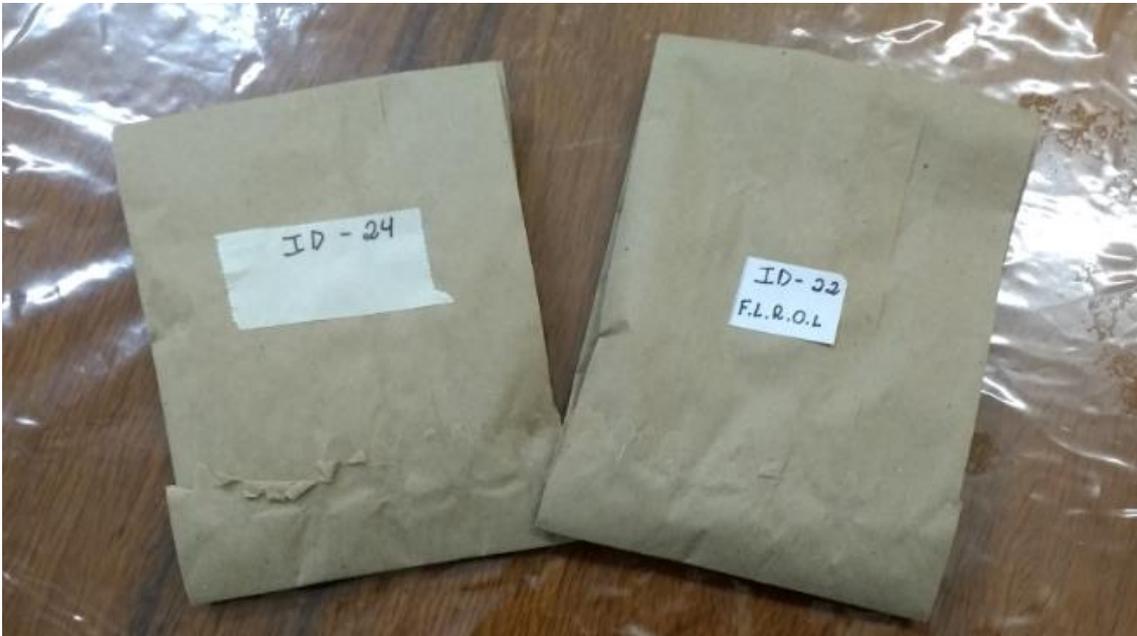
APÊNDICE G – Imagens dos pós para o preparo de bebidas e das embalagens



**Pó para o preparo
da bebida teste**



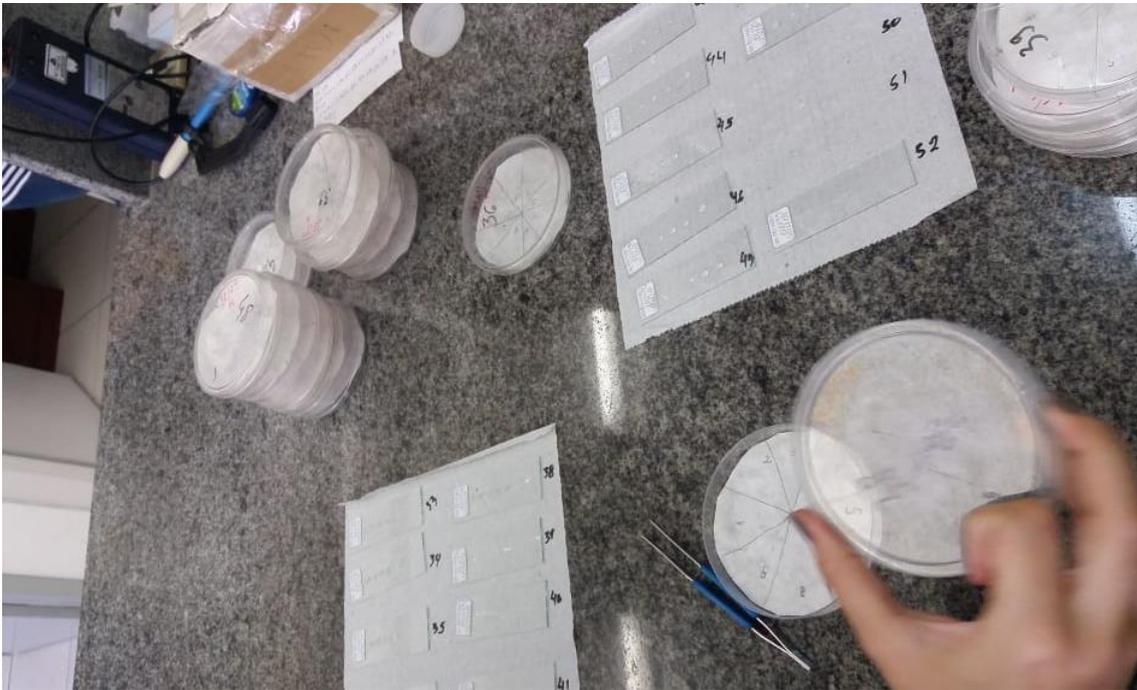
**Pó para o preparo
da bebida controle**



Embalagens dos pós para o preparo de bebidas

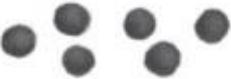
Figura - Imagens dos Pós para o preparo de bebidas e das embalagens.

APÊNDICE H – Algumas imagens da análise da microbiota fecal.



ANEXOS

ANEXO A- Escala de Bristol

<i>Escala de Bristol de Consistência de Fezes</i>		
Tipo 1		Pequenas bolinhas duras, separadas como coqueiros (difícil para sair).
Tipo 2		Formato de linguiça encaroçada, com pequenas bolinhas grudadas.
Tipo 3		Formato de linguiça com rachaduras na superfície.
Tipo 4		Alongada com formato de salsicha ou cobra, lisa e macia.
Tipo 5		Pedaços macios e separados, com bordas bem definidas (fáceis de sair).
Tipo 6		Massa pastosa e fofa, com bordas irregulares.
Tipo 7		Totalmente líquida, sem pedaços sólidos.

Índice de massa do corpo humano

Fonte: Martinez & Azevedo, 2012.

ANEXO B – Questionário *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS)

Questionário *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS) validado para o Brasil

Por favor, para cada questão dê **uma nota de 1 a 7**, conforme a escala abaixo:

Escala de resposta (em intensidade ou frequência):

1. Nenhum desconforto / nenhuma vez
2. Desconforto mínimo / raras vezes
3. Desconforto leve / pouquíssimas vezes
4. Desconforto moderado / poucas vezes
5. Desconforto moderadamente severo / algumas vezes
6. Desconforto forte / muitas vezes
7. Desconforto muitíssimo forte / muitíssimas vezes

1. Você teve dores abdominais durante a semana passada? (Dor se refere a todos os tipos de dores no estômago ou de intestino/barriga).

Resposta: _____ **Observação:**

2. Você sentiu azia durante a semana passada? (Por azia queremos dizer uma dor em queimação ou desconforto em seu peito)

Resposta: _____ **Observação:**

3. Você sentiu refluxo ácido semana passada? (Por refluxo ácido queremos dizer: regurgitação ou fluxo de fluido azedo ou amargo na boca).

Resposta: _____ **Observação:**

4. Você sentiu dor de fome no estômago durante a semana passada? (Esta sensação de estômago vazio está associada com a necessidade de comer entre as refeições).

Resposta: _____ **Observação:**

5. Você sentiu náuseas durante a semana passada? (Por náuseas queremos dizer uma sensação de mal estar iminente – parece que vai vomitar).

Resposta: _____ **Observação:**

6. Seu estômago ou barriga roncou durante a semana passada? (Ronco refere-se a barulhos ou ruídos no estômago).

Resposta: _____ **Observação:**

7. Você sentiu seu estômago cheio de ar durante a semana passada? (Sentir o estômago cheio de ar se refere ao inchaço no estômago ou na barriga).

Resposta: _____ **Observação:**

8. Você arrotou durante a semana passada? (Arrotar refere-se a trazer ar ou gás através da boca).

Resposta: _____ **Observação:**

9. Você eliminou gases ou teve flatulência durante a semana passada? (Eliminar gases ou flatulência refere-se à liberação de ar ou gás a partir do intestino).

Resposta: _____ **Observação:**

10. Você teve constipação/prisão de ventre durante a semana passada? (Constipação refere-se a uma capacidade reduzida de defecar).

Resposta: _____ **Observação:**

11. Você teve diarreia durante a semana passada? (Diarreia refere-se a fezes moles ou líquidas frequentes).

Resposta: _____ **Observação:**

12. Você teve/apresentou fezes moles durante a semana passada? (Se as fezes foram alternadamente duras e moles, essa questão refere-se apenas ao quanto você se sentiu incomodado pelas fezes moles).

Resposta: _____ **Observação:**

13. Você teve/apresentou fezes duras durante a semana passada? (Se as fezes foram alternadamente duras e moles, essa questão refere-se apenas ao quanto você se sentiu incomodado pelas fezes duras).

Resposta: _____ **Observação:**

14. Você sentiu uma necessidade urgente de evacuar durante a semana passada? (Por necessidade urgente entenda-se necessidade de correr ao banheiro para defecar).

Resposta: _____ **Observação:**

15. Ao ir ao banheiro durante a semana passada, você teve a sensação de não esvaziar completamente o intestino? (A sensação de que depois de terminar uma defecação ainda há mais fezes que precisam ser eliminadas).

Resposta: _____ **Observação:**

ANEXO C – Artigo publicado “Effect of *Pereskia aculeata* Mill. *in vitro* and in overweight humans: A randomized controlled trial”

Received: 23 October 2018 | Revised: 26 April 2019 | Accepted: 1 May 2019
DOI: 10.1111/jfbc.12903



FULL ARTICLE

Journal of
Food Biochemistry WILEY

Effect of *Pereskia aculeata* Mill. *in vitro* and in overweight humans: A randomized controlled trial

Camilla Ribeiro Vieira¹ | Bárbara Pereira da Silva² | Mariana Araújo Vieira do Carmo¹ |
Luciana Azevedo¹ | Denismar Alves Nogueira¹ | Hércia Stampini Duarte Martino² |
Roberta Ribeiro Silva¹

¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brazil

²Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

Correspondence

Roberta Ribeiro Silva, Department of Nutrition, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Zip Code: 37130-000, Brazil.
Email: betaribeiro@hotmail.com

Abstract

Objectives: The objective of this study was to investigate the influence of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) flour on the adhesion of probiotics to intestinal epithelial cells and to evaluate the effect of a product based on this flour on gastrointestinal symptoms, weight, body fat, glycemia, and lipid profile in overweight men. **Methods:** Microbiological counts (probiotic count, survival after *in vitro* gastrointestinal resistance, Caco-2 cell adhesion) were analyzed. A randomized, cross-over intervention was performed. Intestinal microbiota was indirectly assessed on the basis of consistency, color of feces, and gastrointestinal symptoms. **Results:** *P. aculeata* did not affect *Lactobacillus casei* adhesion to Caco-2 cells. Ora-pro-nobis flour improved gastrointestinal symptoms and increased satiety. **Conclusion:** The consumption of ora-pro-nobis flour improved intestinal health. In addition, it maintained the high adherence of *L. casei* to intestinal cells as well as patient anthropometric and biochemical parameters.

Practical applications

Pereskia aculeata Mill. is well known in folk medicine and has several nutrients; however, there are few studies on this plant. This is the first study to analyze the influence of *P. aculeata* on bacterial adherence and the first cross-over clinical trial to evaluate the beneficial potential of ora-pro-nobis flour in overweight men. Thus, this study will contribute to the promotion of ora-pro-nobis as a functional ingredient and will arouse the interest of industries to develop related healthy foods. In addition, it is an effective dietary strategy to improve the gastrointestinal health of men.

KEYWORDS

dietary fiber, functional ingredient, gastrointestinal symptoms, ora-pro-nobis

1 | INTRODUCTION

Pereskia aculeata Mill., commonly known as ora-pro-nobis, is an underutilized plant that belongs to the Cactaceae family (Calixto et al., 2012; Pinto, Duque, et al., 2015). Food and pharmaceutical industries have been interested in this vegetable because of its high nutrient content. The leaves of ora-pro-nobis have remarkable levels

of fibers, proteins, calcium, magnesium, manganese, zinc, vitamin A, vitamin C, folic acid, and bioactive compounds, such as carotenoids (Pinto et al., 2016).

Takeiti, Antonio, Motta, Collares-Queiroz, and Park (2009) reported a high concentration of dietary fiber in *P. aculeata* (39.1%), which is responsible for the functionality of this plant. The association of fibers with probiotics for the improvement of intestinal health has